Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO EM CARCINOMAS DA TIRÓIDE

Angela Adamski da Silva Reis
Goiânia, 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Reis, Angela Adamski da Silva.
R375e Estudo da associação do polimorfismo genético em carcinomas da tiróide [manuscrito]: / Angela Adamski da Silva Reis. - 2010.
96 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2010.
Bibliografia.

1. Polimorfismo genético 2. Susceptibilidade - Câncer de tiróide. I.Título

CDU: 616-006.6

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: [ ] Dissertação **[X] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Angela Adamski da Silva Reis		
E-mail:	angeladamski@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? [**X**]Sim [ ] Não			
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico			**Sigla:** CNPq
País: Brasil	**UF:** GO	**CNPJ:**	33654831000136
Título: Estudo da Associação do polimorfismo genético em carcinomas da tiróide			
Palavras-chave: Polimorfismo, susceptibilidade, carcinomas tiroideanos			
Título em outra língua: *Study on the association of genetic polymorphism in thyroid cancer*			
Palavras-chave em outra língua: *polymorphism, susceptibility, thyroid cancer*			
Área de concentração:	Biologia Celular e Molecular		
Data defesa: (dd/mm/aaaa):	24/02/2010		
Programa de Pós-Graduação:	Instituto de Ciências Biológicas – UFG - Biologia		
Orientador (a):	Aparecido Divino da Cruz		
E-mail:	acruz@pucgoias.edu.br		
Co-orientador (a):	Daniela de Melo e Silva		
E-mail:	danielamelo@pucgoias.edu.br		

3. Informações de acesso ao documento:
Liberação para disponibilização?[1] [**X**] total [ ] parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:
[ ] Capítulos. Especifique: _____

[ ] Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.
O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

_____ Data: 29 / 06 / 2010

Assinatura do (a) autor (a)

[1] Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO EM CARCINOMAS DA TIRÓIDE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, Doutorado em Biologia – Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás – UFG, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientanda: Angela Adamski da Silva Reis, M.Sc.

Orientador: Dr. Aparecido Divino da Cruz

Goiânia, 2010.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz – Orientador – Presidente da Banca.
Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (ICB-UFG) e Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (NPR/PUC-GO).

Prof. Dr. José Carlos de Oliveira – Membro Externo
Serviço de Cabeça e Pescoço
Associação de Combate ao Câncer em Goiás

Prof. Dr. Wagner Gouvêa dos Santos – Membro Externo
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal de Goiás – Jataí-GO

Prof. Dr. Alexandre Siqueira Guedes Coelho – Membro Interno
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Alexandre de Melo Bailão – Membro Interno
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Goiás

Suplentes

Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva – Membro Externo
Departamento de Biologia e Medicina
Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profa. Dra. Elisangela de Paula S. Lacerda – Membro Interno
Departamento de Biologia (Genética Médica)
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Goiás

O desenvolvimento das atividades experimentais da presente Tese contou com a colaboração das seguintes instituições: Universidade Federal de Goiás (UFG) – **Programa de Pós-Graduação - Doutorado em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas** (ICB); **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq), **Núcleo de Pesquisas Replicon** do Departamento de Biologia da **Pontifícia Universidade Católica de Goiás** (PUC-GO); **Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de Goiás** (FAPEG); Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia (RBCP) da **Associação de Combate ao Câncer em Goiás** (ACCG), Serviço de Cabeça e Pescoço – Hospital Araújo Jorge e da ***International Agency for Research on Cancer*** (IARC).

Aos pacientes que anseiam por descobertas científicas para o desenvolvimento de novas terapias para o controle do câncer.

Agradecimentos

Agradeço a ***Deus*** por renovar as esperanças em cada etapa a ser vencida. Sem a presença dele minha luz se apaga.

Agradeço a meu pai, ***José Arlei da Silva***, pelo pai maravilhoso que sempre esteve presente em todos os momentos, que se dedicou à formação da nossa família e me incentivou aos estudos; a minha querida e maravilhosa mãe, ***Leonélia Maria Adamski da Silva*** pela preocupação com o meu bem estar, pelos conselhos, pelo incentivo para eu alcançar meus sonhos e pelo amor incondicional. Amo vocês!!!. A minha irmã querida ***Fernanda Adamski da Silva*** pelo eterno carinho, amor e incentivo. Amo você!!!.

Ao meu amor, ***Luciano de Souza Vaz dos Reis***, pelo amor, paciência, incentivo, preocupação, companheirismo de todas as horas e pelos incontáveis conselhos. Meu eterno amor, Te amo muito!!!. Ao meu lindo filho, ***Vitor Adamski da Silva Reis***, fruto deste Doutorado, ao qual não tenho palavras para expressar meu amor incondicional, que Deus te proteja sempre. Mamãe te ama!!!

Ao meu orientador, ***Profª Drº. Aparecido Divino da Cruz*****,** carinhosamente chamado de Peixoto, que há quase 10 anos acredita no meu potencial e na minha confiança. Minha eterna amizade, gratidão, respeito e admiração!!! Obrigada por tudo!!!!!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), agradeço, em especial a ***Profª Drª Célia Maria de Almeida Soares*** pela disposição de seu laboratório nos momentos necessários e conselho de extrema relevância no momento decisivo desta jornada e ao ***Prof. Dr. Cirano Ulhoa*** pelo apoio e compreenção da maternidade junto ao Programa de Pós-Graduação desta Universidade. A ***Gleizilene Braz Pereira dos Santos*** pelo apoio na secretaria do Programa de Pós-Graduação e pelos infindáveis conselhos.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) pelo companheirismo e amizade que ficam para sempre. Em especial, aos eternos amigos ***Alessandra de S. B. B. Ribeiro*** e ***Rodrigo dos Santos Silva,*** obrigada por tudo!!!

À equipe do ***Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás*** pelo companheirismo. Em especial a ***Profª***

Dr[a] Daniela de Melo e Silva**,** que me auxiliou em todos os sentidos, dizer obrigada é muito pouco pelo apoio nos momentos mais difíceis e decisivos. Mas, agradeço pela paciência, conselhos e acima de tudo pela sua preocupação e carinho. Ao ***Prof. Dr. Cláudio Carlos da Silva*** pelo apoio nas decisões difíceis. Ao ***Prof. Raimundo Lima Silva Júnior*** e ao ***Prof. Dr. Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva*** pelo auxílio na análise estatística e meta-análise.

Ao grande amigo ***Leonardo Barcelos de Paula*** pelo incentivo desde o início desta etapa e pelo companheirismo de todas as horas e momentos em que apenas um amigo pode entender cada acontecimento. Obrigada por tudo!!!

A ***Caroline Dias Monteiro*** que conseguiu me fazer rir em momentos difíceis, obrigada!

Ao Hospital Araújo Jorge - Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) em especial ao Serviço de Cabeça e Pescoço, ***Dr[a] Maria Paula Curado*** e ***Dr. José Carlos de Oliveira***.

Em especial, *aos pacientes* que anônima e voluntariamente fizeram parte deste estudo e possibilitaram a conclusão deste trabalho.

Ao ***Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico*** (CNPq) pela Bolsa de Doutorado oferecida. Sem esse auxílio teria sido difícil. Obrigada!

Agradeço **a todos** que direta ou indiretamente me ajudaram, sem vocês este trabalho não teria sido concluído com tanta determinação e a minha satisfação não seria a mesma, obrigada a todos !!!

Sumário

Resumo xv
Abstract xvi

1. Introdução. 18
1.1. Patogênese Molecular dos carcinomas tiroideanos 19
1.1.1. Carcinoma Papilar 22
1.1.2. Carcinoma folicular 25
1.1.3. Carcinoma pouco diferenciado e Anaplásico 26
1.1.4. Carcinoma Medular 26
1.2. Doenças Tiroideanas 27
1.3. Polimorfismos Genéticos 29
1.3.1. Polimorfismo das enzimas do metabolismo de xenobióticos 29
1.3.1.1. Citocromo P450 (*CYP1A1*) 31
1.3.1.2. Sistema glutationa S-transferse 33
1.3.2. Polimorfismo do gene TP53 no códon 72 do éxon 4 36

2.Justificativa 39

3.Objetivos 41

4. Pacientes e Métodos 43
4.1. Polimorfismo dos genes relacionados ao metabolismo e detoxificação de xenobióticos e do gene supressor de tumor *TP53*^{72} na susceptibilidade aos carcinomas tiroideanos 43
4.1.1. Genotipagem das variantes *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* 44
4.1.2. Análise do Sistema glutationa S-transferase 47
4.1.3. Polimorfismo de *TP53* ^{72} 48
4.1.3.1 Polimorfismo de *TP53* ^{72} e associação por meta-análise 50
4.2. Análise Estatística 51

5.Resultados e Discussão 53
5.1. Dados Gerais 53

5.2. Polimorfismo dos genes relacionados ao metabolismo e detoxificação de xenobióticos na susceptibilidade aos carcinomas tiroideanos 55

5.3. Polimorfismo de *TP53* [72] 63

5.4. Polimorfismo de *TP53* [72] e associação por meta-análise 67

6. Considerações Finais **74**

7. Referências Bibliográficas **76**

8. Anexos **88**

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da origem e de progressão dos carcinomas tiroideanos. O adenoma e carcinoma oncocítico são variantes do adenoma e do carcinoma folicular, respectivamente. 20

Figura 2. A via RAS-MEK-MAPK (BRAF). Ativação de ERK desempenha papel central na sinalização da proliferação celular induzida por fatores de crescimento que atuam por meio de receptores proteínas serina/treonina quinase. A ativação de RAs fosforila uma segunda proteína quinase MEK que ativa membros da família ERK por fosforilação, uma vez ativada, ERK fosforila vários alvos, incluindo outras proteínas quinases e fatores de transcrição, como os elementos necessários para a proliferação celular. 23

Figura 3. Sequência dos efeitos biológicos nas reações de biotransformações dos xenobióticos. 30

Figura 4. Mecanismo da carcinogênese (Adaptado de Ribeiro *et al.,* 2003). 31

Figura 5. Estrutura atribuída ao gene *CYP450* [adaptado de Silva Júnior, 2008]. 32

Figura 6. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe Mu de *GST*, no cromossomo 1, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTM1*. Adaptado de Silva Jr (2008). 34

Figura 7. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe Teta de *GST*, no cromossomo 22, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTT1*. Adaptado de Silva Jr (2008). 35

Figura 8. Gel de agarose a 2,0 % indicando o resultado da genotipagem da variante *CYP1A1m1*. A1: homozigoto T/T; A2: homozigoto C/C; A3: heterozigotos T/C e C-: controle negativo. 45

Figura 9. Gel em poliacrilamida a 8% corado por Brometo de Etídeo (EtBr) demonstrando os genótipos para *CYP1A1m2*, HS: homozigoto selvagem (149pb e 55pb), HM: homozigoto mutante (204pb) e HT: genótipo heterozigoto (204pb, 149pb e 55pb). MM: Marcador Molecular de 50pb. 46

Figura 10. Gel em agarose 2.0% demonstrando os genótipos *GSTT1* (480pb) e *GSTM1* (215pb) e genótipos nulos. **MM**: Marcador molecular 50pb, **A1**: genótipos *GSTT1* e *GSTM1* nulo, **A2**: *GSTT1* nulo e *GSTM1* presente, **A3**: *GSTT1* presente e *GSTM1* presente, **A4**: *GSTT1* nulo e *GSTM1* presente, C+: Controle positivo (*GSTT1* presente e *GSTM1* presente) e C-: Controle negativo. Utilizou-se o *primer RH92600* de 135 pb como controle endógeno da reação. 48

Figura 11. Gel de poliacrilamida 8% com os amplicons dos alelos de *p53*: Arginina – 144pb e Prolina – 177pb. Ladder de 50pb (Ld) - Invitrogen®; Amostras 1 ao 4 (alelo arginina); 5 ao 8 (alelo heterozigoto – *p53 Arg/Pro*); 9 e 10 (alelo prolina). Para a confirmação da reação, foram utilizados controles positivos C (+) e controles negativos C (-). 50

Figura 12. Distribuição percentual dos tipos de nódulos presentes nos grupos caso NNM, NNB e NNN. Legenda: CFT: Carcinoma Folicular da Tiróide; CMT: Carcinoma Medular da Tiróide; CPT: Carcinoma Papilar da Tiróide; CCH: Carcinoma de Células de Hurtle; BC: Bócio Colóide; TH: Tiroidete de Hashimoto; BA: Bócio Adenomatoso; AF: Adenoma Folicular e ACH: Adenoma de Células de Hurtle. 54

Figura 13. Critérios de identificação, inclusão e exclusão dos estudos da meta-análise (Adaptado de Silva, 2009). 68

Figura 14. *Odds ratios* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RR e RP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade significativos (Teste de *DerSimonian-Laird*). 69

Figura 15. *Odds ratios* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RR e PP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade não significativos (Teste de *DerSimonian-Laird*). 70

Figura 16. *Odds ratios* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RP e PP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade significativos (Teste de *DerSimonian-Laird*). 70

Figura 17. *Odds ratios* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RR x RP+PP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade significativos (Teste de *DerSimonian-Laird*). 71

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais genes candidatos para a susceptibilidade de DAIT (adaptado Sgarbi & Maciel, 2008). 28

Tabela 2. Características gerais dos *primers* utilizados para a genotipagem de *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* nos grupos caso e controle. 44

Tabela 3. Protocolo de termociclagem para a genotipagem de *CYP1Am1* e *CYP1A1m2.* 44

Tabela 4. Características gerais dos *primers* utilizados para a análise das deleções de *GSTM1* e *GSTT1* nos grupos caso e controle. 47

Tabela 5. Protocolo de termociclagem para a análise das deleções de *GSTM1* e *GSTT1* nos grupos caso e controle. 47

Tabela 6. Características gerais dos *primers* utilizados para a avaliação do polimorfismo de $TP53^{72}$ nos grupos caso e controle. 49

Tabela 7. Protocolo de termociclagem para análise do polimorfismo de *TP53* arginina e prolina. 49

Tabela 8. Distribuição dos dados sócio-demográficos, quanto á idade e sexo, dos pacientes caso e controle. 53

Tabela 9. Distribuição dos dados sócio-demográficos, quanto à idade e sexo dos pacientes classificados com NNM, NNB e NNN e controle. 53

Tabela 10. Distribuição das frequências alélicas da variante *CYP1A1m1* entre os grupos caso e controle. 55

Tabela 11. Distribuição das frequências genotípicas de *CYP1A1m1* entre as populações caso e controle. 55

Tabela 12. Número de indivíduos com ou sem genótipos considerados de risco e respectivas *Odds Ratio* (OR), Intervalo de Confiança 95% (IC 95%) e valor de *p* para a variante *CYP1A1m1* nos grupos caso e controle. 56

Tabela 13. Distribuição das frequências alélicas da variante *CYP1A1m2* entre os grupos caso e controle. 56

Tabela 14. Distribuição das frequências genotípicas de *CYP1A1m2* entre as populações caso e controle. 57

Tabela 15. Número de indivíduos com ou sem genótipos considerados de risco e respectivas *Odds Ratio* (OR), Intervalo de Confiança 95% (IC 95%) e valor de *p* para a variante *CYP1A1m2* nos grupos caso e controle. 57

Tabela 16. Polimorfismo dos genes relacionados com o metabolismo e detoxificação de xenobióticos em doenças tiroideanas. 60

Tabela 17. Distribuição das frequências genotípicas para *GSTM1* e *GSTT1* entre as populações caso e controle. 61

Tabela 18. Análise polimórfica de GSTM1 e GSTT1 e respectivas *Odds Ratio* (OR), Intervalo de Confiança 95% (IC 95%) e valor de *p* nos grupos caso e controle. 62

Tabela 19. Distribuição das frequências alélicas entre as populações de pacientes e controle. 63

Tabela 20. Distribuição das frequências genotípicas entre as populações de pacientes e controle. 64

Tabela 21. Análise polimórfica de $TP53^{72}$ e respectivas taxas de *Odds Ratio* (OR), Intevalo de Confiança 95% (IC 95%) e valor de *p* nos grupos caso e controle. 65

Tabela 22. Polimorfismo de $TP53^{72}$ associado ao câncer de tiróide. 66

Tabela 23. Distribuição do polimorfismo do gene $TP53^{72}$ em pacientes com carcinomas tiroideanos para os genótipos RR, RP e PP, nos grupos casos e controle de artigos publicados entre 2000 a 2009 e os dados do presente estudo. 68

Tabela 24. Distribuição do polimorfismo do gene *TP53,* RR x RP e PP, em casos e controles dos artigos publicados entre 2000 a 2009 e os dados do presente trabalho. 71

Lista de Anexos

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética na Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG). 88

Anexo 2. Protocolos Laboratoriais. 91

Anexo 3. Dados brutos, idade sexo, tipo de nódulo e análise do polimorfismo genético. 93

Resumo

Os nódulos da tiróide são comuns na prática clínica e a incidência do câncer de tiróide tem sido reconhecida em várias partes do mundo. Certamente, um importante fator para o aumento da incidência é a utilização dos exames ultra-sonográficos e PAFF. A identificação de polimorfismos genéticos é importante para compreender os mecanismos potenciais envolvidos na carcinogênese tiroideana. Nossa proposta foi avaliar o polimorfismo das enzimas do metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*) e do gene *TP53* no códon 72 e a associação destes com o risco de desenvolvimento do câncer da tiróide. Para avaliar o papel de tais polimorfismos, 122 casos de nódulos tiroideanos, destes, 35 apresentaram nódulos neoplásicos malignos (NNM), 20 nódulos neoplásicos benignos (NNB) e 67 nódulos não neoplásicos (NNN) comparados ao grupo controle de 134 indivíduos saudáveis, os quais foram selecionados aleatoriamente. Para a análise dos genótipos de *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* foi utilizado PCR – RFLP, na análise das deleções de *GSTM1* e *GSTT1* utilizou-se a técnica PCR-multiplex e para a determinação do polimorfismo do gene $TP53^{72}$ as amostras foram submetidas à reação de PCR. Foi incluído na análise do polimorfismo de $TP53^{72}$, uma meta-análise de estudos caso-controle com pacientes com carcinomas tiroideanos utilizando o método de *DerSimonian-Laird*. Os resultados demonstraram que o genótipo homozigoto selvagem de *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* foram freqüentes tanto nos nódulos tiroideanos neoplásicos e não neoplásicos quanto no grupo controle, sugerindo que os mesmos não estão associados ao risco de desenvolvimento de nódulos tiroideanos. O genótipo nulo para o gene *GSTT1* foi predominante em nódulos benignos em comparação ao grupo controle (p<0,005), indicando que o mesmo contribui a uma predisposição aumentada para doença tiroideana benigna do que para maligna. A análise de risco por *Odds Ratio*, sugere que os pacientes que apresentam genótipos de risco *GSTM1* (OR=12,82; p=0,004) e *GSTT1* (OR=4,53; p<0,0001) contribuem para o desenvolvimento de NNB e NNN, respectivamente. A frequência do alelo *p53Arg* foi significativamente maior em ambos os grupos de pacientes e grupo controle. A comparação da frequência genotípica dos pacientes NNM, NNB e NNN com o grupo controle demonstrou que genótipo *p53Arg Arg* apresenta menor risco para NNM, sugerindo que a presença do alelo arginina em homozigose possua um efeito protetor contra a carcinogênese tiroideana (OR:0,15; p<0,0001). Os dados gerados pela meta-análise demonstraram que a relação entre o genótipo e o fenótipo originado do polimorfismo de $TP53^{72}$ não está associada à susceptibilidade genética ao câncer de tiróide. A alta incidência de patologias da tiróide entre as mulheres é uma característica complexa a ser compreendida. Assim, fatores como o desequilíbrio dos hormônios sexuais, nutricionais especialmente a carência de iodo na dieta, exposição terapêutica à radiação, falhas nos sistemas de controle do ciclo celular e o polimorfismo genético poderiam explicar o aumento da incidência de doença tiroideana em mulheres. Embora, as variações interindividuais na susceptibilidade às doenças da tiróide poderiam indicar novas perspectivas para o diagnóstico precoce e prognóstico, o perfil polimórfico requer estudos adicionais.

Palavras-chaves: polimorfismo; susceptibilidade; carcinomas tiroideanos

Abstract

Thyroid nodules are common in clinical practice and the incidence of thyroid cancer is increasing throughout the world. Certainly, an important factor for the increase of the incidence is the use of ultrasound and PAFF. The identification of genetic polymosphism is important for understanding the potential mechanisms involved in thyroid carcinogenesis. We hypothesized that polymorphisms of xenobiotic enzyme system (*CYP1A1, GSTM1* and *GSTT1*) and the common germline polymorphism of *TP53* gene at codon 72 may be associated with the risk of thyroid cancer. To evaluate the role of such polymorphisms, we investigated 122 cases of thyroid nodules, classified according to the following: 35 malignant neoplasic nodules (MNN), 20 benign neoplasic nodules (BNN) and 67 non-neoplasic nodules (NNN) compared with 134 controls of the healthy individuals randomly selected. The PCR-RFLP was used in the analysis of the *CYP1A1m1* and *CYP1Am2* genotypes; the multiplex PCR was used in the deletion analysis of the *GSTM1* and *GSTT1*; and for the determination of the polymorphism in the gene $TP53^{72}$, the samples were submitted to conventional PCR reaction. We included case-control studies that compare the incidence of germline polymorphism of $TP53^{72}$ in patients with thyroid cancer by *DerSimonian-Laird* method. Our results demonstrated that *CYP1A1m1* and *CYP1A1m2* genotypes were frequent not only as neoplasic thyroid nodules and non-neoplasic thyroid nodules but also in the control group, which suggests that those are not associated with thyroid nodules. The null genotype for the *GSTT1* gene was predominant in benign nodules compared with the control group (p<0,005) indicated that individuals that possess such null genotypes presented a predisposition to benign thyroid diseases than malignant. The risk analysis, done by *Odds Ratio*, suggests that the risk genotypes *GSTM1* (OR=12,82; p=0,004) and *GSTT1* (OR=4,53; p<0,0001) contribute to the development of the BNN and NNN, respectively. The frequency of the p53 Arg allele was significantly higher in both patient and control groups. The genotype *p53Arg Arg* presents a lower risk to thyroid cancer, indicating that the allele arginine in homozygosis can present a protective effect against thyroid carcinogenesis (OR: 0.15; p<0.0001). The data of the meta-analysis demonstrates that the relation between the genotype and phenotype from the $TP53^{72}$ polymorphism is not associated with the genetic susceptibility at thyroid cancer. The high incidence of thyroid pathologies among women is a characteristic not completely understood. Therefore, some factors, such as the imbalance of sexual hormones; nutritional deficiencies, especially in iodine; therapeutic exposure to radiation; failures in the control systems of the cellular cycle; and the genetic polymorphism could explain the high incidence of thyroid disease among women. Although the interindividual variation in the susceptibility to thyroid diseases could indicate new perspectives to an early diagnostic and prognostic, the polymorphic profile requires additional studies.

Key-words: polymorphism, susceptibility; thyroid cancer

1.Introdução

1. Introdução

Os nódulos tiroideanos são freqüentes na população e sua incidência e prevalência são dependentes de diversos fatores (Lima e*t al.,* 2007), tais como a idade dos pacientes, localização geográfica e o método de diagnóstico. Um nódulo de tiróide palpável pode ser diagnosticado em 4 a 7% da população adulta (Dean & Gharib, 2008; Hegedüs, 2004; Matsuo *et al*., 2004). Quando se consideram séries de autópsia, essa prevalência pode chegar a 50%. Apesar de comuns, apenas 5% do total de nódulos são malignos (Coeli *et al.,* 2005).

Uma tendência no aumento da incidência do câncer de tiróide tem sido reconhecida em várias partes do mundo (Reis *et al*., 2008). Certamente, um importante fator para o aumento é a melhoria na capacidade de identificar malignidade em nódulos tiroideanos, proporcionada principalmente pela ampla disponibilidade de exames ultra-sonográficos e pela citologia de material obtido por punção aspirativa com agulha fina (PAAF) (Dean & Gharib, 2008; Ward, 2005; Matsuo *et al*., 2004).

O câncer da tiróide é responsável por 1% de todos os tumores malignos, sendo três vezes mais frequente em mulheres (Fagin & Mitsiades, 2008;Kent *et al.,* 2007; Sywak *et al.,* 2004). As estimativas das taxas de incidência padronizadas para a população mundial, no sexo feminino foi 5,5/100.000 nas regiões desenvolvidas e de 2,6/100.000 nas regiões menos desenvolvidas e para homens foram 2,1/100.000 e de 1,0/100.000, para cada uma das regiões respectivamente. As taxas de mortalidade padronizadas para a população mundial foi 0,5/100.000 nas regiões desenvolvidas e de 0,8/100.000 nas regiões menos desenvolvidas (Coeli *et al.,* 2005).

No Brasil, o Sistema de Informações sobre Mortalidade (FUNASA, 2001) e os Registros de Câncer de Base Populacional (RCBPs) (INCA, 2002) representam fontes de dados de grande importância para o conhecimento do perfil epidemiológico do câncer no país. O câncer de tiróide teve sua maior incidência em São Paulo (13,54/100.000), seguido por Natal (12,45/100.000), Fortaleza (9,75/100.000) e Distrito Federal (9,50/100.000). Em Goiânia, essa taxa foi 7,14/100.000 para o gênero feminino (Curado & Martins, 2006).

Neste contexto, observa-se que o número de casos de câncer da tiróide na população brasileira tem aumentado nos últimos anos. No período de 1988 a 2003, o Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP) de Goiânia-GO notificou 613 casos, sendo 83% para o sexo feminino e 17% para o sexo masculino. Os coeficientes de

incidência padronizados para o gênero feminino foram 4,89/100.000 no primeiro qüinqüênio, 4,72/100.000 no segundo e 11,67/100.000 no último quinquênio (Reis *et al.,* 2008). O aumento da incidência dos tumores tiroideanos na região metropolitana de Goiânia - GO pode está relacionado provavelmente com a melhora no diagnóstico.

As doenças da tiróide manifestam-se através da disfunção hormonal, seja por excesso ou por deficiência de produção hormonal, ou por alterações anatômicas decorrentes do crescimento difuso ou nodular da glândula (Bufalo, 2007). A doença nodular tiroideana é um problema clínico comum, que inclui um grande número de tiroidopatias, especialmente aquelas relacionadas à carência de iodo, tais como o bócio colóide e as neoplasias (Lima *et al*., 2007).

Dentre as tiroidopatias, a doença nodular por bócio colóide é a mais freqüente (Lima *et al.,* 2007; Hegedüs *et al.*, 2003), correspondendo a um problema clínico comum no Estado de Goiás e que apresenta etiologias diversas. O bócio endêmico representa, uma das endemias alimentares específicas mais difundidas. Em alguns países, o bócio endêmico corresponde a um sério problema de saúde pública, não somente pela extensão com que atinge certos grupos populacionais como, também, pelas sérias conseqüências que dele advêm (Lima *et al.,* 2007).

As doenças autoimunes tiroideanas (DAIT) afetam de 2 a 5% da população geral, em especial mulheres adultas e idosas. Este grupo de doenças tiroideanas é determinado pela presença de infiltrado linfocítico de intensidade variável e produção de auto-anticorpos tiroideanos dirigidos a antígenos específicos, podendo variar do hiper ao hipotiroidismo. A exata etiologia das DAIT permanece desconhecida, mas a interação entre susceptibilidade genética e fatores ambientais parece ser de fundamental importância no seu desenvolvimento (Sgarbi & Maciel, 2009).

Muitas doenças complexas são determinadas por três fatores principais: o estilo de vida, a exposição ambiental e a susceptibilidade genética. A predisposição genética é provavelmente predominante, e responsável por, aproximadamente, 80% da susceptibilidade à DAIT (Sbargi & Maciel, 2009). Por outro lado, estudos epidemiológicos estimam que cerca de 90% dos cânceres estejam relacionados a fatores ambientais (Guembarovski, 2007).

1.1. Patogênese molecular dos carcinomas tiroideanos

A tumorigênese está associada ao acúmulo progressivo de alterações genéticas em uma célula normal. Em geral, as alterações genéticas resultam na perda do controle

da proliferação e na aquisição de características associadas com a progressão tumoral. Assim, o câncer pode ser considerado uma doença genética complexa que resulta de alterações sequenciais em genes geralmente relacionados à proliferação e diferenciação celular (Parmigiani & Camargo, 2004).

As recentes descrições das alterações genéticas relacionadas aos carcinomas de tiróide, iniciaram a caracterização da patogênese molecular dos carcinomas tiroideanos e seus subtipos. As desordens genéticas dos tumores da tiróide envolvem vias heterogêneas de patogênese, tais como: mutações que ativam a sinalização celular, anormalidades dos genes supressores de tumores e das proteínas reguladoras do ciclo celular (Fagin & Mitsiades, 2008; Vasko *et al.,* 2004).

Fatores positivamente associados às neoplasias tiroidianas são: a exposição da região da cabeça e pescoço à radiação ionizante, a história pessoal de bócio, a presença de nódulo tiroideano e a ocorrência de antecedentes familiares (Coli *et al.*, 2005; Maciel *et al.*, 2005). As neoplasias da tireóide são classificadas de acordo com o tipo histológico em adenoma folicular, carcinoma papilar, carcinoma folicular e carcinoma anaplásico ou indiferenciado (Di Cristofaro *et al.*, 2006; DeLellis *et al.*, 2004). As maiorias dos tumores tiroidianos, com exceção do carcinoma medular derivam da célula folicular, que origina neoplasias benignas e malignas com diferentes características fenotípicas, biológicas e clínicas (DeLellis *et al.,* 2004) [Figura 1].

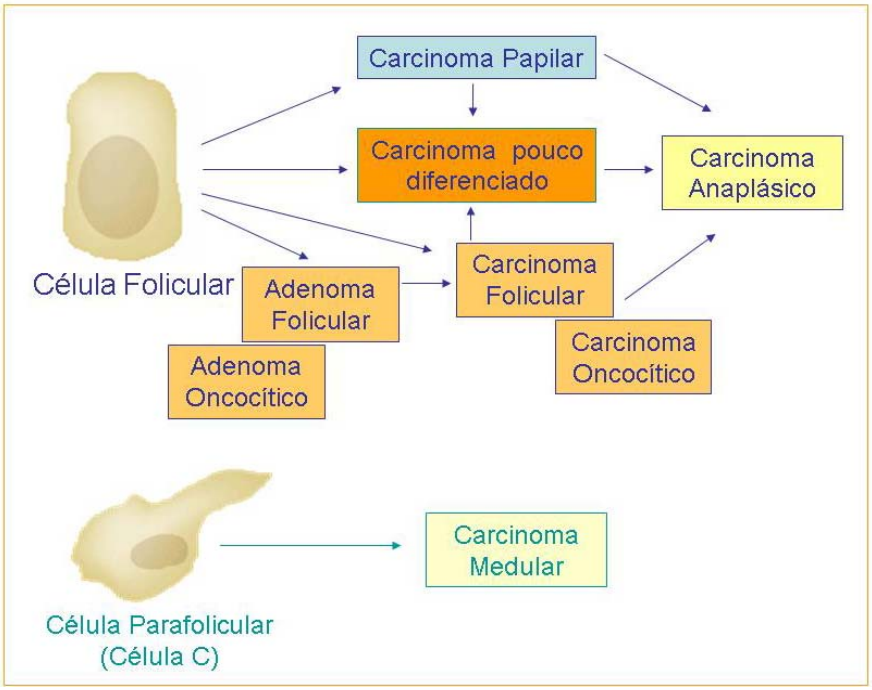

Figura 1. Representação esquemática da origem e de progressão dos carcinomas tiroideanos. O adenoma e carcinoma oncocítico são variantes do adenoma e do carcinoma folicular, respectivamente.

Os carcinomas papilífero (CPT) e folicular (CFT) são considerados carcinomas diferenciados (CDT), uma vez que mantêm uma semelhança estrutural e funcional com o tecido tireoidiano normal e são responsáveis por pelo menos 94% dos carcinomas de tireóide (Kent *et al.,* 2007; Cooper *et al*., 2006). O carcinoma medular (CMT) de tireóide, tumor neuroendócrino originário das células parafoliculares, corresponde a 3% dos casos, e o carcinoma anaplásico (CAT), que deriva da indiferenciação dos CDT é responsável por aproximadamente 1% dos carcinomas da tireóide (Cooper *et al*., 2006; DeLellis *et al.,* 2004). O comportamento biológico destes tumores é muito variado, compreendendo formas de baixo potencial letal até formas extremamente agressivas e de alta mortalidade (Golbert *et al.,* 2005).

O CDT quando precocemente diagnosticado é um tumor geralmente curável. O tratamento considerado mais adequado é a tiroidectomia total seguida de ablação actínica com I^{131}, que oferece ao paciente um prognóstico muito bom, com sobrevida longa (Cooper *et al*., 2006). Após a cirurgia e a radioterapia, os pacientes são tratados com levotiroxina, visando reduzir os níveis séricos de hormônio estimulante da tiróide (TSH) para minimizar o crescimento de qualquer tumor residual. Pesquisa de corpo inteiro (PCI) e medidas de tiroglobulina (Tg) sérica são usadas para monitorar os pacientes. Embora esta abordagem terapêutica proporcione uma sobrevida que atinge 93-98% e 85-92% dos carcinomas papilares e foliculares, respectivamente (Ward, 2005).

O CDT quando precocemente diagnosticado é um tumor geralmente curável. O tratamento considerado mais adequado é a tiroidectomia total seguida de ablação actínica com I^{131}, que oferece ao paciente um prognóstico muito bom, com sobrevida longa (Cooper *et al*., 2006). Após a cirurgia e a radioterapia, os pacientes são tratados com levotiroxina, visando reduzir os níveis séricos de hormônio estimulante da tiróide (TSH) para minimizar o crescimento de qualquer tumor residual. Pesquisa de corpo inteiro (PCI) e medidas de tiroglobulina (Tg) sérica são usadas para monitorar os pacientes. Embora esta abordagem terapêutica proporcione uma sobrevida que atinge 93-98% e 85-92% dos carcinomas papilares e foliculares, respectivamente (Ward & Assumpção, 2004).

O CAT é considerado incurável por ocasião de sua apresentação. O PAFF é adequado para o diagnóstico e deve-se tentar a tiroidectomia total com a retirada do tumor em bloco e dissecção do pescoço para a remoção total da massa. A

quimioterapia utiliza uma série de drogas, mas nenhuma se revelou completamente eficaz (Golbert *et al.,* 2005).

O tratamento apropriado para o CMT é a tiroidectomia total. A retirada de todo o tecido tiroideano deve ser meticulosa, sem lesar as paratireóides. Além disso, recomenda-se a dissecção profilática dos linfonodos da região do pescoço.

1.1.1. Carcinoma Papilar

Nesses tumores papilíferos são verificadas translocações e inversões cromossômicas que causam o rearranjo do gene *RET* com genes heterólogos, dando origem, ao gene quimérico *RET/PTC* e as mutações ativadoras, como translocações no gene *BRAF* e no gene *RAS* (Gao *et al*., 2006; Nix *et al.,* 2005; Maciel *et al.,* 2005). Mutações nos genes *RET, RAS* ou *BRAF* são encontradas em aproximadamente 70% dos carcinomas papilíferos, sugerindo que a sinalização para a ativação de proteínas quinase MAPK (de proteínas quinases ativadas por mitogênicos; do inglês, *mitogen-activated protein kinases*) são essenciais para a tumorigênese e que a alteração de um simples efetor na via MAPK é suficiente para a transformação celular (Espinosa *et al*., 2007; Wojciechowska & Lewinski, 2006).

BRAF é uma das isoformas do tipo B da proteína RAF, correspondendo a um componente essencial da via RAS-MEK-MAPK, que atua como efetor da sinalização RAS (Matsuo *et al*., 2004). As mutações no gene *BRAF* são as alterações genéticas mais comumente conhecidas nos carcinomas papilíferos e são encontradas em aproximadamente 45% destes tumores (Nikiforov, 2008; Espinosa *et al*., 2007; Wojciechowska & Lewinski, 2006). A maioria das mutações envolve o nucleotídeo 1799 e resulta na substituição de valina pelo ácido glutâmico no resíduo 600 (V600E). A substituição confere capacidade oncogênica, correlacionando-a com agressão tumoral (Nikiforov, 2008; Espinosa *et al.*, 2007; Xing, 2007; Suk *et al*., 2006).

O mecanismo subjacente à oncogeneidade induzida pela substituição V600E parece promover uma atividade constitutiva de BRAF quinase, resultando na contínua fosforilação da via MEK [do inglês, *Mitogen activated protein kinase* (MAPK) / *Extracelluar signal-regulated kinase*]. Proteínas quinases ativadas por mitogênicos regulada por sinal extracelular, transferem sinal para o núcleo celular ao longo da cascata RAS-MEK-MAPK, a qual desempenha um papel importante na sinalização da proliferação celular induzida por fatores de crescimento, que atuam por meio de

receptores serina/treonina quinase, mecanismo recentemente elucidado (Nikiforov, 2008; Espinosa *et al*., 2007; Wojciechowska & Lewinski, 2006; Puxeddu *et al*., 2003) [Figura 2].

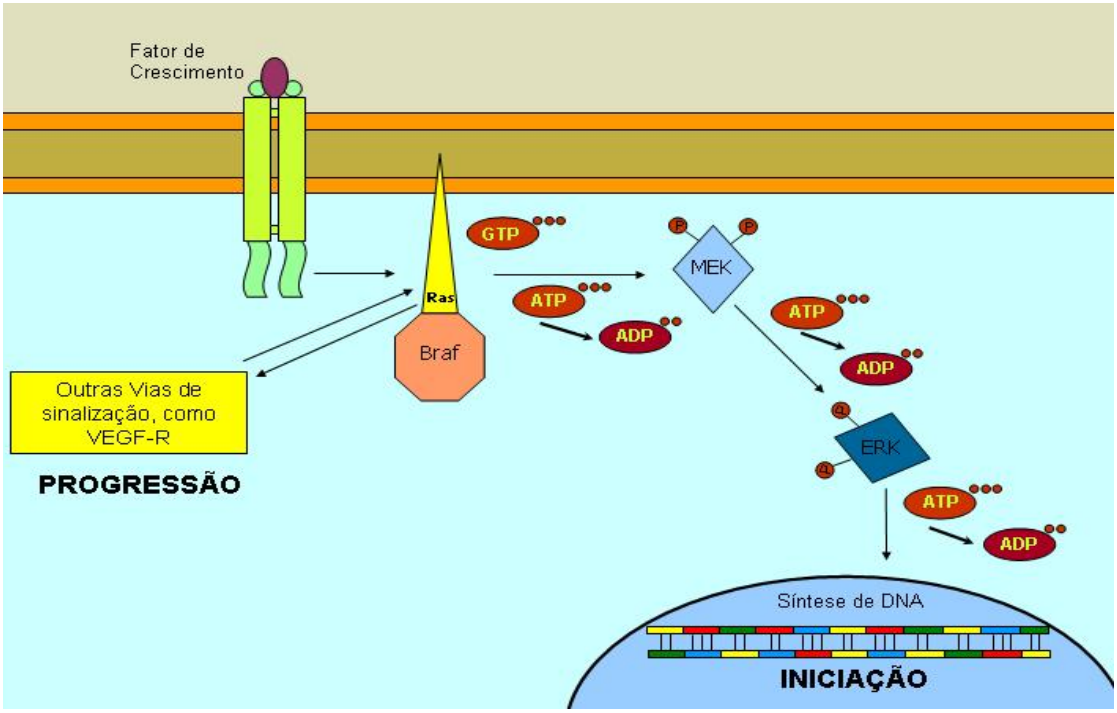

Figura 2. A via RAS-MEK-MAPK (BRAF). Ativação de ERK desempenha papel central na sinalização da proliferação celular induzida por fatores de crescimento que atuam por meio de receptores proteínas serina/treonina quinase. A ativação de RAs fosforila uma segunda proteína quinase MEK que ativa membros da família ERK por fosforilação, uma vez ativada, ERK fosforila vários alvos, incluindo outras proteínas quinases e fatores de transcrição, como os elementos necessários para a proliferação celular.

A expressão de uma proteína de sinalização constantemente ativada é interpretada pela célula como um sinal contínuo e irrestrito de indução de crescimento (Rocha & Regner, 2004). As vias de sinalização celular ativadas por estimulação dos fatores de crescimento regulam a maquinaria do ciclo celular, como a via MAPK (Cooper, 2001). A qual pode implicar em desenvolvimento e progressão da proliferação celular, mediante a mutação em genes que codificam as proteínas quinases, promovendo um efeito positivo no crescimento celular por mimetizar sinais mitogênicos normais. Esta e outras vias envolvidas na proliferação e diferenciação celular são alvo para a farmacologia, como as drogas que atuam na inibição de MEK, usadas como terapia para controle do câncer (Knauf & Fagin, 2009; Nikiforov, 2008).

As ERKs ativadas afetam a transcrição gênica via interação com fatores de transcrição, cuja função no núcleo é dirigir a expressão de genes específicos. Fatores de transcrição podem ser regulados de duas formas principais: através da fosforilação

de fatores pré-existentes com ativação da transcrição ou aumento na produção dos próprios fatores de transcrição. Vários destes fatores de transcrição mais conhecidos por essa característica são: FOS, JUN e MYC. O gene *MYC,* se destaca por seu papel na tumorigênese, enquanto os genes FOS e JUN são mais associados com a transformação celular (Rocha & Regner, 2004). A ativação da via RAS-MEK-MAPK nos CPTs está relacionada a tumorigênese em aproximadamente 70% .

A ativação de outras vias de sinalização que cooperam com MAPK estão relacionadas a progressão tumoral nos CPTs, como o receptor de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-R) [Figura 2]. A elevada expressão dos fatores de crescimento endotelial e vascular C e D (VEGF-C e VEGF-D) tem sido observada em diversos cânceres (Ran *et al.*, 2009; Royston & Jacson, 2009; Lin, 2007). Estudos avaliando o nível de expressão do gene *VEGF-C* em tumor primário associam com a linfangiogênese e metástases para linfonodos, sendo a expressão destas proteínas usadas como fator de prognóstico em muitos carcinomas (Iwata *et al*., 2007).

Inúmeros marcadores moleculares, ciclina D, p53, VEGF e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) por imunohistoquímica são utilizados para estabelecer diagnóstico e prognóstico em carcinomas tiroideanos (Jo *et al*., 2006). Estudos epidemiológicos demonstram que inibidores de COX-2, como o ácido acetil salicílico, podem reduzir o risco do desenvolvimento de alguns tipos de cânceres (Knauf & Fagin, 2009). Adicionalmente, a elevada expressão do gene COX-2 está relacionada ao processo inflamatório e estímulo mitogênico comumente encontrado em muitos tumores, sugerindo que COX-2 contribua no processo da carcinogênese (Iwata *et al*., 2007).

Diversos mecanismos propostos têm relatado que COX-2 contribui na progressão tumoral, incluindo o estímulo da proliferação, inibição da apoptose, estímulo da invasão celular, supressão da resposta imune e angiogênese (Iwata *et al*., 2007). Adicionalmente, COX-2 estimula a proliferação celular, pela migração e formação de células vasculares endoteliais (Liu *et al.*, 2009; Iwata *et al*., 2007; Tunstall *et al.,* 2006; Siironen *et al.,* 2004). Apesar desta co-relação, poucos estudos clínico-moleculares avaliam o nível de expressão de COX-2 e sua extensão com a angiogênese nos tumores tiroideanos pela co-expressão com VEGF-C (Siironen *et al*., 2006). No entanto, o mecanismo da linfangiogênese e angiogênese tumoral ainda possui pouco entendimento.

1.1.2. Carcinoma Folicular

No CFT, são destacadas as mutações ativadoras do gene *RAS* e rearranjo *PAX8-PPARγ*. As mutações de ponto descritas em *RAS* também são frequentemente encontradas em adenomas foliculares, e é provável que pelo menos uma parte dos carcinomas foliculares teve sua origem maligna em conseqüência de adenoma folicular (Fagin & Mitsiades, 2008).

Existem 3 famílias do oncogene *RAS* (*K-RAS*, *H-RAS* e *N-RAS*) com localizações cromossômicas diferentes. Em geral o *N-RAs* e com menor frequência o *H-RAS*, estão mutados no códon 61 (Nikiforov, 2008). Essas mutações ocorrem frequentemente nas formas precoces dos tumores da tiróide e esta ativação também é encontrada na tiróide adjacente aos nódulos neoplásicos e parece participar do bócio adenomatoso. Até o momento não se conseguiu atribuir prognóstico significativo às mutações de *RAS* (Mishra *et al*., 2009; Castro, 2006).

O rearranjo *PAX8-PPARγ* foi descrito inicialmente apenas nos carcinomas foliculares, sugerindo que pudesse ser um marcador nuclear de malignidade nas neoplasias foliculares. Posteriormente, também foi identificado nos adenomas foliculares, mas permanece como um dos aspectos moleculares que caracterizam as neoplasias foliculares (Castro, 2006).

A alteração genética decorre de uma translocação t(2;3)q(13;p25) que resulta na fusão de *PAX8* (do inglês, *Paired box gene 8*), o qual codifica um fator de transcrição da tiróide com o gene *PPARγ* (do inglês, *Peroxisome proliferation activated receptor-gama*). As células foliculares normais possuem alta expressão do gene *PAX8*, pois seu produto é essencial para o desenvolvimento da glândula endócrina e para a regulação do funcionamento celular (Castro, 2006). O produto da expressão do gene *PPARγ* está envolvido na inibição do crescimento e na promoção da diferenciação celular nas células foliculares normais . O rearranjo dos dois genes elimina a função de ambos, sendo que esta perda parece favorecer a tumorigênese no tecido tiroideano (Nikiforov, 2008).

Adicionalmente, mutações e outras alterações na codificação de genes da via de sinalização PI3K/AKT são descritas nos CFT (DeLellis, 2004). Embora, a frequência destas mutações seja baixa e seu valor biológico carece elucidação. As mutações de ponto descrita em *RAS* também são frequentemente encontradas em adenomas foliculares, e é provável que pelo menos uma parte dos carcinomas foliculares teve sua origem maligna em conseqüência de adenoma folicular (Fagin & Mitsiades, 2008).

1.1.3. Carcinomas pouco diferenciado e Anaplásico

O carcinoma pouco diferenciado é um tumor raro da tiróide que se origina de células foliculares e é caracterizado pela perda da diferenciação e comporta-se como o mais agressivo de todos os tumores tiroideanos e possui prognóstico menos favorável em comparação com CPT ou CFT (Volante *et al*., 2007). Em amostras de tiroidectomia destes carcinomas, é freqüente encontrar áreas de carcinomas diferenciados. Isto sugere que estes tumores possam representar etapas distintas na progressão maligna: carcinoma bem diferenciado derivado de células foliculares → carcinoma pouco diferenciado (CPDT) → carcinoma anaplásico ou indiferenciado (CAT) [Figura 1]. Em conformidade com tal progressão, algumas alterações moleculares podem ser consideradas: na indiferenciação precoce (CPDT) são encontradas mutações em *RAS* e *BRAF* em todos os níveis desta etapa e na indiferenciação tardia (CIT) ocorrem com frequência mutações em *TP53* (Maciel *et al*., 2005; Nikiforov, 2004).

1.1.4. Carcinoma Medular

É um tumor maligno raro com origem nas células C parafoliculares, que representa 3 a 10% de todos os tumores tireoidianos e é responsável por um grande número de mortes em pacientes portadores de câncer de tireóide (Magalhães *et al*., 2003; Raue *et al*., 1994). Ocorrendo de forma esporádica ou não-hereditária em 75 a 90% dos pacientes. Nos demais, é uma doença hereditária autossômica dominante com alto grau de penetrância e variabilidade de expressão podendo fazer parte de 3 síndromes clínicas distintas dependendo dos órgãos envolvidos: neoplasia endócrina múltipla (NEM) 2A, NEM 2B e CMT familiar (CMTF). Das formas hereditárias, a NEM 2A é a mais comum, representando mais de 90% dos casos de NEM do tipo 2 (Machens *et al*., 2003).

O proto-oncogene *RET* possui 21 éxons de aproximadamente 60kb e está localizado em 10q11.2 (53). Codifica um receptor de membrana do tipo tirosina-quinase de 150-170Kd altamente expresso em alguns tecidos normais e tumores derivados da crista neural, tais como sistema nervoso entérico, porção medular da glândula adrenal e células parafoliculares da tireóide (Machens *et al*., 2003). A proteína RET realiza a transdução de sinais extracelulares de proliferação, crescimento, diferenciação, sobrevida das células e apoptose celular (Eng *et al*., 1996).

Em adição ao seu papel nas formas hereditárias do CMT, o proto-oncogene *RET* também tem sido implicado na patogênese dos tumores esporádicos. Mutações somáticas, isto é, mutações identificadas apenas no tumor, têm sido descritas em uma frequência bastante variável (23-69%) nos casos de CMT esporádico, afetando especialmente o códon 918 do *RET* proto-oncogene (éxon 16) e resultando na mesma substituição de aminoácidos da NEM 2B (metionina por treonina) (Pinchot *et al*., 2009).

Esta mutação parece não ser uniforme entre as várias subpopulações de células dentro de um mesmo tumor e mesmo de suas metástases, o que pode explicar a grande variabilidade de dados da literatura quanto à incidência deste tipo de mutação. Esta heterogeneidade entre as células tumorais de um mesmo paciente ainda sugere que o CMT possa ter uma origem policlonal, ou então que as mutações no proto-oncogene RET não sejam eventos iniciais na tumorigênese do CMT esporádico, mas sim de progressão (Nikiforov, 2008).

Estudos genético-moleculares realizados têm demonstrado o envolvimento do proto-oncogene *RET* na maioria das formas hereditárias de CMT e, em menor frequência, em sua forma esporádica (Machens *et al*., 2009). Entretanto, diversos estudos sugerem que pacientes com CMT esporádico e mutações somáticas no códon 918 apresentam maior agressividade tumoral e maior probabilidade de recorrência clínica do tumor, porém esta associação ainda não foi confirmada (Nikiforov, 2008). Magalhães *et al*. (2003) e Nikiforov (2008) descrevem que aproximadamente 1,4-15% dos pacientes com CMT aparentemente esporádico, apresentam sem história familiar com evidências de parentes de primeiro e segundo graus acometidos por CMT, apresentam hiperparatireoidismo, apresentam mutações, podendo corresponder a casos hereditários erroneamente diagnosticados como isolados, ou então a casos de mutações genômicas de novo do proto-oncogene *RET*.

1.2. Doenças tiroideanas

A identificação de genes suscetíveis para DAIT tem sido investigada, em geral, por meio de estudos populacionais caso-controle, comparando-se a frequência de determinado alelo entre as populações doente e sadia. Recentes avanços no entendimento da base genética da DAIT revelaram a participação de genes imunomoduladores e de genes específicos da tiróide como os principais candidatos,

mas, por enquanto, a maioria dos achados é de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) (Jacobson *et al.* 2007).

Os genes imunomoduladores de susceptibilidade DAIT, identificados e confirmados, são o complexo maior de histocompatibilidade (*MHC*), o antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico (*CTLA-4*), a molécula CD40 associada ao linfócito B e proteína tirosina fosfatase-22 (*PTPN22*). O gene específico, identificado como candidato natural seria o gene receptor do TSH (*TSHR*), mas alguns estudos têm rejeitado contundentemente esta hipótese, permanecendo indefinido se o gene *TSHR* é candidato real para susceptibilidade à DG (Brix *et al*., 2001). Em contraste existem evidências sólidas do envolvimento de polimorfismo no gene da Tireoglobulina (*TG*) como fator de risco para a DAIT. Estudos de triagem genômica observaram forte associação entre o cromossomo 8q24 (região que contém o gene *TG*) e a DAIT (Taylor *et al.,* 2006). Na Tabela 1 estão dispostos os principais genes candidatos a susceptibilidade de DAIT.

Tabela 1. Principais genes candidatos para a susceptibilidade de DAIT (adaptado Sgarbi & Maciel, 2008).

Genes Genes Imunomoduladores	Principais funções	Fenótipo associado
MHC	Modula a ligação a apresentação de antígenos	DG
CTLA-4	Inibidor da ativação dos linfócitos T	DG; TH
CD40	Ativação e proliferação dos linfócitos B	DG
PTPN22	Inibidor da ativação dos linfócitos T	DG; TH
Genes específicos		
TG	Codifica a tireoglobulina	DG; TH
TSHR	Codifica o TSHR	DG

MHC: Complexo maior de histocompatibilidade; *CTLA-4:* Antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico; MD40: molécula associada a célula β; PTPN22: proteína tirosina fosfatase-22; TG: tireoglobulina; TSHR: receptor do TSH; DG: Doença de Graves: TH: tiroidite de Hashimoto.

A predisposição genética é provavelmente predominante e responsável por, aproximadamente, 80% da susceptibilidade à DAIT, em que alelos do *MHC* e lócus não-MHC, como polimorfismo no gene *CTLA-4*, têm sido identificados como marcadores de susceptibilidade (Jacobson *et al.,* 2007). Por outro lado, pelo menos 20% da susceptibilidade seria determinada por fatores ambientais (Brix *et al.,* 2001), como tabagismo, estresse, infecção, selênio, iodo e drogas, entre outros (Prummel *et al.,* 2004).

1.3. Polimorfismos Genéticos

Considera-se polimorfismo genético o traço mendeliano existente em uma população em, no mínimo dois fenótipos, nenhum dos quais ocorrendo em frequência menor que 1% (Conforti, 2004; Wünsh-Filho *et al.,* 2002; Rossit & Conforti-Froes 2001). Os SNPs (do inglês*, Single Nucleotide Polymorphisms*) são variações de um único nucleotídeo que ocorrem entre as sequências de DNA dos indivíduos. Estas variações determinam as diferenças fenotípicas entre os indivíduos, ou seja, a individualidade genômica de cada um (Parmigiani & Camargo 2004).

A herdabilidade de uma neoplasia maligna é avaliada entre 5 a 10% de todos os cânceres humanos. Portanto, cerca de 90% dos casos correspondem a forma esporádica da doença, que resulta da associação entre os fatores ambientais e das variáveis que definem uma susceptibilidade genética ao desenvolvimento tumoral (Yuspa, 2000).

O processo de transformação de uma célula normal em uma maligna abrange várias etapas, envolvendo pelo menos de quatro a sete alterações genéticas. As principais anormalidades genéticas observadas no processo de carcinogênese incluem: expressão aumentada de proto-oncogenes (Nikiforov, 2008), inativação de genes supressores de tumor, instabilidades genômica, alteração nos genes de reparo do DNA (Pietsch *et al.,* 2006; Hoeijmakers, 2001), reativação da enzima telomerase, imunidade e quimio-resistência às drogas e alterações epigenéticas (Pietsch *et al.,* 2006; Rountree *et al.,* 2001).

A associação entre os polimorfismos metabólicos e a susceptibilidade ao câncer gera uma nova área de abrangêngência na oncogenética, a epidemiologia molecular. Os grandes avanços com o advento de tecnologias falicitam o entendimento da etiologia, susceptibilidade e terapia. Essas conquistas poderão trazer benefícios importantes para o diagnóstico precoce, tratamento e qualidade de vida dos pacientes. Além disso, o conhecimento do perfil polimórfico individual tem um potencial considerável na determinação de risco para o câncer, identificando grupos de indivíduos e auxiliando no estabelecimento de políticas de prevenção.

1.3.1. Polimorfismo das enzimas do metabolismo de xenobióticos

A maquinaria metabólica dos agentes xenobióticos inclui dois processos: o de ativação, mediado pelas enzimas oxidativas ou de Fase I, e o de detoxificação mediado

pelas enzimas conjugadas ou de Fase II (Marques *et al.,* 2006, Rybicki *et al.,* 2006 Santiago *et al.,* 2002; Sato *et al.,* 2000; Matthias *et al.*, 1998) [Figura 3]. Os indivíduos que carregam a forma mais ativa de uma enzima relacionada com a ativação dos carcinógenos e os alelos menos eficientes das enzimas de detoxificação, apresentam um maior risco para desenvolver câncer (González *et al.,* 1998).

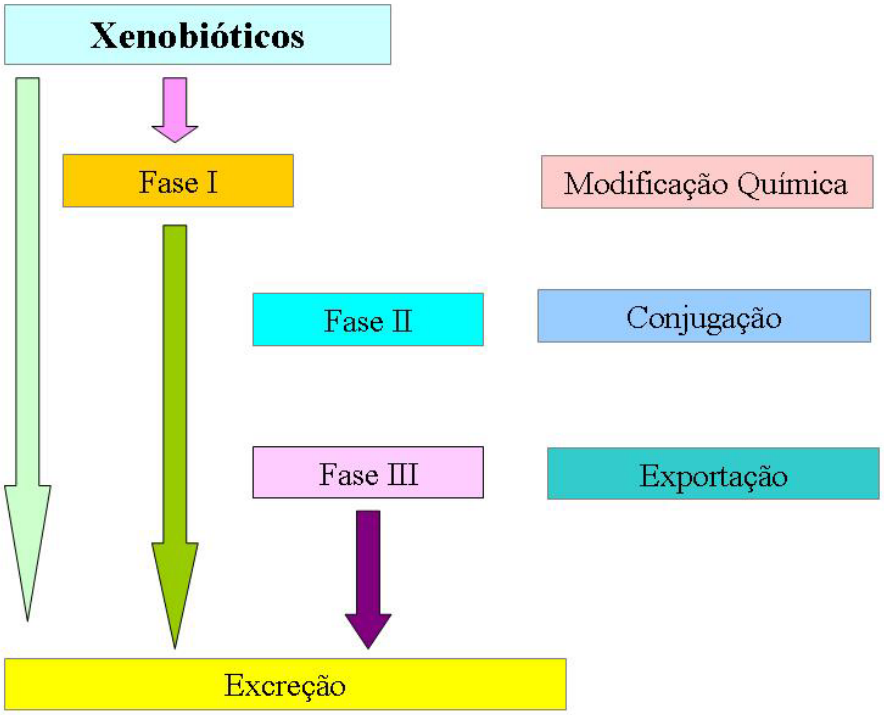

Figura 3. Sequência dos efeitos biológicos nas reações de biotransformações dos xenobióticos.

O estudo de variações individuais na capacidade de metabolização de xenobióticos já identificou inúmeros polimorfismos genéticos, sendo a maioria destes de relevância clínica (Leichsenring, 2005; Rossit & Conforti-Froes, 2000). Os polimorfismos metabólicos que têm sido associados de forma mais consistente ao aumento do risco de câncer incluem as enzimas da superfamília citocromo P450 (CYP450), as glutationa S-transferase (GST) e as N-acetiltransferase (NAT) (Guembarovski 2007; Leichsenring 2005; Jong *et al.,* 2002).

A maioria dos agentes carcinogênicos requer ativação metabólica antes de se ligarem às biomoléculas (DNA, RNA e proteínas) e as variações nos processos de ativação e detoxificação de compostos químicos desempenham papel crucial na tumorigênese ambiental (Nair & Pillai 2005; Nakajima *et al.,* 2001, Rossit & Conforti-Froes, 2001). Assim, vários polimorfismos de genes responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos também se relacionam com

o desenvolvimento do câncer. Entre os fatores envolvidos com a carcinogênese têm-se características genéticas relacionadas com o gênero, idade e síndromes de susceptibilidade familiar ao câncer (Silva Júnior, 2008).

1.3.1.1. Citocromo P450 (*CYP1A1)*

A superfamília de genes do *CYP450* codifica numerosas enzimas que catalisam várias reações químicas e metabolizam vários substratos exógenos e endógenos (Bufalo, 2007). Presume-se que no genoma humano existam em torno de 60 a 100 genes codificadores de enzimas CYP450, muitos deles envolvidos na codificação das enzimas que metabolizam compostos exógenos (Conforti, 2004).

Os substratos para CYP450 incluem: vitaminas, esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, carcinógenos ambientais, antioxidantes, solventes, anestésicos, corantes, pesticidas, derivados do petróleo, álcoois, entre outros (Conforti, 2004; Guengerich, 2000). Tais reações metabólicas ocorrem principalmente no fígado, podendo ocorrer também por todo o organismo incluindo intestino, pulmão, cérebro e rim, entre outros (Silva Júnior 2008; Bufalo *et al.,* 2006; Yun *et al.*, 1998) [Figura 4].

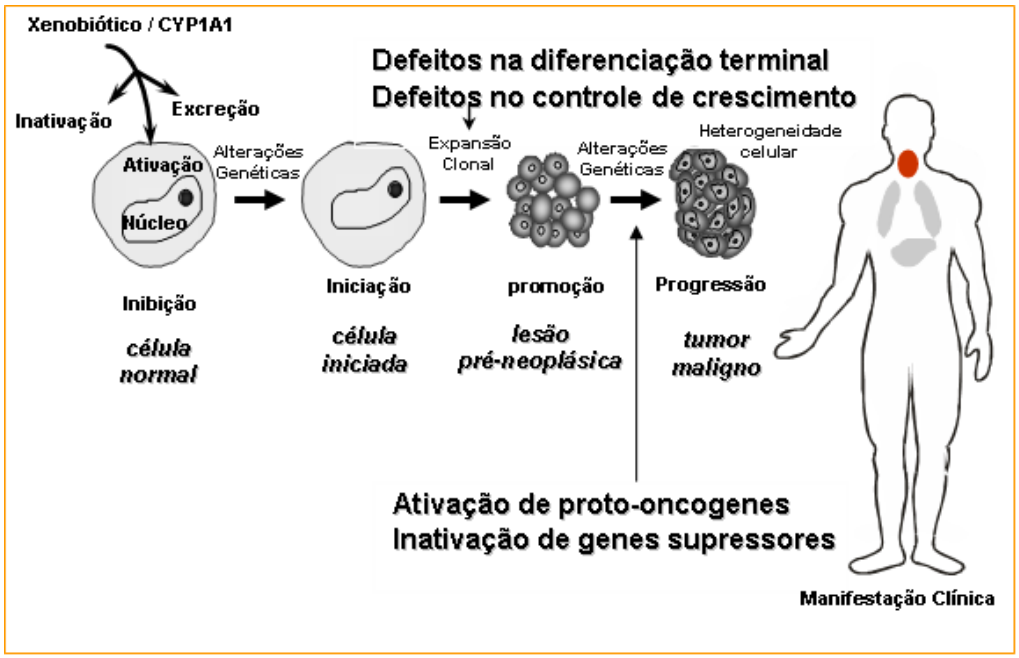

Figura 4. Mecanismo da carcinogênese (Adaptado de Ribeiro *et al.,* 2003).

As enzimas de CYP450 encontram-se presentes em animais, plantas, fungos e bactérias, sendo sua nomenclatura definida em 1993, no sentido de padronizar os nomes até então descobertos (Ingelman-Sundberg, 2001). E estão divididas em famílias denominadas: CYP1, CYP2 e CYP3 com base em sua relação evolutiva,

similaridade de sequência de nucleotídeos e de aminoácidos. As frequências das variantes alélicas da superfamília CYP450 diferem entre as etnias e, até o momento, as que parecem mais relevantes para a carcinogênese são as que envolvem os genes *CYP1A1, CYP2E1* e *CYP2D6* (Guembarovski, 2007).

O gene *CYP1A1*, localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q22-24) (Cascorbi *et al.,* 1996) codifica a isoforma *CYP1A1*, que catalisa a oxidação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em produtos fenolíticos e epóxidos (González, 1998). A indução de *CYP1A1* ocorre via ligação do composto indutor ao receptor aril-hidrocarbono (Ah) (Dalton *et al.,* 2000), que ativa a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização de xenobióticos. A bioativação de genes por vários HPAs é iniciada pela estimulação do receptor de Ah e este ativa a transcrição do *CYP1A1*, epóxido hidrolase e outras enzimas (Bufalo *et al.,* 2006; Masson *et al.,* 2005; Autrup, 2000; Hayashi *et al.,* 1991).

Quatro variantes foram descritas para o gene *CYP1A1* . Uma envolvendo a substituição de T3801C na extremidade 3' do gene (*CYP1A1m1*) resultando na formação de uma variante para o sítio de restrição (*MspI*) [Xing *et al.,* 2003; Duell *et al.,* 2002; Song *et al.,* 2001]; uma outra mutação gera a substituição de A2455G (*CYP1A1m2*) promovendo a troca de Ile462Val na região heme do éxon 7 (Hayashi *et al.,* 1991); uma mudança de aminoácido (Thr461Asn) gera a variante C2453A (*CYP1A1m4*) e uma substituição específica em T3205C (*CYP1A1m3*) no íntron 7 gera uma outra variante (Vineis *et al.,* 2004) [Figura 5]. A existência de diversas variantes já detectadas em *CYP1A1* ressalta a necessidade de verificação dos vários haplótipos, decorrentes das várias combinações e do possível impacto em que cada um deles atuam como moduladores da susceptibilidade ao câncer (Ferreira & Rocha, 2004).

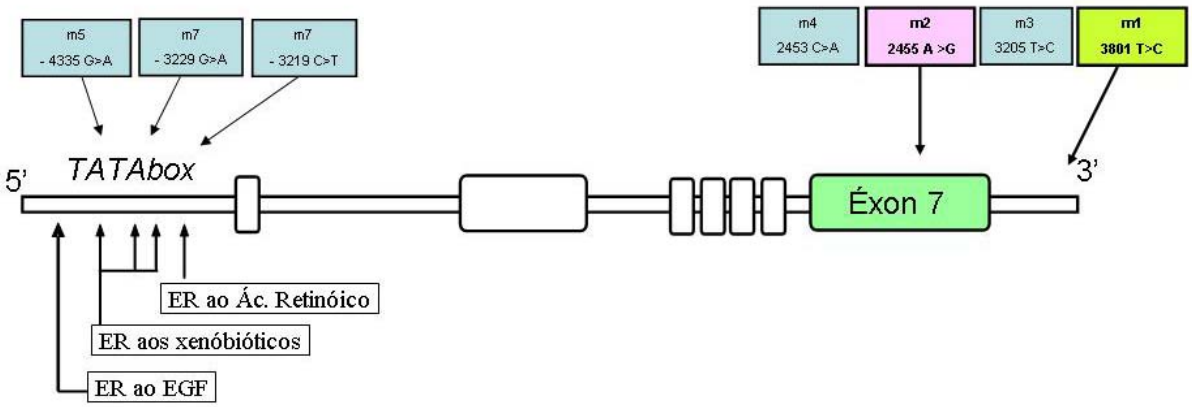

Figura 5. Estrutura atribuída ao gene *CYP450* [adaptado de Silva Júnior, 2008].

O polimorfismo *CYP1A1m1* originam os genótipos T/T, que representa o homozigoto selvagem, não portador do sítio de restrição *MspI* e os genótipos T/C e C/C, respectivamente, o heterozigoto e homozigoto mutante, em que o sítio de restrição encontra-se presente na terminação 3' (Conforti 2004, Duell *et al.,* 2002). Enquanto, o polimorfismo de *CYP1A1m2* apresenta como genótipo homozigoto mutante G/G (Val/Val), homozigoto selvagem A/A (Ile/Ile) e ao genótipo heterozigoto A/G (Ile/Val) [Duell *et al.,* 2002].

Os genótipos mutantes resultantes do polimorfismo do gene *CYP1A1* (*m1* e *m2*) levam a um aumento da atividade catalítica da enzima, podendo conferir uma susceptibilidade aumentada ao câncer por promover uma maior ativação de pro-carcinógenos, como o benzopireno, na fase I da biotransformação (Vineis *et al.,* 2004; Guembarovski, 2007). Os alelos *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* foram correlacionados a um aumento na susceptibilidade ao câncer de pulmão em população japonesa (Song *et al.,* 2001), porém tal associação não foi verificada em populações caucasóides ou afro-americanas (Hirvonen *et al.,* 1992). Esses achados não foram confirmados em estudos com caucasóides, provavelmente porque a prevalência dos alelos *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* é muito baixa nesta população. No Brasil, um aumento no risco do câncer de pulmão foi significativamente associado à presença do alelo *m2* (Song *et al.,* 2001).

Bufalo *et al.* (2006) demonstraram que o genótipo homozigótico selvagem de *CYP1A1m1* é mais frequente tanto em nódulos tiroideanos quanto em carcinomas papilíferos do que nos indivíduos-controle, sugerindo que a fumaça do cigarro e outros metabólitos dependentes da ativação de *CYP1A1* não estão implicados no risco para a formação de bócio nem no processo da malignidade tiroideana. Esta observação vai de encontro a outros estudos epidemiológicos que não foram capazes de associar a fumaça do cigarro com o câncer tiroideano, e a dados que mostram um risco relativo baixo de câncer de tiróide entre fumantes.

1.3.1.2. Sistema glutationa S-transferase

Considerada a principal enzima detoxificante da fase II, a GST desempenha um papel fisiológico na iniciação da detoxificação de potenciais agentes alquilantes, incluindo xenobióticos tóxicos e produtos reativos de processos intracelulares, como a peroxidação de lipídios. As GSTs formam uma família multigênica subdivididas com base em seu ponto isoelétrico e na sequência de aminoácidos: α, μ, π e θ. Cada uma contendo produtos de diferentes *locus* gênicos (Silva Júnior, 2008; Duarte, 2005).

A família destas enzimas é composta por proteínas diméricas solúveis e multifuncionais, que podem se conjugar a moléculas eletrofílicas tornando-as menos tóxicas. Sua maior concentração é observada no fígado, contudo, é encontrada também em outros órgãos, como pulmões e intestino delgado (Silva Júnior, 2008).

A classe μ, possui pelo menos 5 genes distintos para GSTM, os quais foram clonados e seqüenciados: *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5*. Todos os genes foram mapeados no braço curto do cromossomo 1. Dentre os genes desta família encontra-se o *GSTM1*, situado no lócus 1p13.1, que é polimórfico possuindo dois alelos funcionais (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*) e eficientes na atividade metabólica.

A proteína GSTM1A contém uma lisina na posição 172, enquanto a proteína GSTM1B contém asparagina na mesma posição. O gene *GSTM1* pode apresentar um polimorfismo genético caracterizado pela deleção total [Figura 6], resultando no genótipo homozigoto nulo GSTM1*0 (nulo 0/0), caracterizando um indivíduo sem atividade enzimática (Arruda *et al.,* 1998).

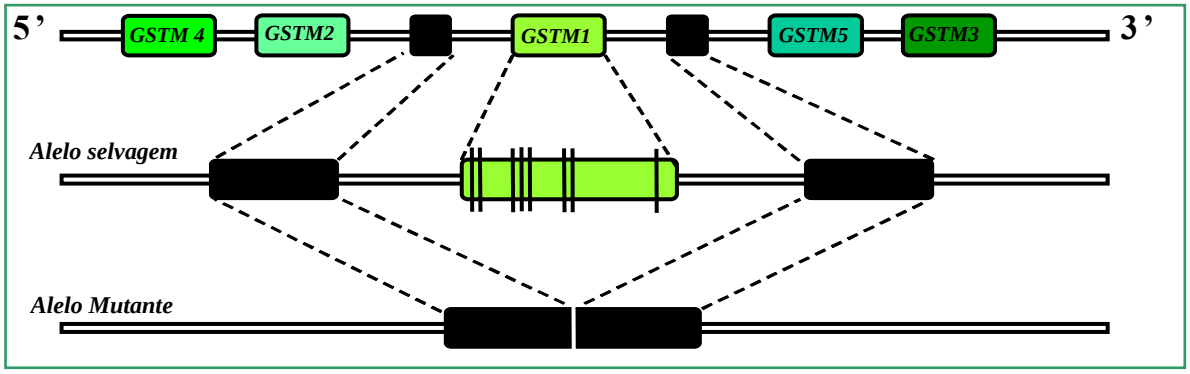

Figura 6. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe Mu de *GST*, no cromossomo 1, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTM1*. Adaptado de Silva Jr (2008).

A classe θ consiste em 2 genes, *GSTT1* e *GSTT2*, localizados no cromossomo 22q11.2 e separados por aproximadamente 50Kb. Ambos os genes possuem 5 éxons com divisões idênticas de íntro/éxon, mas seus produtos protéicos possuem apenas 55% da identidade nos aminoácidos que compõe suas estruturas primárias. Análises reveleram 2 regiões flanqueadoras (HA3 e HA5) contendo repetições idênticas de 403pb, que foram identificadas como regiões deleção/junção do genótipo nulo (Sprenger *et al.*, 2000) [Figura 7]. Estudos demonstram que 20 a 60% dos indivíduos não expressam esta enzima, devido à deleção gênica (Bufalo *et al.,* 2006).

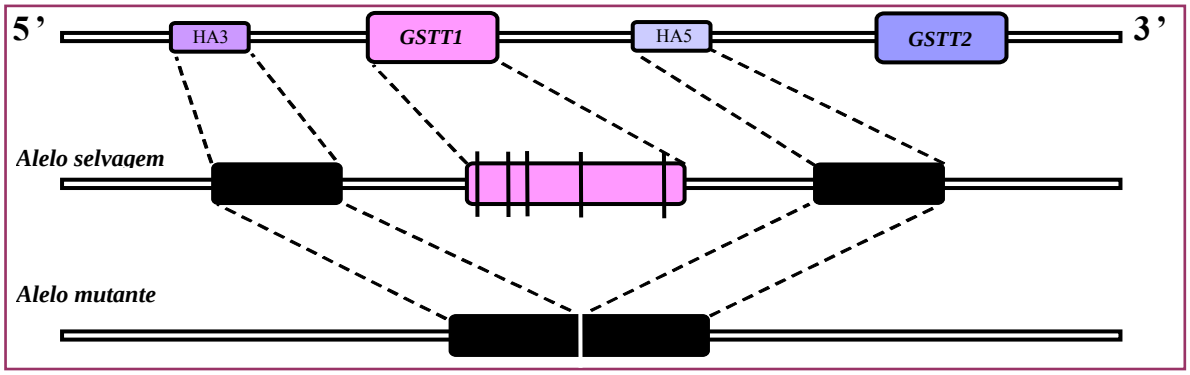

Figura 7. Desenho esquemático mostrando as posições dos genes da classe Teta de *GST*, no cromossomo 22, e a representação do alelo selvagem e mutante do gene *GSTT1*. Adaptado de Silva Jr (2008).

O gene *GSTT1,* assim como o gene *GSTM1* apresenta polimorfismo genético, caracterizado pela deleção total do gene (genótipo GSTT1 nulo ou 0/0), resultando na falta das proteínas ativas. A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em frequências que variam de 20 a 70% nas diferentes populações, enquanto que para o gene *GSTT1* esta variação é de 11 a 38% (Arruda *et al.,* 1998).

Os compostos GST-conjugados são geralmente hidrofílicos e atóxicos e, portanto, são facilmente excretados (Duarte, 2005). Como as enzimas codificadas por esses genes realizam um importante passo na detoxificação de xenobióticos, torna-se claro que a ausência de sua atividade pode levar a um aumento na toxicidade e na susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores malignos (Cascorbi, 1996). O polimorfismo de genes que codificam enzimas responsáveis pelo metabolismo de carcinógenos, como as do sistema da GST estão relacionadas com o desenvolvimento de vários tipos de câncer.

Existem várias evidências de que a ausência de uma ou mais formas de *GST* ou variantes alélicas que expressam diferentes combinações de herança étnica destas enzimas são mais susceptíveis ao estress químico (Matthias *et al.,* 1998). Genótipos GSTM1/T1 nulos estão associados a um aumento de risco de câncer de bexiga, pulmão e de cabeça e pescoço (Marques *et al*., 2006; Sato *et al.*, 2000; Matthias *et al.*, 1998), assim como outros tipos de cânceres, pois a ausência destas enzimas poderia reduzir a capacidade do organismo de detoxificar metabólitos reativos.

Gonçalves *et al.* (2009) demonstraram que a presença ou deleção dos genes *GST* (*GSTT1* e *GSTM1*) não são bom fatores prognósticos para CPT. Siraj *et al*. (2008) associaram um risco aumentado no desenvolvimento de CPT para genótipo GSTT1 nulo, e que o genótipo GSTM1 nulo apresentou um efeito protetor. Enquanto que,

quando ambos os genótipos GSTM1/T1 estão nulos, o risco na carcinogênese tiroideana é aumentado em dobro, mas não para DAIT (Bufalo *et al.,* 2006). No entanto, dados relativos ao perfil das GSTs em pacientes com patologias tiroideanas são escassos na literatura.

1.3.2. Polimorfismo do Gene *TP53* no códon 72 do éxon 4 (*TP53*^{72})

O gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica uma proteína nuclear de 53.000 Daltons. O gene é responsável pela síntese de uma fosfoproteína chamada proteína p53. Esta proteína controla o ciclo celular, durante a fase G1, retardando o processo de divisão celular, para que haja o reparo do DNA ou impedindo a divisão celular por indução da apoptose (Oliveira, 2005).

O gene *TP53* é um importante supressor de tumor, que aumenta a longevidade celular e inibe o desenvolvimento de câncer. As mutações envolvendo o gene *TP53* são eventos genéticos frequentemente observados em vários tipos de cânceres. Os clones mutados em *TP53* permitem o aumento de uma população celular com maior instabilidade genética (Oliveira, 2005). Além das mutações no gene *TP53*, o polimorfismo da proteína codificada por este gene também é relatado como evento genético associado ao desenvolvimento do câncer (Bond *et al.,* 2007).

O polimorfismo localizado no códon 72 do éxon 4 deste gene é identificado como um SNP, ou seja, as variações na sequência de DNA estão associadas com alterações de apenas uma base nitrogenada, levando as alterações estruturais da proteína p53. O SNP acarreta mudança na sequência de aminoácidos da proteína p53, resultando na presença de duas variantes para o resíduo 72 na população. O códon 72 do éxon 4 pode codificar um aminoácido arginina (Arg) ou uma prolina (Pro) (Ribeiro JR & Safatle-Ribeiro, 2006). O polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* é consequentemente a substituição de uma Citosina (C) por uma Guanina (G) em uma região rica em prolina no domínio de ligação SH3. A transversão é suficiente para modificar o aminoácido determinado pelo códon, sendo que a trinca de nucleotídeos CCC codifica para o resíduo de prolina (Pro) e CGC para o resíduo de arginina (Arg). Desta forma, dois alelos *p53* estão naturalmente presentes nas populações humanas, o *p53Arg* e o *p53Pro*. Consequentemente, SNP de *TP53*^{72} originam os genótipos *p53 Arg Arg, p53 Arg Pro* e *p53Pro Pro* nas populações (Buyru *et al,.* 2003).

Como a proteína p53 tem um papel destacado na regulação de várias rotas metabólicas dentro do ciclo celular, na percepção do dano ao DNA e na ativação da

apoptose (Vazquez *et al.*, 2008), o polimorfismo do gene *TP53*, no códon 72, ganhou uma importância fundamental no estudo do desempenho fisiológico das duas variantes protéicas (*p53Arg* e *p53Pro*). Neste contexto, a determinação do polimorfismo do gene *TP53* passou a ser alvo de vários estudos, com o intuito de se definir qual perfil alélico e/ou genotípico ofereceria maior contribuição para o risco no desenvolvimento de vários tumores humanos (Donehower, 2005).

No entanto, o papel deste polimorfismo ainda é controverso em vários tumores, sendo que muitos estudos apontam ora a presença de prolina, ora da arginina como um fator de risco significante (Bergamaschi *et al.*, 2003). Adicionalmente, este polimorfismo tem sido relatado como potencial fator de risco para cânceres como: cérvice uterina, mama, pulmão, e cabeça e pescoço, inclusive os tumores tiroideanos (Aral *et al.,* 2007; Rogounovitch *et al.,* 2006; Granja *et al.,* 2004). O papel do polimorfismo do gene *TP53* no prognóstico dos carcinomas tireoideanos ainda é conflitante. Rogounovitch *et al.* (2006) sugerem que a combinação diferente do alelo *p53 Arg/Arg* pode contribuir para o risco de desenvolvimento de CPT em indivíduos expostos a radiação durante a infância e adolescência. Enquanto, Granja *et al.* (2004) e Boltze *et al*. (2002) demonstraram que indivíduos com genótipo *p53 Pro Pro* têm uma maior chance de desenvolverem câncer de tiróide.

A definição do real papel do polimorfismo do códon 72 no gene supressor de tumor *TP53* e dos genes do metabolismo de xenobióticos na susceptibilidade individual ao câncer de tiróide necessita maior elucidação. Inúmeros polimorfismos têm sido investigados com o objetivo de se delinearem modelos poligenéticos da susceptibilidade ao câncer. Tais modelos são particularmente interessantes para o câncer de tiróide. Variações inter-individuais na susceptibilidade a tiroidopatias poderão num futuro próximo, conduzir a novas perspectivas para o diagnóstico precoce, prognóstico e tratamentos, determinando quais pacientes com nódulos tiroideanos se beneficiarão do conhecimento de seu perfil genético.

2.Justificativa

2.Justificativa

A análise da predisposição genética vinculada aos fatores ambientais favorece o entendimento na patogênese das doenças complexas, incluindo as tiroidopatias. O princípio básico dos marcadores de susceptibilidade reside na diferença interindividual que confere graus de sensibilidade às doenças induzidas pelo ambiente. Esses marcadores podem incluir características genéticas, diferenças no metabolismo ou na capacidade diferencial de um órgão de se recuperar de agressões ambientais (Bufalo, 2007).

Os polimorfismos genéticos podem influenciar no risco para o desenvolvimento de nódulos tiroideanos, sugerindo que a patogênese de tumores tiroideanos pode ser devida à exposição contínua aos fatores ambientais vinculadas a susceptibilidade genética. Um perfil genotípico para genes relacionados à susceptibilidade nas tiroidopatias poderá selecionar grupos que poderiam se beneficiar de medidas preventivas e/ou de intervenções diagnósticas e terapêuticas.

3. Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Analisar a associação entre o polimorfismo de *CYP1A1m1*, *CYP1A1m2*, *GSTM1*, *GSTT1* e *TP53*[72] em pacientes atendidos no Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge da Asscoiação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG) com tiroidopatia comparados ao grupo controle.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar a associação das variantes *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* na susceptibilidade ao câncer de tiróide;
- Analisar a associação dos genes *GSTM1* e *GSTT1* na susceptibilidade ao câncer de tiróide;
- Analisar o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* na susceptibilidade ao câncer de tiróide;
- Realizar uma meta-análise com dados de artigos publicados entre 2000 e 2009 e os do presente estudo sobre o polimorfismo de *TP53* em câncer de tiróide.

4.Pacientes e Métodos

4. Pacientes e Métodos

4.1. Polimorfismo dos genes relacionados ao metabolismo e detoxicificação de xenobióticos e do gene supressor de tumor *TP53*^{72} na susceptibilidade aos carcinomas tiroideanos

Para estabelecer os perfis alélicos de *CYP1A1m1*, *CYP1A1m2*, *GSTM1*, *GSTT1* e *TP53* o grupo amostral foi constituído por 256 indivíduos no total, sendo os grupos classificados em caso e controle. O grupo caso foi constituído de 122 pacientes atendidos no Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ/ACCG, destes 35 apresentaram nódulos neoplásicos malignos (NNM), 20 nódulos neoplásicos benignos (NNB) e 67 nódulos não neoplásicos (NNN). O grupo controle foi constituído de 134 indivíduos que não possuíam nenhuma suspeita de câncer nas vias aerodigestivas superiores ou patologias de ordem endócrina associadas a glândula tiróide. Estes foram selecionados aleatoriamente no banco de amostras do Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR). A participação individual no presente estudo teve caráter voluntário para ambos, casos e controles, na qual a participação foi voluntária, tendo como critério de inclusão a idade mínima de 15 anos. Para a realização do presente estudo obteve-se o parecer favorável do CEP/ACCG [Anexo 1].

Foram coletados 10mL de sangue periférico com anticoagulante, colhidos em tubos cônicos graduados de 12mL, sendo posteriormente processados a 5.000 x g durante 30 minutos. A partir dessa etapa, o anel leucocitário foi aspirado e armazenado em criotubos, preservados a -20°C, para posterior análise. No grupo caso, as amostras de sangue periférico foram coletadas anteriormente ao tratamento.

A extração e purificação de DNA das amostras obtidas foram executadas com uso do kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purifications Kit* (Promega Corporation, EUA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras extraídas foram rotuladas e armazenadas a -20°C. Posteriormente a purificação do material genômico, as amostras foram previamente quantificadas por espectrofotometria GeneQuant®(GE Healthcare, EUA) em diluição 1/10 (1uL amostra / 10 uL Água Milli-Q Estéril) e em seguida as mesmas foram utilizadas nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*).

4.1.1. Genotipagem das variantes *CYP1A1m1 e CYP1A1m2*.

Para a análise dos genótipos de *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 2 e as condições da Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição Enzimática (PCR-RFLP, do inglês *Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Fragment Polymorphisms*) sugerido por Song *et al.* (2001), com adaptações (Tabela 3).

Tabela 2. Características gerais dos *primers* utilizados para a genotipagem de *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* nos grupos caso e controle.

Primers	**Seqüência**	**T.M.**
CYP1A1m1	F: 5' AGTGAAGAGGTGTAGCCGCT 3' R: 5'TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT 3'	340 pb
CYP1A1m2	F: 5' ACCCGTTGCAGCAGCATAGCC 3' R: 5'CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAG 3'	204 pb

T.M. = Tamanho Molecular.

Tabela 3. Protocolo de termociclagem para a genotipagem de *CYP1Am1* e *CYP1A1m2*.

Etapas *CYP1A1 m1*	**Temperatura (ºC)**	**Tempo (min.)**	**Ciclos**
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação cíclica	94	1	30
Anelamento	61	1	
Extensão cíclica	72	1	
Extensão final	72	5	1
Armazenamento	4	∞	∞

Etapas *CYP1A1m2*	**Temperatura (ºC)**	**Tempo (min.)**	**Ciclos**
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação cíclica	94	1	35
Anelamento	55	1	
Extensão cíclica	72	1	
Extensão final	72	5	1
Armazenamento	4	∞	∞

Todas as 256 amostras foram submetidas à PCR em 50µL de reação, contendo aproximadamente 100ng de DNA das amostras previamente quantificadas, 0,8 nmoles de cada *primer*, 1X PCR *Buffer* (5mM de KCl, 1mM de Tris-HCl), 4,0 mM de $MgCl_2$, 0,10 mM de cada dNTP e 1.5U Taq DNA polimerase *platinum*® (Invitrogen Life Technologies, EUA). Para a análise da amplificação dos fragmentos de 340pb

(*CYP1A1m1*), 10µL do produto de PCR com adição de 3µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol e xileno cianol, 95% de formamida) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2.0 % em TBE 1X, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10 V/cm por 2 horas. Posteriormente, o gel foi submerso em TBE 1X contendo 5µL/ml de Brometo de Etídeo (EtBr) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas em sistema de vídeo-documentação *ImageMasterVDS*® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA).

Para a análise dos alelos de *CYP1A1m1* os fragmentos que apresentaram 340pb foram submetidos à técnica de PCR-RFLP utilizando-se a enzima de restrição *MspI* (Fermentas UAB, Lituânia). Na reação foram utilizados 32µL de solução, que continham água Mili-Q Estéril, 1X de tampão da enzima, 1U de *MspI*, e 10µL de *amplicon*. Posteriormente, as amostras foram submetidas à digestão enzimática por 12h à 37ºC. Para a visualização dos fragmentos digeridos utilizou-se as mesmas condições de eletroforese anteriormente descritas.

O conjunto de *primers* para *CYP1A1m1* amplifica um fragmento de 340pb referente ao genótipo homozigoto selvagem T/T, o qual contém um sítio de restrição para a *MspI*. Conseqüentemente, após a digestão enzimática apenas uma banda de 340pb foi observada. O genótipo homozigoto C/C possui sítio para a enzima de restrição em ambos os alelos, gerando dois fragmentos de 200pb e 140pb. O genótipo heterozigoto T/C apresenta três bandas de 340, 200 e 140pb, correspondente aos dois alelos (Figura 8).

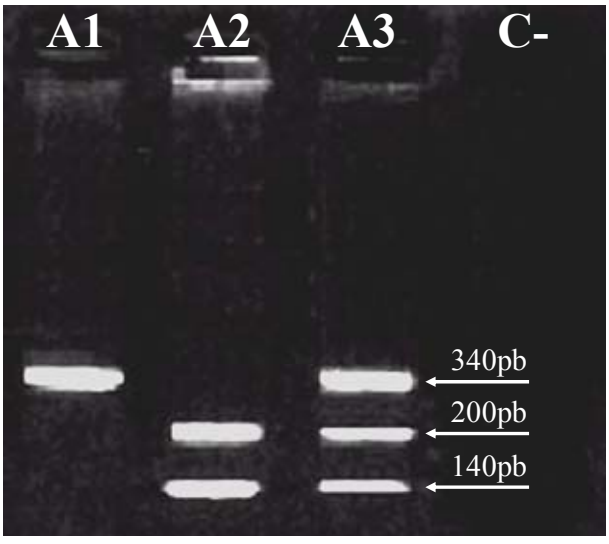

Figura 8. Gel de agarose a 2,0 % indicando o resultado da genotipagem da variante *CYP1A1m1*. A1: homozigoto T/T; A2: homozigoto C/C; A3: heterozigotos T/C e C-: controle negativo.

Para a análise de *CYP1A1m2*, as 256 amostras foram submetidas à PCR em 50µL de reação, contendo aproximadamente 100ng de DNA das amostras previamente quantificadas, 0,8 nmoles de cada *primer* (Tabela 2), 1X PCR Buffer (5mM de KCl, 1mM de Tris-HCl), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,10 mM de cada dNTP e 1.5U Taq DNA polimerase platinum® (Invitrogen Life Technologies, EUA). Para a análise da amplificação dos fragmentos de 204pb (*CYP1A1m2*), 10µL do produto de PCR com adição de 3µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol e xileno cianol, 95% de formamida) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8,0 % em TBE 1X, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10 V/cm por 4 horas. Posteriormente, o gel foi submerso em TBE 1X contendo 5µL/ml de Brometo de Etídeo (EtBr) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas em sistema de vídeo-documentação *ImageMasterVDS*® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA).

O conjunto de *primers* para *CYP1A1m2* amplifica um fragmento de 204pb referente ao genótipo homozigoto selvagem 149 e 55 pb. O polimorfismo de *CYP1A1m2* apresenta como genótipo homozigoto mutante G/G (Val/Val) o fragmento esperado de 204 pb, o homozigoto selvagem A/A (Ile/Ile) apresenta 149 e 55pb e o genótipo heterozigoto A/G (Ile/Val) apresenta fragmentos de 204, 149 e 55pb (Figura 9) [Duell *et al.*, 2002].

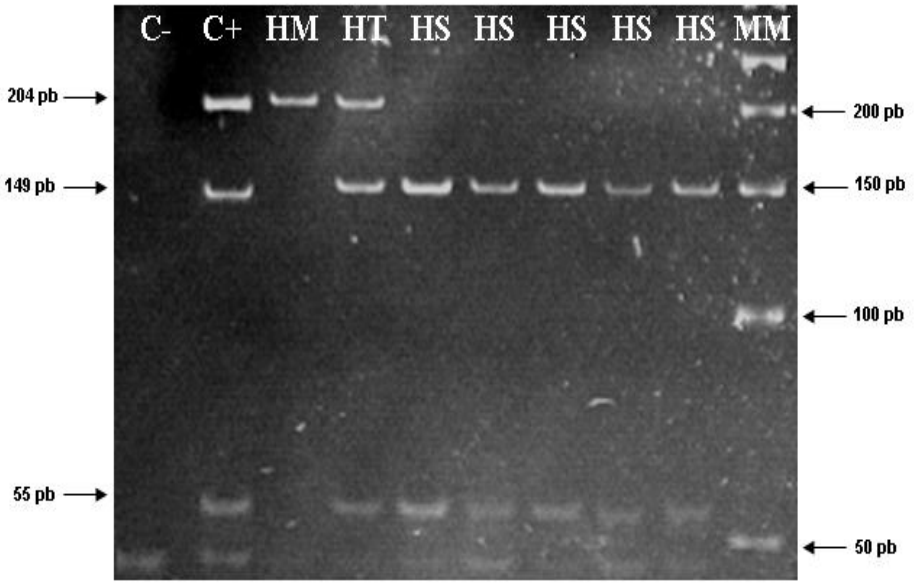

Figura 9. Gel em poliacrilamida a 8% corado por Brometo de Etídeo (EtBr) demonstrando os genótipos para *CYP1A1m2*, HS: homozigoto selvagem (149pb e 55pb), HM: homozigoto mutante (204pb) e HT: genótipo heterozigoto (204pb, 149pb e 55pb). MM: Marcador Molecular de 50pb.

4.1.2. Análise do Sistema glutationa S-transferase

Para a análise das deleções de *GSTM1* e *GSTT1* utilizou-se a técnica PCR-convencional multiplex com a co-amplificação do gene *RH92600*, o qual amplifica uma região de microssatélite de 135pb localizado em 6q13, usado como controle interno da reação. Os *primers* utilizados e as condições de PCR foram previamente sugeridos por Abdel-Rahma *et al.* (1996), com adaptações (Tabela 4 e 5).

Tabela 4. Características gerais dos *primers* utilizados para a análise das deleções de *GSTM1* e *GSTT1* nos grupos caso e controle.

Primers	**Seqüência**	**T.M.**[1]
RH92600	F: 5' TCATATGCAAAACAGCTTCCC 3' R: 5' CTGGTCCTTCAAGCCTGTATG 3'	135pb
GSTM1	F: 5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3' R: 5' GTTGGGCTAAATATACGGTGG 3'	215pb
GSTT1	F: 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3' R: 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	480pb

[1]T.M. = Tamanho Molecular

Tabela 5. Protocolo de termociclagem para a análise das deleções de *GSTM1* e *GSTT1* nos grupos caso e controle.

Etapas	**Temperatura (ºC)**	**Tempo (min.)**	**Ciclos**
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação cíclica	94	1	35
Anelamento	59	01:30	
Extensão cíclica	72	1	
Extensão final	72	7	1
Armazenamento	4	∞	∞

O volume utilizado na PCR foi de 25µL, contendo aproximadamente 100ng de DNA das amostras previamente quantificadas, 0,06 nmoles de cada *primer* (Tabela 5), 1X PCR *Buffer* (5 mM de KCl, 1mM de Tris-HCl), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,10mM de cada dNTP e 2.5U Taq DNA polimerase ® (Invitrogen Life Technologies, EUA).

Para a análise da amplificação dos fragmentos de 135pb (*RH92600*), 215pb (*GSTM1*) e 480pb (*GSTT1*), 10µL do produto de PCR com adição de 3µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol e xileno cianol, 95% de formamida) foram

submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2.0 % em TBE 1X, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10 V/cm por 2 horas. Posteriormente, o gel foi submerso em TBE 1X contendo 5µL/ml de Brometo de Etídeo (EtBr) por aproximadamente 15 minutos e em seguida as imagens foram capturadas em sistema de vídeo-documentação *ImageMasterVDS*® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA).

Os fragmentos de 215pb e 480pb foram observados, respectivamente, nos indivíduos *GSTM1* e *GSTT1* positivos. A ausência da amplificação *GSTM1* (215pb) ou *GSTT1* (480pb), na presença do controle interno (*RH92600* - 135pb), indicou os respectivos genótipos nulos para cada gene, ou para ambos (Figura 10).

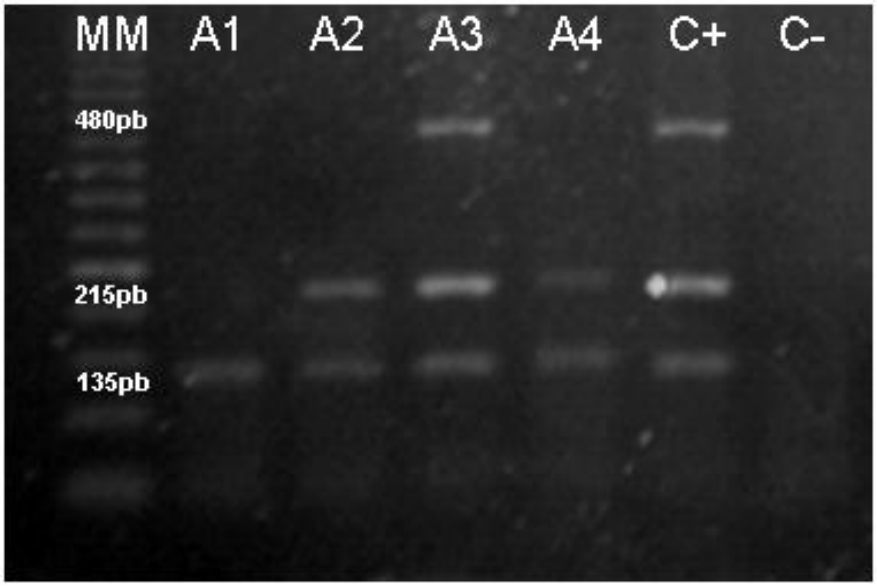

Figura 10. Gel em agarose 2.0% demonstrando os genótipos *GSTT1* (480pb) e *GSTM1* (215pb) e genótipos nulos. **MM**: Marcador molecular 50pb, **A1**: genótipos *GSTT1* e *GSTM1* nulo, **A2**: *GSTT1* nulo e *GSTM1* presente, **A3**: *GSTT1* presente e *GSTM1* presente, **A4**: *GSTT1* nulo e *GSTM1* presente, C+: Controle positivo (*GSTT1* presente e *GSTM1* presente) e C-: Controle negativo. Utilizou-se o *primer RH92600* de 135 pb como controle endógeno da reação.

4.1.3. Polimorfismo de *TP53* ^{72}

Para a determinação do polimorfismo do gene *TP53*^{72}, todas as amostras foram submetidas à reação de PCR, para a obtenção dos amplicons esperados, para tal procedimento foram utilizados dois conjuntos de *primers* (Tabela 6): um para Arginina (*p53Arg*) e outro para Prolina (*p53Pro*), ambos presentes no códon 72 do gene *TP53*.

Tabela 6. Características gerais dos *primers* utilizados para a avaliação do polimorfismo de *TP53*[72] nos grupos caso e controle.

Primers	Seqüência	T.M.[1]
p53Arg	F:5' TCC CCC TTC CCG TCC CAA 3' R:5'CTG GTG CAG GGG CCA CGC 3'	141
p53Pro	F: 5' GCC AGA GGC TGC TCC CCC 3' R: 5' CGT GCA AGT CAC AGA CTT 3'	177

[1]T.M. = Tamanho Molecular.

O volume final utilizado na PCR foi de 25µl, contendo aproximadamente 100ng de DNA das amostras previamente quantificadas, 0.15 nmoles de cada *primer*, 1X PCR *Buffer* (5 mM de KCl, 1mM de Tris-HCl), 2.0 mM de $MgCl_2$, 0.10mM de cada dNTP e 1U Taq DNA polimerase Invitrogen®. Para a amplificação dos fragmentos de *p53Arg* 141 pb e *p53Pro* 177 pb de *TP53*[72] foi utilizado o protocolo sugerido de Sourvinos *et al*. (2001), com adaptações [Tabela 7].

Tabela 7. Protocolo de termociclagem para análise do polimorfismo de *TP53* arginina e prolina.

Etapas	Temperatura (ºC)	Tempo (min.)	Ciclos
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação cíclica	94	1	35
Anelamento	59 (Arg) / 54 (Pro)	1	
Extensão cíclica	72	1	
Extensão final	72	5	1
Armazenamento	4	∞	∞

Para a análise dos amplicons, 10µL do produto de PCR com adição de 3µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol e xileno cianol, 95% de formamida) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 10V/cm por 3 horas. Posteriormente, o gel de poliacrilamida a 8% foi corado pela técnica de Nitrato de Prata ($AgNO_3$) [Anexo 2] e em seguida as imagens foram capturadas digitalmente para análise da amplificação (Figura 11).

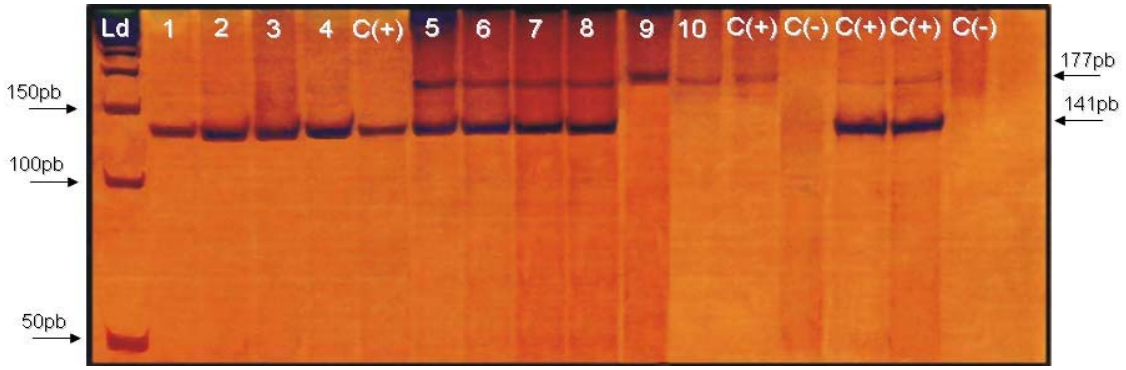

Figura 11. Gel de poliacrilamida 8% com os amplicons dos alelos de *p53*: Arginina – 141pb e Prolina – 177pb. Ladder de 50pb (Ld) - Invitrogen®; Amostras 1 ao 4 (alelo arginina); 5 ao 8 (alelo heterozigoto – *p53 Arg/Pro*); 9 e 10 (alelo prolina). Para a confirmação da reação, foram utilizados controles positivos C (+) e controles negativos C (-).

4.1.3.1. Polimorfismo de *TP53* ^{72} e associação por Meta-análise

A meta-análise é um procedimento destinado a examinar, de modo simultâneo, os resultados de várias investigações sobre um mesmo tópico. Esse tipo de estudo é bastante utilizado nas áreas médicas, pois, com o uso de numerosos dados, de diversos trabalhos sobre um mesmo assunto, aumenta-se o nível de confiança nas inferências estatísticas, para vários fins. A meta-análise se justifica porque muitos estudos sobre um determinado tema são concordantes, mas podem também apresentar discordância, fato que aumenta a necessidade de análises conjuntas para que se possam gerar conclusões com maior segurança (Silva, 2009).

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica no banco de dados SciELO (*Scientific Eletronic Library Online*), da WoS (*Web of Science*) e da PubMed do NCBI (*National Center for Biotechnology Information, USA*), entre os anos de 2000 a 2009, combinando os unitermos *TP53*, *polymorphism*, *72 codon* e *thyroid cancer*. Os dados do presente estudo e de outros quatro (4) artigos de determinação de polimorfismo do gene *TP53*^{72} em carcinomas tiroideanos foram selecionados e utilizados para a elaboração da meta-análise.

No contexto das meta-análises, é importante avaliar a heterogeneidade entre os estudos agrupados, pois a natureza distinta dos diferentes estudos, em termos de delineamento e em relação aos métodos empregados em cada um é o principal obstáculo na combinação de resultados (DerSimonian & Laird, 1986). Assim, a heterogeneidade pode ser de três tipos: clínica, metodológica ou estatística. Com o

intuito de minimizar estes parâmetros, definem-se com alargada precisão os critérios de inclusão e exclusão (Silva, 2009; Berwanger *et al*., 2007).

A heterogeneidade é definida como a diversidade entre os estudos, podendo interferir fortemente nos resultados. A diversidade então pode ser avaliada pelo teste do $\chi 2$ de heterogeneidade (Berwanger *et al*., 2007). Assim, as frequências genotípicas de todos os artigos foram agrupadas em tabela única e a diversidade foi avaliada com o emprego do teste do $\chi 2$ de heterogeneidade em tabelas de contingência 2x2, para a comparação das diferentes *Odds Ratios* (ORs), com intervalo de confiança de 95%, determinadas em seus respectivos estudos.

Neste contexto, a seleção dos artigos seguiu os seguintes critérios de inclusão e exclusão: (1) foram publicados no período de 2000 a 2009, (2) eram estudos do tipo caso-controle e os casos genotipados apresentavam confirmação histológica para câncer de tiróide e, finalmente, (3) utilizavam a PCR ou a PCR-RFLP para a determinação do polimorfismo de $TP53^{72}$.

Desta forma, os seguintes dados foram coletados: local onde o estudo foi realizado, ano da publicação, o tipo de carcinoma, número totais e discriminados por sexo para os pacientes e os controles, médias das idades de cada grupo e, finalmente, o tipo de metodologia utilizada para a determinação do polimorfismo de $TP53^{72}$.

Aplicou-se o teste de efeito randômico de *DerSimonian-Laird* para todas as possibilidades genotípicas: (1) RR x RP, (2) RR x PP e (3) RP x PP. Em seguida, comparou-se, utilizando o mesmo teste, o genótipo tipo-selvagem *p53 Arg/Arg* com a junção dos genótipos variantes *p53Arg/Pro* e *p53 Pro/Pro*, para todos os estudos.

4.2. Análise Estatística

O estudo do polimorfismo genético associado à susceptibilidade ao câncer, foram usados o teste exato de qui-quadrado ($\chi 2$) para examinar a homogeneidade entre os casos e os controles com relação ao sexo e idade. O teste de Kruskal-Wallis (H) foi usado para comparar a idade e o sexo entre os grupos. O *Odds ratio* (OR) e o coeficiente de intervalo de 95% foram usados para indicar o risco que um determinado genótipo possui em relação ao grupo controle. Todos os testes foram realizados com p=0,05 como nível de significância. O teste de efeito randômico de *DerSimonian-Laird* foi utilizado nos dados de meta-análise.

5.Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1. Dados gerais

Na análise do polimorfismo genético e susceptibilidade à carcinogênese tireoidiana, a média de idade para os pacientes com tiroidopatia foi de 36,2 anos e para o grupo controle de 44,4 anos. De acordo com o resultado do teste de χ^2 (tabelas de contingência 2X3), os intervalos de idade entre os grupos caso e controle apresentaram diferenças estatisticamente significativa (χ^2=18,27; p<,0,001), indicando um maior número de mulheres acometidas pelas doenças tireoidianas (χ^2=85,26; p<0,001) [Tabela 8].

Tabela 8. Distribuição dos dados sócio-demográficos, quanto á idade e sexo, dos pacientes caso e controle.

Variáveis	Caso n (%)	Controle n (%)	X²	GL	*P*
Idade (anos)					
≤40	46	83 (61,9)			
41 – 60	61	47 (35,1)	18,27	2	<0,0001
> 60	15	4 (3,0)			
Sexo					
Feminino	103	36 (26,8)	85,26	1	<0,0001
Masculino	19	98 (73,2)			
Total	122 (100,0)	134(100,0)			

Correção de Yates: 82,95.

Quando os pacientes foram agrupados por tipo de nódulo, o teste Kruskal Wallis (H) demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle em relação aos intervalos de idade (H=3,04; p=0,38). No entanto, em relação ao sexo, os dados demonstraram novamente que houve diferença estatisticamente significativa, pois, como relatado anteriormente, o sexo feminino foi predominante (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição dos dados sócio-demográficos, quanto à idade e sexo dos pacientes classificados com NNM, NNB e NNN e controle.

Variáveis	NNM n (%)	NNB n (%)	NNN n (%)	Controle n (%)	H	GL	*p*
Idade (anos)							
≤40	16 (45,7)	6 (30,0)	24 (35,8)	83 (61,9)			
41 – 60	14 (40,0)	14 (70,0)	33 (49,3)	47 (35,1)	3,04	3	0,38
> 60	5 (14,3)	0 (0,0)	10 (14,9)	4 (3,0)			
Sexo					**T**	**Z**	***p***
Feminino	27 (77,1)	17 (85,0)	59 (88,1)	36 (26,8)	210	6,96	<0,0001
Masculino	8 (22,9)	3 (15,0)	8 (11,9)	98 (73,2)			
Total	35 (100,0)	20 (100,0)	67 (100,0)	134 (100,0)			

A média das idades demonstra que há uma tendência a homogeneidade entre os grupos quando se separa o grupo caso (122 pacientes) de acordo com o tipo de nódulo tiroideano (neoplásico e não neoplásico). Em relação ao sexo observa-se uma discrepância quando se faz o pareamento entre os grupos caso e controle, visto que as doenças tiroideanas são mais frequentes em mulheres, provavelmente devido a ação estrogênica (Siraj *et al.,* 2008; Grimaldi *et al.,* 2002).

Os pacientes do grupo caso NNM apresentaram 5,7% (2/35) de CFT, 5,7% (2/35) CMT, 85,8% (30/35) CPT e 2,9% (1/35) Carcinoma de Células de Hurtle (CCH). Dentre os pacientes com NNB, 55% (11/20) e 45% (9/20) apresentaram adenoma folicular (AF) e adenoma de células de Hurtle (ACH), respectivamente. O grupo NNN apresentou-se heterogêneo com 91% (61/67) de Bócio Colóide (BC), tendo como classificação predominante bócio colóide multinodular e bócio colóide nodular, 7,4% (5/67) apresentaram a DAIT mais comum TH e 1,5% (1/67) apresentaram bócio adenomatoso (BA) [Figura 12].

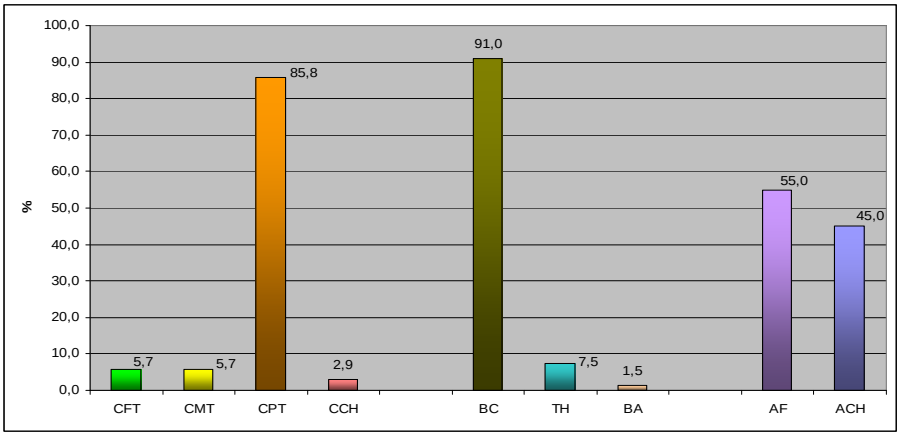

Figura 12. Distribuição percentual dos tipos de nódulos presentes nos grupos caso NNM, NNB e NNN. Legenda: CFT: Carcinoma Folicular da Tiróide; CMT: Carcinoma Medular da Tiróide; CPT: Carcinoma Papilar da Tiróide; CCH: Carcinoma de Células de Hurtle; BC: Bócio Colóide; TH: Tiroidete de Hashimoto; BA: Bócio Adenomatoso; AF: Adenoma Folicular e ACH: Adenoma de Células de Hurtle.

A incidência do nódulo tiroideano palpável na população geral, é cerca de 5 a 10% (Dean *et al.*, 2008; Hegedüs, 2004). Contudo, com o advento da ultra-sonografia, observou-se um aumento da prevalência, demonstrando a alta capacidade mitogênica deste tecido. Os nódulos são em sua grande maioria, lesões benignas que incluem bócio colóide e adenomas foliculares, enquanto uma pequena porção corresponde aos carcinomas (Matsuo *et al.,* 2004). Os dados do presente estudo corroboram com a

literatura e, portanto, para NNN e NNB, o maior percentual foi para bócio colóide e adenoma folicular, respectivamente. Os casos de NNM apresentaram o CPT como o tipo histológico de maior prevalência.

5.2. Polimorfismo dos genes relacionados ao metabolismo e detoxicificação de xenobióticos na susceptibilidade aos carcinomas tiroideanos

Os genótipos de *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* foram analisados nos 122 pacientes (35 NNM, 20 NNB e 67 NNN) e 134 controles. As frequências alélicas do gene *CYP1A1m1* para os alelos T e C foram de 68,5% e 31,5% para os pacientes com NNM, 80% e 20% com NNB, 77,6% e 22,4% para NNN, 70,1% e 29,9% para o grupo controle, respectivamente. Pelo Teste do χ^2, a diferença alélica entre as populações não se mostrou significativa, tendo p = 0,17. A distribuição das respectivas frequências encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10. Distribuição das frequências alélicas da variante *CYP1A1m1* entre os grupos caso e controle.

CYP1A1m1	**NNM** n (%)	**NNB** n (%)	**NNN** n (%)	**Controle** n (%)	**X^2**	**GL**	***P***
T	24 (68,5)	16 (80,0)	52 (77,6)	94 (70,1)	5	3	0,17
C	11 (31,5)	4 (20,0)	15 (22,4)	40 (29,9)			
Total	35 (100)	20 (100)	67 (100)	100			

Foram observadas as frequências genotípicas de 48,5% (17/35), 65% (13/20), 61,2% (41/67) e 48,5% (65/134) de homozigotos T/T; 40,0% (14/35), 30,0% (6/20), 31,3% (21/67) e 43,2% (58/134) de heterozigotos T/C; 11,5% (4/35), 5% (1/20), 7,5% (5/67) e 8,3% (11/134) de homozigotos C/C, em pacientes com NNM, NNB, NNN e controles, respectivamente. Os dados relacionados à frequência genotípica encontram-se distribuídos na Tabela 11 e demonstram que os mesmos não apresentam diferença estatisticamente significativa.

Tabela 11. Distribuição das frequências genotípicas de *CYP1A1m1* entre as populações caso e controle.

Genótipo	**NNM** n (%)	**NNB** n (%)	**NNN** n (%)	**Controle** n (%)	**X^2**	**GL**	***P***
T/T	17 (48,5)	13 (65,0)	41 (61,2)	65 (48,5)	4,83	6	0,56
T/C	14 (40,0)	6 (30,0)	21 (31,3)	58 (43,2)			
C/C	4 (11,5)	1 (5,0)	5 (7,5)	11 (8,3)			
Total	**35 (100,0)**	**20 (100,0)**	**67 (100,0)**	**134 (100,0)**			

Para verificar se a presença dos genótipos T/C e C/C podem ter relação com o risco de tiroidopatia, foi aplicado o teste *Odds Ratio* (Tabela 12). A comparação das frequências genotípicas obtidas entre os grupos NNM, NNB, NNN e controle indicou ausência de associação com a susceptibilidade a tiroidopatia benigna e maligna $p>0,05$.

Tabela 12. Número de indivíduos com ou sem genótipos considerados de risco e respectivas *Odds Ratio* (OR), Intervalo de Confiança 95% (IC 95%) e valor de *p* para a variante *CYP1A1m1* nos grupos caso e controle.

	NNN		Controle				
Genótipo	**GR[a]**	**GNR [b]**	**GR [a]**	**GNR [b]**	**OR**	**IC 95%**	***P***
T/C	21	41	58	65	0.57	(0.30-1.082)	*0.1172*
C/C	5	41	11	65	0.72	(0.23-2.22)	*0.7681*
(T/C + C/C)	26	41	69	65	0.59	(0.32-1.08)	*0.1215*
	NNB		**Controle**				
Genótipo	**GR[a]**	**GNR [b]**	**GR [a]**	**GNR [b]**	**OR**	**IC 95%**	***p***
T/C	6	13	58	65	0.51	0.18-1.44	*0.3067*
C/C	1	13	11	65	0.45	0.0539-3.8326	*0.7537*
(T/C + C/C)	7	13	69	65	0.50	0.1905-13506	*0.2558*
	NNM		**Controle**				
Genótipo	**GR[a]**	**GNR [b]**	**GR [a]**	**GNR [b]**	**OR**	**IC 95%**	***p***
T/C	14	17	58	65	0.92	(0.41-2.03)	*0.9979*
C/C	4	17	11	65	1.39	(0.39-4.91)	*0.8633*
(T/C + C/C)	18	17	69	65	0.99	(0.47-2.09)	*0.8547*

a = GR - genótipo considerado de risco; b = GNR - genótipo não considerado de risco

As frequências alélicas de *CYP1A1m2* para os alelos A e G foram de 77,2% e 22,8% para os pacientes com NNM, 79,2% e 20,8% para NNN, 76,9% e 23,1% para o grupo controle, respectivamente. O grupo NNB apresentou 100% de frequência alélica para o alelo A (selvagem). Pelo teste do χ^2, a diferença alélica entre as populações mostrou-se significativa, tendo $p = 0,0001$. A distribuição das respectivas frequências encontra-se na Tabela 13.

Tabela 13. Distribuição das frequências alélicas da variante *CYP1A1m2* entre os grupos caso e controle.

CYP1A1m2	**NNM n (%)**	**NNB n (%)**	**NNN n (%)**	**Controle n (%)**	**X^2**	**GL**	***p***
A	27 (77,2)	20 (100)	53 (79,2)	103 (76,9)	26,49	3	0,0001
G	8 (22,8)	0	14 (20,8)	31 (23,1)			
Total	35 (100)	20 (100)	67 (100)	134 (100)			

Foram observadas as frequências genotípicas de 65,7% (23/35), 100% (20/20), 65,6% (44/67) e 59,7% (80/134) de homozigotos A/A; 25,7% (9/35), 0% (0/20), 28,3% (19/67) e 36,5% (49/134) de heterozigotos A/G; 8,6% (3/35), 0% (0/20), 6,1% (4/67) e 3,8% (5/134) de homozigotos G/G, em pacientes com NNM, NNB, NNN e controles, respectivamente. Os dados relacionados à frequência genotípica encontram-se distribuídos na Tabela 14 e demonstram que os mesmo apresentam diferença estatisticamente significativa, $p<0,05$.

Tabela 14. Distribuição das frequências genotípicas de *CYP1A1m2* entre as populações caso e controle.

Genótipo	NNM n (%)	NNB n (%)	NNN n (%)	Controle n (%)	χ^2	GL	*p*
A/A	23 (65,7)	20 (100)	44 (65,6)	80 (59,7)			
A/G	9 (25,7)	0	19 (28,3)	49 (36,5)			
G/G	3 (8,6)	0	4 (6,1)	5 (3,8)	15,07	6	0,02
Total	35 (100,0)	20 (100,0)	67 (100,0)	134 (100,0)			

Para verificar se a presença dos genótipos A/G e G/G possui relação com o risco do desenvolvimento das doenças tiroideanas, foi aplicado o *Odds Ratio* (Tabela 15). As comparações das frequências obtidas demonstram ausência de associação com susceptibilidade ao desenvolvimento de nódulos tiroideanos benignos e malignos, $p>0,05$.

Tabela 15. Número de indivíduos com ou sem genótipos considerados de risco e respectivas *Odds Ratio* (OR), Intervalo de Confiança 95% (IC 95%) e valor de *p* para a variante *CYP1A1m2* nos grupos caso e controle.

Genótipo	NNM		Controle				
	GR[a]	GNR [b]	GR [a]	GNR [b]	OR	IC 95%	*p*
A/G	19	44	49	80	0.70	(0.36-1.34)	*0.3661*
G/G	4	44	5	80	1.45	(0.37-5.69)	*0.8563*
(A/G + G/G)	23	44	54	80	0.77	(0.42-1.42)	*0.5049*
Genótipo	**NNN**		**Controle**				
	GR[a]	GNR [b]	GR [a]	GNR [b]	OR	IC 95%	*p*
A/G	9	23	49	80	0.63	(0.27-1.49)	*0.4041*
G/G	3	23	5	80	2.08	(0.46-9.39)	*0.5874*
(A/G + G/G)	12	23	54	80	0.77	(0.35-1.68)	*0.6493*

a = GR - genótipo considerado de risco; b = GNR - genótipo não considerado de risco

O gene *CYP1A1* codifica a enzima chave do metabolismo de carcinógenos, considerada um marcador de susceptibilidade a vários tipos de cânceres, especialmente por estar envolvida com a biotransformação de PAHs (Vineis *et al.,* 2004). Os dados

apresentados demonstram que o genótipo homozigoto selvagem de *CYP1A1m1* é frequentes tanto nos nódulos tiroideanos neoplásicos e não neoplásicos quanto no grupo controle (χ^2=4,,83; *p*=0,56), sugerindo que metabólitos dependentes da ativação de *CYP1A1m1* não estão associados ao risco de desenvolvimento de nódulos tiroideanos.

O estudo apresentado revela que não foram encontradas associações estatisticamente significativas da variante alélica e genotípica de *CYP1A1m1* com as tiroidopatias. Enquanto que para a variante *CYP1A1m2*, observa-se que tanto as frequências alélicas quanto as genotípicas apresentaram diferença estatística significativa, tendo o valor de *p*=0,0001. Esse resultado pode ser explicado em virtude de o grupo NNB ter apresentado a presença em 100%, tanto dos alelos quanto do genótipo, o tipo selvagem. A análise de OR revelou que não há associação de risco entre o desenvolvimento de nódulos neoplásicos malignos e não neoplásicos pela presença de genótipo de risco de *CYP1A1m2* (*p*>0,05). No entanto, não se exclui completamente a possibilidade do gene *CYP1A1* exercer alguma influência no desenvolvimento de nódulos tiroideanos, tendo em vista que haplótipos envolvendo os diversos genes do biometabolismo podem contribuir de forma diferenciada para a carcinogênese.

Bufalo *et al.,* (2006) demonstraram uma associação inversa significante entre *CYP1A1m1* e o hábito de fumar no risco para o desenvolvimento do câncer de tiróide. Demonstrou-se que o alelo homozigoto selvagem de *CYP1A1m1* é mais freqüente tanto em nódulos tiroidianos quanto em carcinomas papilíferos do que nos indivíduos-controle, sugerindo que a fumaça do cigarro e outros metabólitos dependentes da ativação de *CYP1A1* não estão implicados no risco para a formação de bócio nem no processo da malignidade tiroideana. Para *CYP1A1m2* os autores não encontraram significância estatística quando comparado ao grupo controle com pacientes com nódulos tiroideanos (*p*=0,8618).

Siraj *et al.,* (2008) demonstraram que o nível hormonal de estrogênio na circulação é afetado pela variabilidade genética e os polimorfismos genéticos influenciam na produção de estrógeno que contribuem com a carcinogênese tiroideana, em virtude da forte associação entre o homozigoto mutante (AA) de *CYP1A1m4* com o risco de desenvolver CPT (OR: 3.484; *p*<0,001). O estrógeno pode ser considerado um dos fatores que poderiam influenciar o risco de câncer de tiróide. Este hormônio

exerce efeitos pleiotrópicos na ativação dos linfócitos, na proliferação e na progressão celular, como também na apoptose. Adicionalmente, dependendo dos níveis, o cortisol pode suprimir ou estimular a função imune, sendo sua modulação influente no risco de câncer tiroideano (Siraj *et al.,* 2008; Grimaldi *et al.,* 2002).

No entanto, o estrógeno pode também contribuir com as desordens auto-imunes que ocorrem com grande frequência no sexo feminino (Grimaldi *et al.,* 2002). Pani *et al.,* (2002) demonstraram que a susceptibilidade a doenças auto-imunes endócrinas (TH e DG) é poligênica, outras variantes genéticas permitem a diferenciação da predisposição com interação gênica. Assim, o *CYP1A1* não é excluído como um candidato a susceptibilidade a DAIT (Bufalo *et al.,* 2006).

Vários relatos na literatura sugerem que fatores inerentes ao próprio indivíduo, incluindo os polimorfismos genéticos podem conferir diferenças individuais na ocorrência do câncer, como também a outras doenças complexas, como insuficiência renal crônica, diabetes e doenças cardíacas (Tiwari *et al.,* 2009; Manfredi *et al.,* 2009; Yalin *et al.,* 2007; Pani *et al.,* 2002). Estudos epidemiológicos têm demonstrado a interação entre genótipo e exposição à mutágenos na susceptibilidade a doenças, principalmente no câncer, tendo como principais genes afetados, os de resposta inflamatória, os do metabolismo e os do controle do ciclo celular. A herança de polimorfismos de genes relacionados com a metabolização e a detoxificação de xenobióticos, assim como a herança de genes relacionados com a vida e a morte celular, desempenham um importante papel na susceptibilidade a doenças (Wünsch Filho & Zago, 2005).

Estudos envolvendo nódulos tiroideanos e sua associação ao polimorfismo de *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* são escassos na literatura (Tabela 16). Devemos ressaltar que *CYP1A1* é apenas um dos vários genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos que atuam em diferentes substratos e são tecido-específicos. A relação entre o genótipo e o fenótipo originado de *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* ainda não é suficientemente compreendida.

Tabela 16. Polimorfismo dos genes relacionados com o metabolismo e detoxificação de xenobióticos em doenças tiroideanas.

n	Referência	Local	Genes	Grupo amostral	Método
1	Gonçalves *et al.*, 2009	Brasil	GSTM1 / GSTT1	66 CPT	PCR
2	Hernandez *et al.*, 2008	Espanha	GSTM1 / GSTT1/GSTP1/ NAT	176 CDT 167 Controles	PCR
3	Siraj *et al.*, 2008	Arábia Saudita	CYP1A1/ GSTM1/GSTT1/GSTP1	223 CPT 513 Controles	PCR / PCR-RFLP
4	Bufalo *et al*., 2008	Brasil	GSTM1/GSTT1/GSTP1/CYP1A1/P53	400 DG 574 Controles	PCR / PCR-RFLP
5	Lemos *et al*., 2008	Portugal	GSTM1/GSTT1	188 CPT 247Controles	PCR
6	Gonçalves *et al*., 2007	Brasil	GSTM1/GSTT1	18 NNB 14 CDT	PCR
7	Bufalo *et al*., 2006	Brasil	CYP1A1/ GSTM1/GSTT1/GSTP1/GSTPO1/P53	67 bócios 13 AF 168 CDT 277 Controles	PCR / PCR-RFLP
8	Stankov *et al*., 2006	Itália	GSTM1/GSTT1	CCH	PCR
9	Ho *et al*., 2006	EUA	GSTM1/GSTT1	201 CPT 680 controles	PCR
10	Rigual *et al*., 2005	EUA	GSTM1/GSTT1	103 NNB 35 CPT baixo/alto risco	PCR
11	Gaspar *et al*., 2004	Portugal	GSTM1 / GSTT1/GSTP1	Carcinomas tiroideanos	PCR
12	Hernandez *et al*., 2003	Espanha	GSTM1 / GSTT1/GSTP1	134 CPT 116 Controles	PCR
13	Morari *et al.*, 2002	Brasil	GSTM1/GSTT1	49 NNB 67 CDT 116 Bócios	PCR
14	Pani et al., 2002	Alemanha	CYP1A1	209 DM Tipo I 92 DG 106 TH	PCR

*CPT: Carcinoma Papilífero da Tiróide; CFT: Carcinoma Folicular da Tiróide; CDT: Carcinoma Diferenciado da Tiróide; DG: Doença de Graves; NNB: Nódulos Neoplásicos Benigno; AF: Adenoma Folicular; CCH: Carcinoma de Células de Hürtle; DM Tipo I: *Diabetes Melitus* tipo I e TH: Tiroidite de Hashimoto.

Na análise do sistema Glutationa S-transferase as frequências genotípicas positivas observadas para os genes *GSTM1* e *GSTT1* foram de 34,3% (12/35) e 62,9% (22/35), 30% (6/20) e 5,0% (1/20), 20,9% (14/67) e 14,9% (10/67) para os pacientes com NNM, NNB e NNN e de 54,9% (73/134) e 40,3% (54/134) para o grupo controle, respectivamente. Para a avaliação dos genótipos *GSTM1 (nulo)* e *GSTT1 (nulo)*, foram encontrados em NNM 65,7% (23/35) e 37,1% (13/35), em NNB 70% (14/20) e 95%

(19/20) e em NNN 79,1% (53/67) e 85,1% (57/67). O grupo controle apresentou os valores 45,1% (61/134) e 59,7% (80/134). Pelo Teste do χ^2, a diferença alélica entre as populações mostrou-se significativa para o genótipo *GSTM1 (nulo)*, tendo p <0,0001 ($\chi 2$ = 22,90; GL= 3). O mesmo foi observado para o genótipo *GSTT1 (nulo)*, tendo p <0,0001 ($\chi 2$ = 33,72; GL= 3). A distribuição das respectivas frequências pode ser visualizada na Tabela 17.

Tabela 17. Distribuição das frequências genotípicas para *GSTM1* e *GSTT1* entre as populações caso e controle.

Genótipo	NNM n (%)	NNB n (%)	NNN n (%)	Controle n(%)	X^2	GL	*p*
GSTM1							
Presente	12 (34,3)	6 (30,0)	14 (20,9)	73 (54,9)			
Nulo	23 (65,7)	14 (70,0)	53 (79,1)	61 (45,1)	22,9	3	<0,0001
Total	35 (100,0)	20 (100,0)	67 (100,0)	134 (100,0)			
GSTT1							
Presente	22 (62,9)	1 (5,0)	10 (14,9)	54 (40,3)			
Nulo	13 (37,1)	19 (95,0)	57 (85,1)	80 (59,7)	33,72	3	<0,0001
Total	35 (100,0)	20 (100,0)	67 (100,0)	134 (100,0)			

O teste *Odds Ratio* foi aplicado para avaliar se a ausência dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* estão associadas ao risco de tiroidopatia (Tabela 18). Foram observadas associações entre o risco relativo entre os genótipos considerados de risco (*GSTM1* e *GSTT1* nulos) e os genótipos ditos selvagens (*GSTM1* e *GSTT1* presente), pois o valor de p<0,05. A análise sugere que os pacientes que apresentam genótipos considerados de risco (*GSTM1* e *GSTT1* nulos) possuem um a predisposição aumentada para doença tiroideana benigna do que para maligna. Assim, observa-se que NNB apresenta um risco aumentado para a presença de genótipo *GSTT1* (*nulo*) (OR=12,82; p=0,004) e NNN apresenta risco aumentado na presença de ambos os genótipos (*GSTM1 e GSTT1 nulos*) avaliados, sendo para *GSTM1* (OR=4,53; p<0,001) e *GSTT1* (OR=3,84; p=0,0005), respectivamente.

As células utilizam um amplo espectro de enzimas para modificar carcinógenos em potencial de diversas formas químicas, incluindo a ligação de grupos acetil, ácido glucônico, glutationa e sulfato; muitas dessas modificações químicas auxiliam na detoxificação e eventual excreção de compostos potencialmente tóxicos, incluindo mutágenos. Devido a heterogeneidade genética do conjunto de genes humanos, o nível de expressão de muitas das enzimas responsáveis por essas reações de detoxificação pode variar muito em diferentes indivíduos (Weinberg, 2008).

Tabela 18. Análise polimórfica de GSTM1 e GSTT1 e respectivas *Odds Ratio* (OR), Intervalo de Confiança 95% (IC 95%) e valor de *p* nos grupos caso e controle.

Genótipo	NNM		Controle				
	GR[a]	GNR [b]	GR [a]	GNR [b]	OR	IC 95%	*p*
GSTM1	23	12	61	73	2,29	(1,05 – 4,98)	0,05
GSTT1	13	22	80	54	0,39	(0,18 – 0,85)	0,02
Genótipo	**NNB**		**Controle**				
	GR[a]	**GNR [b]**	**GR [a]**	**GNR [b]**	**OR**	**IC 95%**	***p***
GSTM1	14	6	61	73	2,79	(1, 10 – 7,70)	0,07
GSTT1	19	1	80	54	12,82	(1,66 – 98,66)	0,004
Genótipo	**NNN**		**Controle**				
	GR[a]	**GNR [b]**	**GR [a]**	**GNR [b]**	**OR**	**IC 95%**	***p***
GSTM1	53	14	61	73	4,53	(2,29 – 8,94)	<0,0001
GSTT1	57	10	80	54	3,84	(1,80 – 8,18)	0,0005

a = GR - genótipo considerado de risco; b = GNR - genótipo não considerado de risco

Recentes estudos demonstram que os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, separadamente ou combinados, são fatores genéticos de alto risco para o desenvolvimento de tumores. O genótipo *GSTM1* nulo já foi associado ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, como o de pulmão; bexiga; mama e de cabeça e pescoço (Rouissi *et al.,* 2009; Zafereo *et al.,* 2009; Bugano *et al.,* 2008;). O câncer de pulmão é o mais frequentemente associado à ausência do gene *GSTM1*, por este gene se relacionar com a detoxificação de certos epóxidos dos HPAs encontrados na fumaça do cigarro e em outros produtos de combustão (Sreeea *et al.,* 2008; Silva Jr, 2008; Wünsch Filho & Zago, 2005).

O percentual nos resultados para os genótipos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foi relativamente maior no grupo caso (NNM, NNB e NNN) quando comparado com o grupo controle, sendo χ^2=22,9; p<0,0001 para *GSTM1* e χ^2=33,72; p<0,0001 para *GSTT1,* respectivamente. Na análise de risco sugere-se que os genótipos considerados de risco (*GSTM1* e *GSTT1* nulos) podem ser susceptíveis ao desenvolvimento de nódulos tiroideanos (p<0,05), em virtude do processo de detoxificação apresentar-se reduzido.

Existem poucos estudos envolvendo os genótipos nulos *GSTM1* e *GSTT1* associado ao risco de doenças benignas e malignas da tiróide (Tabela 16). De acordo com Gonçalves *et al.* (2009), Siraj *et al.* (2008), Gaspar *et al.* (2004) e Morari *et al.* (2002) os indivíduos com genótipo nulos para os genes *GSTM1* e *GSTT1* podem estar associados ao aumento na susceptibilidade ao câncer de tiróide. Adicionalmente, Ho *et al.,* (2006) sugerem que a combinação dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*

promovem um aumento moderado ao carcinoma tiroideano, especialmente no CPT. Contrariamente, Lemos *et al* (2008) e Hernández *et al.* (2003) demonstraram em suas análises, que *GSTM1* e *GSTT1* estão fracamente envolvidos na susceptibilidade a carcinogênese tiroideana. Nossos resultados demonstram que o genótipo nulo de *GSTM1* possui uma tendência estatística p=0,05 e risco de 2,79 vezes de desenvolver câncer de tiróide.

Vários relatos na literatura sugerem que fatores inerentes ao próprio indivíduo, incluindo os polimorfismos genéticos podem conferir diferenças individuais na ocorrência do câncer, como também a outras doenças complexas, como insuficiência renal crônica, diabetes e doenças cardíacas (Tiwari *et al.,* 2009; Manfredi *et al.,* 2009; Jarvis *et al.,* 2009; Yalin *et al.,* 2007; Pani *et al.,* 2002). Estudos epidemiológicos têm demonstrado a interação entre genótipo e exposição à mutágenos na susceptibilidade a doenças, principalmente no câncer, tendo como principais genes afetados, os de resposta inflamatória, os do metabolismo e os do controle do ciclo celular. A herança de polimorfismos de genes relacionados com a metabolização e a detoxificação de xenobióticos, assim como a herança de genes relacionados com a vida e a morte celular, desempenham um importante papel na susceptibilidade a doenças (Wünsch Filho & Zago, 2005).

Análises genotípicas podem trazer informações sobre as vias metabólicas de carcinógenos específicos. Entretanto, divergências são encontradas entre os diferentes estudos que envolvem estes genes do biometabolismo.

5.3. Polimorfismo de *TP53* [72]

As frequências alélicas de *p53Arg* foram de 45,7%, 55%, 68,6% e 71,6% para NNM, NNB, NNN e grupo controle, respectivamente. Para o alelo *p53Pro* verificaram-se as frequências de 54,3%, 45%, 31,4% e 28,4%, para NNM, NNB, NNN e grupo controle, respectivamente. A distribuição das respectivas frequências encontra-se na Tabela 19.

Tabela 19. Distribuição das frequências alélicas entre as populações de pacientes e controle.

Alelo	NNM n (%)	NNB n (%)	NNN n (%)	Controle n (%)	X^2	GL	*p*
p53 Arg	16 (45,7)	11 (55)	46 (68,6)	96 (71,6)	9,61	3	0,02
p53 Pro	19 (54,3)	9 (45)	21 (31,4)	38 (28,4)			
Total	35 (100)	20 (100)	67 (100)	134 (100)			

As frequências genotípicas encontradas pela análise dos dados em *p53* foram: 17,14% (6/35), 35,0% (7/20), 46,3% (31/67) e 57,5% (77/134) para homozigotos *Arg/Arg*, 60% (21/35), 45,0% (9/20), 44,8% (30/67) e 29,1% (39/134) para heterozigotos *Arg/Pro* e 22,86% (8/35), 20,0% (4/20), 9,0% (6/67) e 13,4% (18/134) para homozigotos *Pro/Pro,* para NNM, NNB, NNN e os controles, respectivamente. De acordo com Teste de Kruskal Wallis (H), não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos das populações caso e controle, tendo p= 0,15. A distribuição das frequências genotípicas encontra-se na Tabela 20.

Tabela 20. Distribuição das frequências genotípicas entre as populações de pacientes e controle.

Genótipo	NNM n (%)	NNB n (%)	NNN n (%)	Controles n (%)	H	GL	*p*
p53 Arg Arg	6 (17,14)	7 (35,0)	31 (46,3)	77 (57,5)	5,21	3	0,15
p53 Arg Pro	21(60,0)	9 (45,0)	30 (44,8)	39 (29,1)			
p53 Pro Pro	8 (22,86)	4 (20,0)	6 (9,0)	18 (13,4)			
Total	35(100%)	20 (100%)	67 (100%)	134 (100%)			

As frequências alélicas para *p53Arg* apresentaram percentual elevado tanto nos casos quanto no grupo controle. A diferença estatística significativa (p= 0,02) pelo teste do χ^2 na distribuição das frequências alélicas de *p53Arg* entre os grupos analisados corroboram com evidências de que o alelo *p53Arg* é o mais comum nas populações Latino-Americanas (Gallo *et al.,* 2005). Adicionalmente, estudos têm relacionado o risco aumentado com o câncer de tiróide, a presença do alelo *p53Pro* (Boltze *et al.,* 2002; Granja *et al.,* 2004; Aral *et al.,* 2007).

A frequência do alelo *p53Arg* foi significativamente maior em ambos os grupos de pacientes NNB e NNN e grupo controle. De acordo com o Teste de *Odds Ratio* (Tabela 21), a comparação das frequências genotípicas dos pacientes NNM, NNB e NNN com o grupo controle demonstra que genótipo *p53ArgArg* apresenta menor risco nos pacientes com NNM, sugerindo que a presença da variante arginina em homozigose possua um efeito protetor contra a carcinogênese (OR:0,15, IC 95%: 0,06-0,39, p<0,0001).

O polimorfismo do códon 72 de *TP53* no éxon 4 é extensivamente estudado por causar impacto na sequência codificadora do gene, gerando variantes polimórficas com características bioquímicas e biológicas distintas, além de estar associado ao maior

risco de desenvolvimento de alguns tipos de cânceres (Thomas *et al.,* 1999; Dumont *et al.,* 2003; Lattuada *et al.,* 2004). Várias alterações celulares que podem culminar com o desenvolvimento de tumores vêm sendo estudadas em todo o mundo. Inúmeras pesquisas são publicadas anualmente objetivando associar tais modificações à iniciação, promoção e progressão dos cânceres humanos, incluindo o câncer de tiróide (Aral *et al.,* 2007; Rogounovitch *et al.,* 2006; Granja *et al.,* 2004 e Boltze *et al.,* 2002).

Tabela 21. Análise polimórfica de *TP53*^{72} e respectivas taxas de *Odds Ratio* (OR), Intevalo de Confiança 95% (IC 95%) e valor de *p* nos grupos caso e controle.

	Controles	**NNM**		
Genótipos	**n (%)**	**n (%)**	**OR (95% CI)**	***P***
Arg/Arg	**77 (57)**	**6 (17,14)**	**0,15 (0,06 – 0,39)**	**< 0,0001**
Arg/Pro	**39 (30)**	**21 (60,0)**	**1,21 (0,45 – 3,25)**	**0,89**
Pro/Pro	**18 (13)**	**8 (22,86)**	**0,17 (0,05 – 0,56)**	**0,005**
Total	134 (100,0)	35 (100,0)		
	Controles	**NNB**		
Genótipos	**n (%)**	**n (%)**	**OR (95% CI)**	***p***
Arg/Arg	**77 (57)**	**7 (35,0)**	**0,40 (0,15 – 1,06)**	**0,10**
Arg/Pro	**39 (30)**	**9 (45,0)**	**1,03 (0,29 – 3,9)**	**0,78**
Pro/Pro	**18 (13)**	**4 (20,0)**	**0,40 (0,10 – 1,59)**	**0,33**
Total	134 (100,0)	20 (100,0)		
	Controles	**NNN**		
Genótipos	**n (%)**	**n (%)**	**OR (95% CI)**	***p***
Arg/Arg	**77 (57)**	**31 (46,6)**	**0,52 (0,27 -0,98)**	**0,06**
Arg/Pro	**39 (30)**	**30 (44,7)**	**2,30 (0,81 – 6,5)**	**0,17**
Pro/Pro	**18 (13)**	**6 (8,7)**	**1,20 (0,43 – 3,22)**	**0,90**
Total	134 (100,0)	67 (100,0)		

O gene *TP53*^{72} está no centro de várias vias regulatórias celulares (Bojesen & Nordestgaard, 2008). As alterações de *TP53*^{72} já foram relacionadas ao maior risco para o desenvolvimento de inúmeras neoplasias e estão sendo incorporadas na avaliação prognóstica de tumores humanos, inclusive na susceptibilidade as DAIT (Chen *et al.,* 2008; Achatz *et al.,* 2007; Petitjean *et al.,* 2007; Savage *et al.,* 2006). A variante *p53Arg* é a mais eficiente na indução da apoptose, enquanto que a variante *p53Pro* induz o bloqueio do ciclo celular em G1 e a ativação de mecanismos de reparo p53-dependentes de forma mais eficaz (Bojesen & Nordestagaard, 2008; Dumont *et al.,* 2003; Thomas *et al.,* 1999).

Os poucos estudos publicados envolvendo o polimorfismo de *TP53*^{72} e a susceptibilidade ao câncer tiroideano foram descritas em quatro regiões diferentes: Turquia, Rússia, Brasil e Alemanha (Tabela 22). A análise de OR nos resultados

apresentados não revelou nenhum o genótipo como fator potencial ao risco de câncer de tiróide. No entanto, Rogounovitch *et al.* (2006) sugerem que o genótipo *p53 ArgPro* pode contribuir para o risco de CPT.

Aral *et al.* (2007), Granja *et al* 2004 e Boltze *et al* 2002 indicam que as frequências genotípicas comparadas entre os grupos caso e controle sugerem que o genótipo *p53Pro Pro* atue como fator de risco a carcinogênese tiroideana. Por outro lado, estes estudos também relatam que a presença do alelo arginina implica como um efeito protetor contra a carcinogênese, similarmente aos nossos achados em NNM quando em homozigose (OR: 0,15; p<0,0001).

Os dados sobre as frequências gênicas e genotípicas da literatura mundial são conflitantes em diversos sítios anatômicos, fato que pode ser atribuído às diferenças étnicas entre as populações estudadas. Além desses, outros fatores podem contribuir para a divergência de resultados nos mais variados estudos, incluem o tamanho amostral, o tipo de amostra utilizada como fonte de DNA, as técnicas de detecção utilizadas e as variações inter-laboratoriais dos protocolos usados (Almeida, 2008; Brenna *et al.,* 2004).

Tabela 22. Polimorfismo de *TP53*[72] associado ao câncer de tiróide.

n	Referência	Local	Grupo amostral	Método
1	Aral *et al*., 2007	Turquia	58 carcinomas tiroideanos 115 Controles	PCR
2	Rougounovitch *et al*., 2006	Rússia	116 CPT 313 Controles	PCR em tempo real
3	Granja *et al*., 2004	Brasil	21 CFT 77 CPT 44 NNB 14 AF	PCR
4	Boltze *et al*., 2002	Alemanha	30 Bócios 153 Controles 21 CPT 18 CFT 22 CAT 36 Tecido tiroideanos	PCR-RFLP

A oscilação ou deriva genética, atuando em conjunto com a seleção natural, envolve flutuações aleatórias nas frequências de alelos, devido a erros de amostragem, havendo a tendência de fixar-se um ou a outro alelo, especialmente em populações muito pequenas. Dessa maneira, a deriva genética também pode estar associada à discrepância dos resultados encontrados na literatura, uma vez que a estabilidade das

frequências alélicas varia conforme o tamanho das populações (Almeida, 2008). Os erros de amostragem podem ocorrer devido ao fato de se utilizarem populações relativamente pequenas, como as que incluímos em nosso trabalho.

No presente estudo, sugere-se que os indivíduos portadores do genótipo *p53 Arg Arg* apresentam um efeito protetor a carcinogênese. Por outro lado, os dados não apresentaram associação significativa entre as características clínicas-patológicas analisadas e um genótipo que atue como fator de risco a carcinogênese tiroideana.

A alta incidência de patologias da tiróide entre as mulheres é uma característica complexa a ser entendida. No entanto, fatores como o desequilíbrio dos hormônios femininos, poderiam explicar a alta incidência de desenvolvimento de nódulos tiroideanos entre as mulheres (Hernández *et al.,* 2003). Por outro lado, fatores nutricionais, especialmente as dietas deficientes de iodo, a exposição terapêutica a radiação (Lima *et al.,* 2007) e a falhas nos sistemas de controle do ciclo celular estariam associados com a carcinogênese tiroideana (Morari *et al.,* 2002), além do polimorfismo gênico.

5.4. Polimorfismo de *TP53* ^{72} e associação por meta-análise

Nesta proposta, além dos dados do polimorfismo no gene *TP53*^{72} para os casos NNM, foram selecionados 04 artigos sobre o polimorfismo, publicados entre os anos de 2000 a 2009 (Tabela 22). Os artigos analisaram o referido polimorfismo em carcinomas tiroideanos. Somente os estudos que atendiam aos critérios de inclusão e exclusão foram considerados (Figura 13).

Os artigos utilizados nesta meta-análise, publicados entre os anos de 2000 e 2009, e os dados do presente estudo, avaliaram o polimorfismo do gene *TP53*^{72} em grupos de pacientes com câncer de tiróide (3 artigos) e em controles saudáveis. O estudo de Boltze *et al*., 2002 foi excluído, devido o grupo controle ser amostras de DNA de tecido normal da tiróide e não de sangue periférico, como nos demais estudos, inclusive na proposta da presente análise. Os métodos de avaliação do polimorfismo gênico foram por PCR (2 artigos) e PCR em tempo real (1 artigo) [Tabela 22].

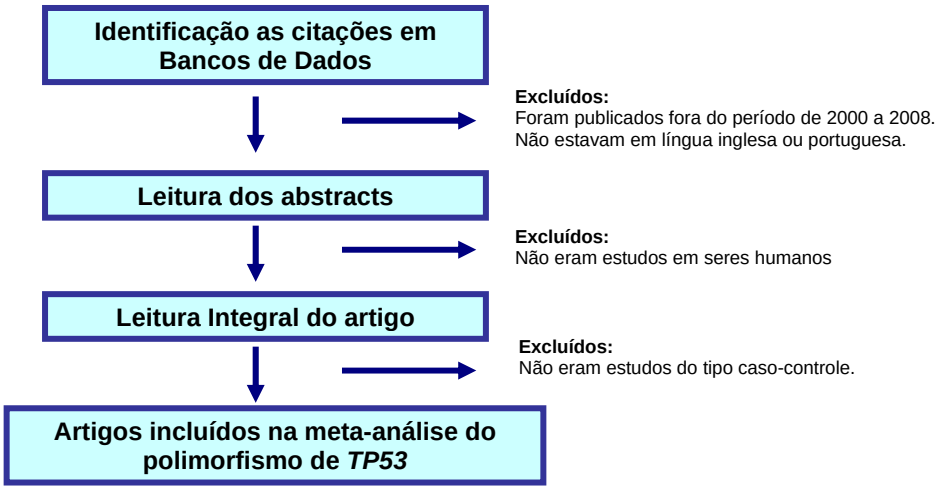

Figura 13. Critérios de identificação, inclusão e exclusão dos estudos da meta-análise (Adaptado de Silva, 2009).

Ao avaliar as frequências genotípicas, para os 346 pacientes do grupo caso, encontrou-se: 137 (37,9%) apresentaram o genótipo *p53Arg/Arg* (RR), 173 (80,3%) o genótipo *p53Arg/Pro* (RP) e apenas 50 (19,5%) o genótipo *p53Pro/Pro* (PP). No grupo controle, para os 715 participantes: 340 (50,3%) apresentaram o genótipo RR, 320 (41,6%) o genótipo RP e 55 (10,0%) o genótipo PP.

Todos os dados sobre o número de indivíduos por polimorfismo de $TP53^{72}$ (RR, RP e PP) e suas respectivas frequências relativas, para os grupos caso e controle, dos 3 estudos considerados podem ser vistos na Tabela 23.

Tabela 23. Distribuição do polimorfismo do gene $TP53^{72}$ em pacientes com carcinomas tiroideanos para os genótipos RR, RP e PP, nos grupos casos e controle de artigos publicados entre 2000 a 2009 e os dados do presente estudo.

	CASO							CONTROLE						
Referência	**RR**	***f***	**RP**	***F***	**PP**	***f***	**TOTAL**	**RR**	***f***	**RP**	***f***	**PP**	***f***	**TOTAL**
1	37	0.378	49	0.798	12	0.196	98	51	0.333	99	0.647	3	0.007	153
2	77	0.456	75	0.811	17	0.184	169	159	0.508	130	0.415	24	0.002	313
3	17	0.293	28	0.678	13	0.315	58	53	0.461	52	0.452	10	0.008	115
4	6	0.171	21	0.72	8	0.274	35	77	0.575	39	0.291	18	0.008	134
TOTAL	137	0.379	173	0.803	50	0.195	360	340	0.503	320	0.416	55	0.001	715

1: Granja *et al*., 2004; 2: Rogounovitch *et al.*, 2006; 3: Aral *et al.*, 2007; 4: Reis, 2010

O grupo de pacientes com câncer de tiróide variou entre 58 (Aral *et al.*, 2007), 169 (Rougonovitch *et al.*, 2006) e 98 indivíduos (Granja *et al.*, 2004). Sobre o grupo controle, os artigos trabalharam com indivíduos saudáveis, variando entre 115 (Aral *et*

al., 2007), 313 (Rougonovitch *et al.*, 2006) e 153 (Granja *et al.*, 2004). Agrupando todos os estudos, incluindo os dados do presente estudo, tem-se um total de 715 participantes.

Para cada agrupamento, foi aplicado o teste de *DerSimonian-Laird* (Ayres *et al*., 2007). As *Odds Ratios* foram calculadas com o agrupamento de todos os estudos para: RR x RP (OR = 0,63; IC95% = 0,31-1,30; *p*=0,22; Figura 14), RR x PP (OR = 0,31; IC95% = 0,15-0,63; *p*=0,0013; Figura 15) e RP x PP (OR = 0,53; IC95% = 0,24-1,16;*p*= 0,11; Figura 16). As análises indicaram diferenças estatísticas entre os grupos caso e controle RR X PP.

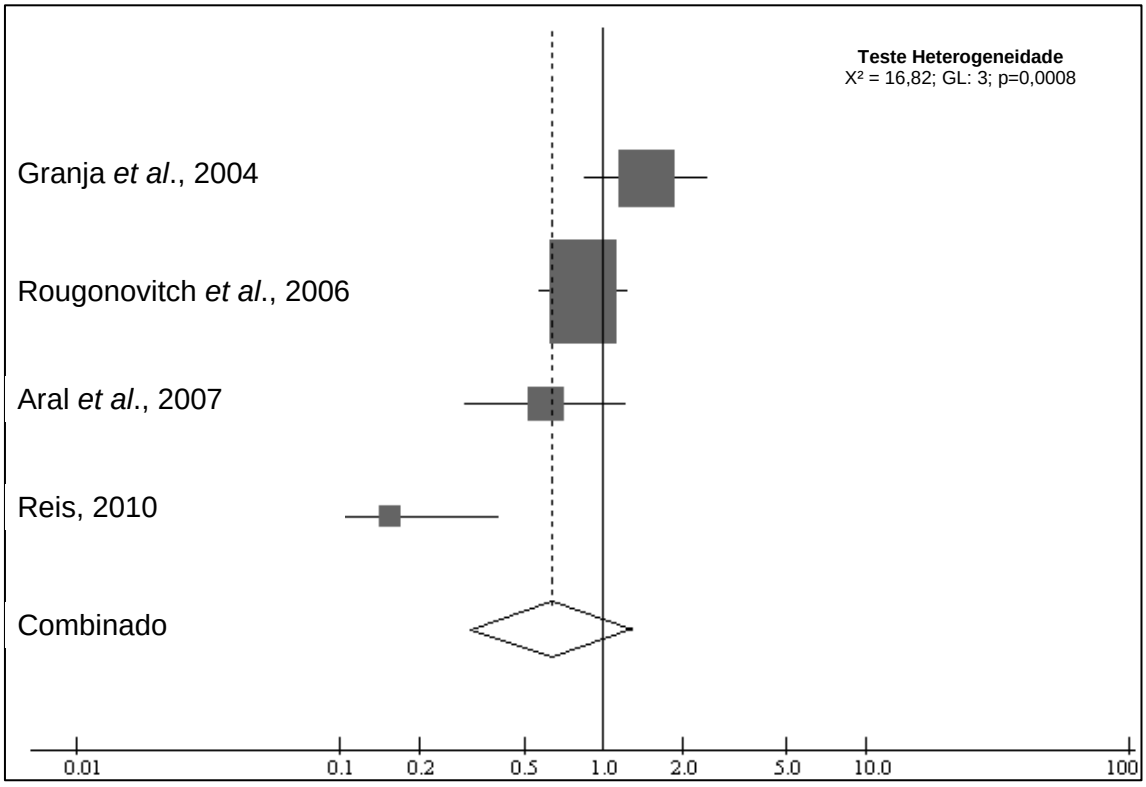

Figura 14. *Odds ratios* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RR e RP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade significativos (Teste de *DerSimonian-Laird*).

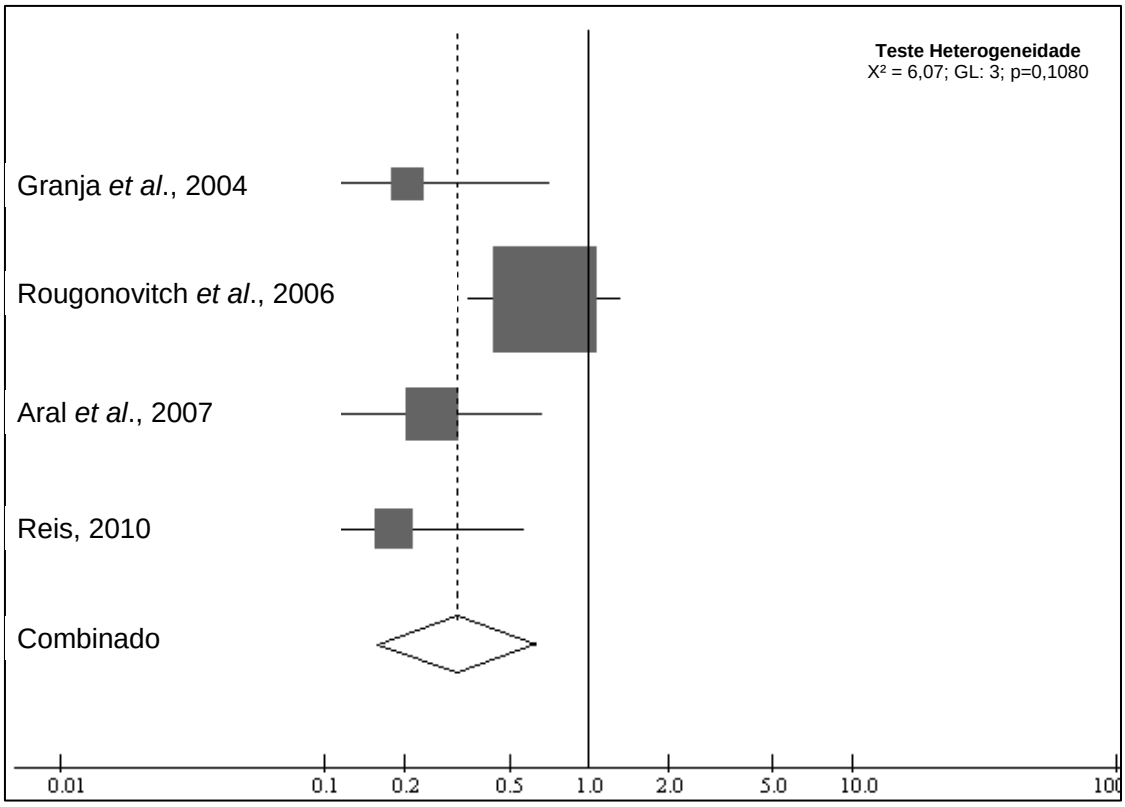

Figura 15. *Odds ratios* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RR e PP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade não significativos (Teste de *DerSimonian-Laird*).

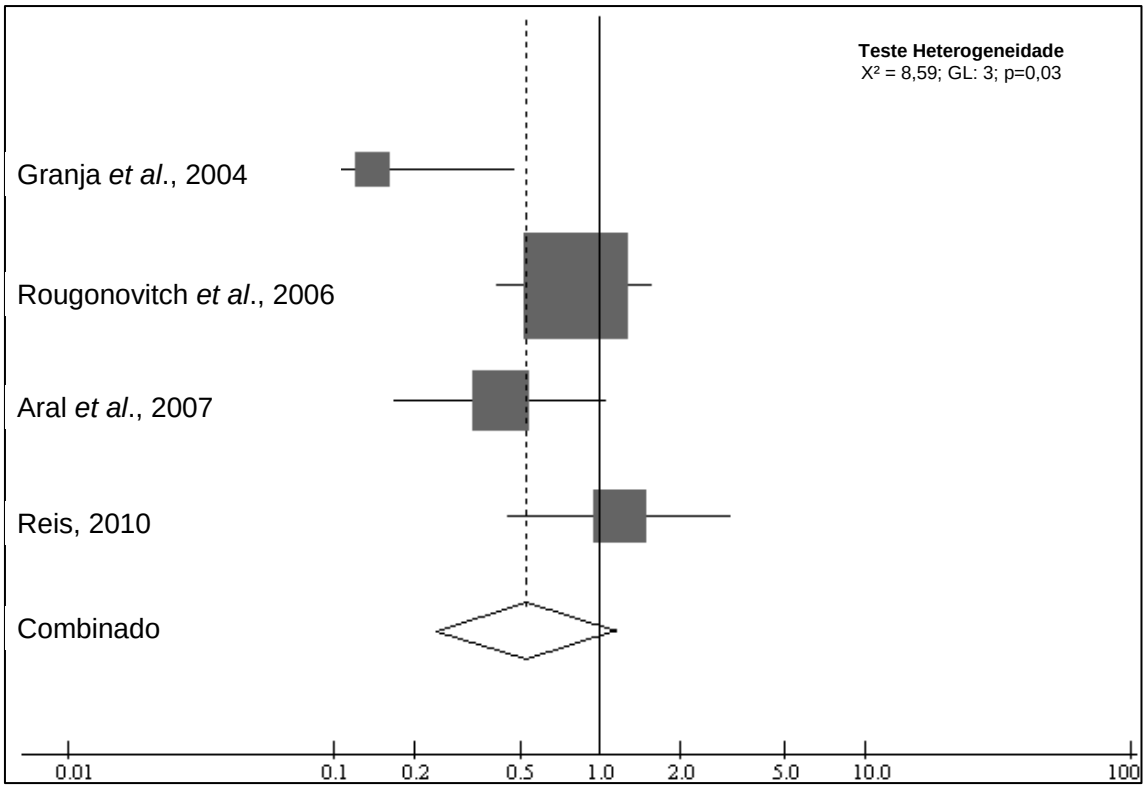

Figura 16. *Odds ratios* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RP e PP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade significativos (Teste de *DerSimonian-Laird*).

Na análise apresentada verificamos que os dados combinados RR X PP apresentaram o do valor de *p*=0,013, demonstrando uma significância abaixo da curva. No entanto, para os outros genótipos RR X RP e RP X PP as análises indicaram diferença entre os grupos.

Adicionalmente, os dados do polimorfismo de *TP53*^{72} foram agrupados em cada artigo, confrontando os valores de RR isolados com os valores de RP e PP unidos. Calculou-se as *Odds Ratios* (OR), a variação de OR dentro do intervalo de confiança de 95% e a probabilidade de significância (*p*) [Tabela 24]. Ao aplicar o teste de *DerSimonian-Laird* (Ayres *et al*., 2007), o OR dos trabalhos combinados (OR = 0,58; IC95% = 0,30-1,14; *p*=0,11) não indicou diferença entre os grupos estudados (Figura 17).

Tabela 24. Distribuição do polimorfismo do gene *TP53,* RR x RP e PP, em casos e controles dos artigos publicados entre 2000 a 2009 e os dados do presente trabalho.

	Casos		Controle		RR X RP
Referência	**RR**	**RP e PP**	**RR**	**RP e PP**	**OD (IC 95%) *p***
Granja *et al.*, 2004	37	61	51	102	1.23 (0.71-2.05) 0.56
Rougonovitch *et al.*, 2006	77	90	159	154	0.82 (0.56-1.20) 0.37
Aral *et al*., 2007	17	41	53	62	0.48 (0.24-0.95) 0.05
Reis, 2010	6	29	77	57	0.15 (0.05-0.39) <0.0001

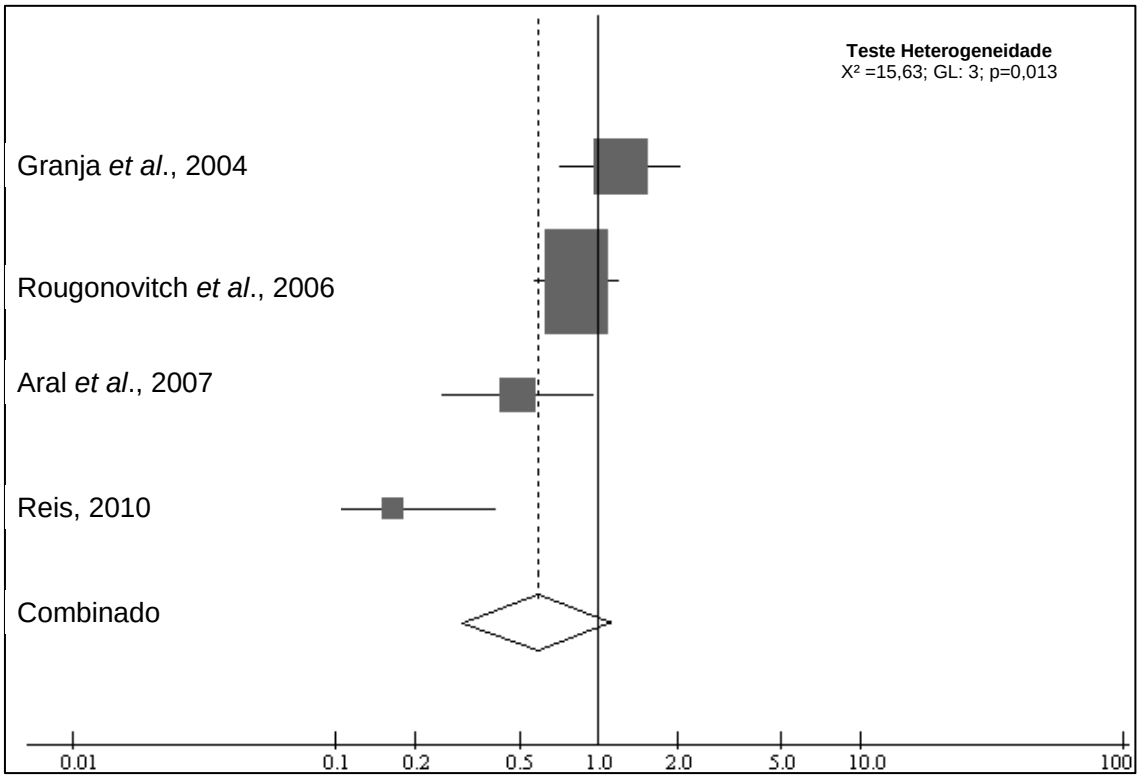

Figura 17. *Odds ratios* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre RR x RP+PP para os estudos com o teste do Qui-quadrado de heterogeneidade significativos (Teste de *DerSimonian-Laird*).

A meta – análise é definida como procedimento estatístico que consiste numa revisão quantitativa e resumida de resultados e estudos distintos, mas relacionados. O objetivo principal é comparar e possivelmente combinar os resultados de diferentes trabalhos publicados acarretando numa conclusão geral. Apesar dos poucos estudos envolvendo este polimorfismo e o câncer de tiróide, podemos ressaltar que a relação entre o genótipo e o fenótipo originado do polimorfismo gênico de *TP53*^{72} ainda não é suficientemente compreendido. Neste contexto, estudos futuros devem ser intensificados objetivando obter informações consistentes para determinarmos o perfil polimórfico, proporcionando assim a prevenção primária, sobretudo na neoplasia tiroideana.

6.Considerações Finais

6. Considerações Finais

A neoplasia tiroideana apresenta-se também como um nódulo tiroideano, achado clínico extremamente comum na população, mas que também é característico de outras doenças benignas da tiróide. Os recursos no serviço médico possibilitam determinar a diferença entre nódulo maligno e benigno. Certamente, o fator epidemiológico de maior relevância associado ao câncer de tiróide é a exposição à radiação ionizante. Entretanto, outros fatores genéticos e ambientais podem contribuir com o aumento da incidência desta particular neoplasia.

Neste contexto, a análise do polimorfismo para os genes envolvidos no metabolismo e detoxificação de xenobióticos demonstrou que as variantes de *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* avaliadas no presente estudo, demonstram que as combinações genotípicas não se mostraram associadas ao desenvolvimento de nódulos tiroideanos, seja ele benigno ou maligno.

Na análise das frequências genotípicas para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, observamos que o grupo caso (NNM, NNB e NNN) quando comparado ao grupo controle apresentou um percentual predominantemente maior de genótipos nulos para os genes avaliados. Concluímos que os genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1* contribuem para o risco de desenvolvimento de NNN em aproximadamente 4 vezes. E que o genótipo de *GSTT1* nulo possui risco relativo de 12 vezes e *GSTM1* de 2 vezes no desenvolvimento de NNB. Para NNM observamos que o genótipo nulo de *GSTM1* possui uma tendência estatística p=0,05 e risco de 2,79 vezes de desenvolver câncer de tiróide.

No polimorfismo de $TP53^{72}$ não ficou caracterizado um perfil genotípico para o risco de desenvolvimento do câncer de tiróide. Adicionalmente, o genótipo homozigoto selvagem apresentou-se como efeito protetor para NNM. Os estudos de associação do polimorfismo de *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* e $TP53^{72}$ no câncer de tiróide ainda são controversos. No entanto, para esta neoplasia em particular, os dados para o polimorfismo de $TP52^{72}$ revelaram heterogeneidade pela meta-análise. Embora, a maioria dos artigos associe a combinação genotípica *p53 Pro/Pro* como susceptível ao carcinoma tiroideano. Neste contexto, é importante ressaltar que o perfil polimórfico não é um fator independente para o desenvolvimento do câncer de tiróide, mas sim de diversas variáveis que atuam como um fator comum na carcinogênese.

7.Referências Bibliográficas

1. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. 1996. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. Cancer Lett. 1996; 10: 229-233.

2. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F *et al.* The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. CancerLett. 2007; 8 245(1-2): 96-102.

3. Adjadj E, Shlumberger M, Vathaire F. Germ-line DNA polymorphisms and susceptibility to differentiated thyroid cancer. Lancet Oncology. 2009; 10:181-190.

4. Almeida PSR. Polimorfismo do gene TP53 em sarcomas moles no adulto. Dissertação de Mestrado. 2008; Universidade Católica de Goiás. Goiânia, GO. 89p.

5. Aral C, Caglayab S, Ozisik G et al. The association of p53 codon 72 polynorphism with thyroid cancer in Turkish patients. Marm Med Jour. 2007; 20(1):1-5.

6. Arruda, V.R.; Grignoli, C.E.; Gonçalves, et al. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase *mu* (GSTM1) and *theta* (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? Clinical Genetics, 1998; 54:210-214.

7. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. Mut. Res. 2000; 16 (2): 65-76.

8. Ayres M, Ayres Jr. M, Ayres DL, Santos AS. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; 2007. 132-214 p.

9. Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A *et al*. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. Cancer Cell 2003; 3:387-402.

10. Berwanger O, Suzumura EA, Buehler AM, Oliveira JB. Como avaliar criticamente revisões sistemáticas e metanálises? Rev. Bras. Ter. Intensiva. 2007; 19(4):475-80.

11. Bojesen SE, Nordestgaard BG. The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans. Cell Cycle. 2008; 7(2):158-163.

12. Boltze C, Roessner A, Landt O et al. Homozygous proline at codon 72 of p53 as a potencial risk factor favoring the development of unidifferntiated thyroid carcinoma. Int J oncol. 2002; 21(5):1151-1154.

13. Bond GL, Levine AJ. A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans. Oncogene. 2007; 26(9): 1317-1323.

14. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de procedimentos do sistema de informações sobre mortalidade. Brasília: FUNASA, 2001.

15. Brasil. Ministério da Saúde/SAS/INCA. Atlas de mortalidade por câncer no Brasil (1979 – 1999) registros de base populacional, volume 3. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

16. Brenna SMF, Silva IDCG, Zeferino LC et al. Prevalence of codon 72 P53 polymorphism in Brazilian women with cervix cancer. Genet Mol Biol 2004; 27(4): 496-499.

17. Brix TH, Kyvik KO, Chridtensen K, Hegedus L. Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86: 930-4.

18. Bufalo NS. Estudo da relação entre o perfil genético de diferentes sistemas de defesa contra xenobióticos nas doenças neoplásicas e auto-imune da tiróide. [Dissertação de Mestrado] 2007; Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. 136p.

19. Bufalo NE, Leite JL, Guilhen AC, Morari EC, Granja F, Assumpcao LV, Ward LS. Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. Endocr Relat Cancer. 2006; 13(4):1185-93.

20. Bufalo NE, Santos RB, Cury AN, Andrade RA, Morari J, Morari EC, Leite JL, Monte O, Romaldini JH, Ward LS. Genetic polymorphisms associated with cigarette smoking and the risk of Graves' disease. Clin Endocrinol (Oxf). 2008; 68(6):982-7.

21. Bugano DD, Conforti-Froes N, Yamaguchi NH, Baracat EC. Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review. Eur J Gynaecol Oncol. 2008; 29(4):313-20.

22. Buyru, N., H. Tigli, N. & Dalay. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. Oncol Rep. 2003; 10 (3): 711-4.

23. Cascorbi IJ, Brockmoller & Roots IA. C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: Population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. Cancer Res. 1996; 56 (2): 4965-4969.

24. Castro IV. Oxifilia nas lesões nodulares da tireóide:classificação e relação com marcadores imunohistoquímicos e mutações nos genes *BRAF* e *RAS* e rearranjo PAX8-PPAR gama. [Tese Doutorado] 2006; Universidade de São Paulo. São Paulo-SP 158p.

25. Chen RH, Chang CT, Wang TY, Huang WL, Tsai CH and TsaiJ. P53 codon 72 proline/arginine polymorphism and autoimmune thyroid diseases. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2008; 22:321-326.

26. Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, et al. Incidência e mortalidade por câncer de tiróide no Brasil. Arq Bras Endocrinol Metab. 2005; 49(4):503-9.

27. Conforti NDT. Suscetibilidade genética ao câncer, p. 295-305. In: Ferreira CG & Rocha JC. Oncologia Molecular. Editora Atheneu. São Paulo- SP, 2004; p.469.

28. Cooper, D. S., Doherty, G. M., Haugen, B. R et al. Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Am Thy Ass. 2006; 16 (2), 5-8.

29. Cooper, GM. Cancer. In: A célula: uma abordagem molecular. Editora Artmed. Porto Alegre-RS, 2001; 2ª ed. p.654 a 658.

30. Curado, MP & Martins, E. Incidência e mortalidade dos cânceres de cabeça e pescoço no Brasil. Ver. Bras. Cir. Cabeça e Pescoço. 2006; 35(3):136-141.

31. Dalton TP, Dieter MZ, Matlib RS, Childs N, Shertzer HG et al. Targeted knockout in the Cyp1a1 gene does not alter hepatic constitutive expression of other genes in the mouse [Ah] battery. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 312 (3): 184–189.

32. Dean, D S. & Gharib, H. (2008) Epidemiology of thyroid nodules. *Best* Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2008; 22(6):901-911.

33. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU et al. (Eds). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. IARC Press, Lyon, France (2004).

34. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. Controlled Clin Trials 1986; 7:177-88.

35. Di cristofaro J, Marcy M, Vasko M et al. Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant. Human Pathol. 2006; 37:824-83.

36. Donehower LA. p53: guardian and suppressor of longevity? Experimental Gerontology 2005; 40(1-2):11-5.

37. Duarte RLM & Paschoal MEM. Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. J. Bras. Pneumol. 2005; 32 (1): 56-65.

38. Duell EJ, Holly E A, Bracci PM, Lui M, Wiencke JK and Kelsey KT. A population based, case-control study of polymorphism in carcinogen metabolizing genes smoking and pancreatic adenocarcinoma Risk. J Nat Ca Institute. 2002; 94 (4): 297-306-306.

39. Dumont P, Leu JI, Della Pietra III AC, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potencial. Nat Genetics 2003; 33: 357-365.

40. Eng C, Mulligan LM, Healey CS et al. Heterogeneous mutation of the RET proto-oncogene in subpopulations of medullary thyroid carcinoma. Cancer Res. 1996; 56, 2167–2170.

41. Espinosa AV, Porchia, L Ringel MD. Target Braf in Thyroid cancer. Brit J Cancer 2007; 96:16-20.

42. Fagin JA and Mitsiades N, Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinicla implications Best Pract and Res Clinl Endocrinol& Met. 2008; 22(6):955-969.

43. Ferreira G &. Rocha JC. Susceptibilidade genética ao câncer Oncologia Molecular. Editora Atheneu. São Paulo, SP. 2004, 295 p.

44. Gallo CVM, Mendonça GAS, Moraes E, Olivier M, Hainaut P. *TP53* mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin América: Current knowledge and perspectives. Mutat Res. 2005; 589(3): 192-2007.

45. Gao M, Li XL, Yu Y, Sun BC, Li SL, Xu WG et al. Progress of clinical pathology and application of RET-CT on thyroid carcinoma. 2006; 41(6):419-24.

46. Gaspar J, Rodrigues S, Gil OM, Manita I, Ferreira TC, Limbert E, Gonçalves L, Pina JE, Rueff J. Combined effects of glutathione S-transferase polymorphisms and thyroid cancer risk. Cancer Genet Cytogenet. 2004; 151(1):60-7.

47. Golbert L, Wajner SM, da Rocha AP, Maia AL, Gross JL. Carcinoma diferenciado da tiroíde: avaliação inical e acompanhamento Arq Bras Endocrinol Metab. 2005; 49 (5):701-710

48. Gonçalves AJ, Monte O, Morari EC, Ward LS et al. Sistema glutationa S-Transferase como fator prognóstico no carcinoma papilífero da tiróde. Rev Ass Med Bras. 2009; 55(3):279-282.

49. Gonçalves AJ, Carvalho LH, Serdeira K, Nakai MY, Malavasi TR. Comparative analysis of the prevalence of the glutathione S-transferase (GST) system in malignant and benign thyroid tumor cells. São Paulo Med J. 2007; 125(5):289-91.

50. González MV, Alvarez V, Pello MF et al., Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase-M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. J. Clin. Pathol. 1998; 51 (5): 294–298.

51. Granja F, Morari EC, Correa LA, Assumpção LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. Cancer Lett. 2004; 210(2):151-157.

52. Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS, Moussai D. Diamond B. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. J Clin Invest. 2002;109:1625-33.

53. Guembarovski RL. Análise de associação dos genes CYP1A1, GSTM1, GSTT1 e da perda de heterozigose em 3p em portadores de carcinomas bucais. [Tese de Doutorado] 2007; Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR. 151 p.

54. Hayashi SI, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene. Nuc Ac Res. 1991; 19:4797.

55. Hegedüs, L. The thyroid nodule. The New Eng J Med. 2004; 351: 1764-71.

56. Hegedüs L, Bonnema SJ and Bennedbæk FN. Management of Simple Nodular Goiter: Current Status and Future Perspectives. Endocrinol Rev. 2003; 24 (1): 102-132.

57. Hernández A, Céspedes A, Xamena N et al. Glutathione S-transferase polymorphisms in thyroid cancer patients. Can lett. 2003; 190:37-44.

58. Hernández A, Xamena N, Surrallés J, Galofré P, Velázquez A, Creus A, Marcos R. Role of GST and NAT2 polymorphisms in thyroid cancer. J Endocrinol Invest. 2008; 31(11):1025-31.

59. Hirvonen A, Husgafvel-Pursianen K, Karjalainen A et al Point mutation MspI and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene: lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention. 1992; 2:485-489.

60. Ho T, Zhao C, Zheng R, Liu Z, Wei Q, Sturgis EM. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of differentiated thyroid carcinomas: a case-control analysis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006; 132(7):756-61.

61. Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature. 2001; 4(11): 366-374.

62. Ingelman-Sundberg, M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. Mutat. Res. 2001; 482: 11-19.

63. Iwata C, Kano MR, Komuro A et al. Inhibition of Cyclooxygenase-2 Suppresses Lymph Node Metastasis via Reduction of Lymphangiogenesis. Can Research 2007; 67:101-81.

64. Jacobson EM, Tomer Y. The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: back to the future. J Autoimmun. 2007; 28:85-98

65. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, et al. Influence of the BRAF V600E Mutation on Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Papillary Thyroid Cancer. J Clin Endocrinol Metabolism 2006; 91(9): 3667-3670.

66. Jong MM, Nolte IM, Meerman G J, et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in cancer susceptibility. J. Med. Genet. 2002;39 : 225-242.Jong MM, Nolte IM, Meerman G J, et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in cancer susceptibility. J. Med. Genet. 2002; 39: 225-242.

67. Knauf JA, Fagin JA. Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. Curr Opin Cell Biol. 2009; 21(2):296-303.

68. Kent WDT, Hall SF, Isotalo PA, Houlden RL, Geroge RL, Groome PA. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. Canadian Med Assoc or its licensors. 2007; 177 (11): 1357-1361.

69. Lattuada D, Vigano P, Somigliana E, Abbiati A, Candiani M, Di Blasio AM. Analysis of the códon 72 polymorhpism of the TP53 in patients with endometriosis. Mol Hum Reprod 2004; 10(9): 651-654.

70. Leichsenring, A. Investigação de polimorfismos dos genes CYP1A1 e GSTP1 em portadores de tumores de cavidade bucal. [Dissertação de Mestrado] 2005; Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR. 81 p.

71. Lemos MC, Coutinho E, Gomes L, Carrilho F, Rodrigues F, Regateiro FJ, Carvalheiro M. Combined GSTM1 and GSTT1 null genotypes are associated with a lower risk of papillary thyroid cancer. J Endocrinol Invest. 2008; 31(6):542-5.

72. Lima MA, Fagundes TA, Raffaeli AM, Ferreira BP, Resende EM, Fonseca ECR, Borges MF. Alcooalização de nódulo tiroideano em região endêmica de bócio colóide. Arq Bras Endocrinol e Met 2007; 51 (6):1007-1012.

73. Lin JD. Papillary thyroid carcinoma with lymph node metastases Growth Factors. 2007; 25(1):41-9.

74. Liu H, Yang Y, Xiao J, Yanhong LV, Yang H, Zhao L. imibithion of cyclooxygenase-2 suppress lymph node metastasis via VEGF-C. The Anatomic Record 2009; 292:1577-1583.

75. Machens AMD, Niccoli-Sire PMD *et al.* Early Malignant Progression of Hereditary Medullary Thyroid Cancer. The New Eng Jour Med. 2003; 349:1517-1525.

76. Maciel RMB, Kimura ET, Cerutti JM. Patogênese dos tumores diferenciados de tireóide (papilar e folicular). Arq Bras End e Met. 2005; 4(5):691-700.

77. Magalhães PKR, Castro M, Elias LLK, Maciel LMZ. Carcinoma medular de tiróide: da definição às bases moleculares. Arq Bras Endocrinol Met. 2003; 47(5):515-528.

78. Manfredi S, Calvi D, del Fiandra M, Botto N, Biagini A, Andreassi MG. Glutathione S-transferase T1- and M1-null genotypes and coronary artery disease risk in patients with Type 2 diabetes mellitus. Pharmacogenomics. 2009;10(1):29-34.

79. Marques CF, Koifman S, Koifman RJ et al., Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: results from a case-control study in Rio de Janeiro. Oral Oncol. 2006, 42:(6): 632-637

80. Masson, LF, Sharp L, Cotton SC & Little J. Cytochrome P-450 1A1 Gene Polymorphisms and Risk of Breast Cancer: A HuGE Review. Am. J. Epidemiol. 2005; 22 (161): 901–915.

81. Matsuo SE, Martins L, Leoni SG, Hajjar D, Ricarte-Filho JCM, Ebina KN, Kimura ET. Marcadores Biológicos de tumores tiroideanos. Arq Bras Endocrinol Metab 2004; 48(1):114-125.

82. Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, Jones PW, et al. 1998. Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco- related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. Pharmacogenetics. 1998; 8(9):91-100.

83. Mishra A, Agrawal V, Krishnani N, Mishra SK. Prevalence of RET/PTC expression in papillary thyroid carcinoma and its correlation with prognostic factors in a north Indian population. J Postgrad Med. 2009; 55(3):171-5.

84. Morari CE, Leite JLP, Granja F, da Assumpção LV, Ward LS. The null genotype of glutathione S-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002; 11:1485-1488.

85. Nair S & Pillai MR. Human Papilloma Virus, cellular genetics and susceptibility to cervical cancer. Int J Hum Genet. 2005; 5(1): 11-17.

86. Nakajima M, Yoshida R, Shimada N et al. Inhibition and inactivation os human cytochome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate. Drug Metab Dispos. 2001; 29(8): 1110-1113.

87. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. Mod Pathol 2008; 21 (2):S37-43.

88. Nikiforov YE. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. Endocr. Pathol. 2004; 15, 319-327.

89. Nix P, Nicolaides A, Coatesworth AP. Thyroid cancer review 1: presentation and investigation of thyroid cancer. Int Journal Clin Pract. 2005; 59(11):1340–1344.

90. Oliveira MVP. Implicações do Polimorfismo do Códon 72 do gene p53 no Carcinoma Laríngeo. [Dissertação de mestrado] 2005; Universidade Federal de Goiás. 150 p.

91. Pani MA, Regulla K, Segni M, et al. Vitamin D 1alpha-hydroxylase (CYP1alpha) polymorphism in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and type 1 diabetes mellitus. Eur J Endocrinol. 2002; 146(6):777-81.

92. Parmigiani RB, Camargo AA. O Genoma Humano e o Câncer. In: Ferreira CG; Casali JC. Oncologia Molecular. Editora Atheneu. 2004; 1ed. 3-1, São Paulo-SP.

93. Petitjean A, Achatz MIW, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene 2007; 26(15): 2157-2165.

94. Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. Oncogene. 2006; 3 (25): 1602-11.

95. Pinchot SN, Kunnimalaiyaan M, Sippel RS and Chen H. Medullary Thyroid Carcinoma: Targeted Therapies and Future Directions J Oncol. 2009; 183031 ID.

96. Prummel MF, Strieder T, Wiersinga WM. The environment and autoimmune thyroid diseases. Eur J Endocrinol. 2004; 150:605-18.

97. Puxeddu E, Mitsutake N, Knauf JA, Moretti S et al. Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 is induced by conditional expression of RET/PTC in thyroid PCCL3 cells through the activation of the MEK-ERK pathway. Biol Chem. 2003; 26; 278(52):52131-8.

98. Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. Pathophysiol. 2009; 23.

99. Raue F, Frank-Raue K, Grauer A. Multiple endocrine neoplasia type 2. Clinical features and screening. Endocrinol Metab Clin North Am. 1994; 3:37-56.

100. Reis DSM, Morihisa IA, Medeiros KC, Fernandes LM et al. Cancer de tireóide em Goiânia: estudo descritivo de base populacional no período de 1988 a 2003. Rev Bra de Cir Cab e Pes. 2008; 37(2):62-66.

101. Ribeiro Jr U, Safatle-Ribeiro AV. p53 in clinical contexts: yes or not? Arq Gastroenterologia. 2006; 43(1):6-7.

102. Ribeiro L. R., D. M. F. Salvadori, E. K. Marques. 2003. Mutagênese Ambiental. Editora Ulbra. 2003; Canoas-RS. 356p.

103. Rigual NR, Anderson GR, Loree TR, Wiseman S, Alrawi S, Stoler DL. Molecular prognosticators and genomic instability in papillary thyroid cancer. Laryngoscope. 2005; 115(8):1479-85.

104. Rocha AB & Regner A. Transdução de Sinais. IN: Ferreira CG e Rocha JC. Oncologia Molecular. Editora Atheneu. 2004; p.77 a 85.

105. Rogounovitch TI, Saenko VA, Ashizawa et al. TP53 codon 72 polymorphism in radiation-associated human papillary thyroid cancer. Oncol Rep. 2006; 15(4):949-956.

106. Rossit A &. Conforti-Froes NC. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. Rev Soc Bras Cancerol. 2001; 10 (32): 26-31.

107. Rouissi K, Ouerhani S, Marrakchi R et al. Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-

transferases M1 and T1 on bladder cancer in a Tunisian population. Cancer Genet Cytogenet. 2009; 15-190(2):101-7.

108. Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. Oncogene 2001; 2(20):3156-3165.

109. Royston D, Jackson DG. Mechanisms of lymphatic metastasis in human colorectal adenocarcinoma.J Pathol. 2009; 217(5):608-19.

110. Rybicki B, Neslund-Dudas Nock CNL, Schultz LR et al. Prostate cancer risk from occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons interacting with the GSTP1 Ile105Val polymorphism. Cancer Detec and Prevent. 2006; 30(5):412-22.

111. Santiago, C, Bandrés F, Gómez-Gallego F. Polimorfismos de citocromo P450: papel como marcador biológico. Medicina del Tabajo. 2002; 11(3): 130-140.

112. Sato T., T. Izumo & T. Amagasa. 2Genetically high suceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes. Oral Oncol. 2000; 3(6): 267-271.

113. Savage SA; Burdett L; Troisi R; Douglass Germ-Line Genetic Variation of TP53 in Cancer. 2006 DOI 10.1002/pbc.21077

114. Sgarbi JA, Maciel RMB. Patogênese das doenças tiroidianas autoimunes. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009; 53(1):5-14.

115. Siironen P, Ristimäki A, Narko K, *et al.* VEGF-C and COX-2 expression in papillary thyroid cancer. Endocr Relat Cancer. 2006; 13(2):465-73.

116. Siironen P, Ristimäki A, Nordling S, Louhimo J, Haapiainen R, Haglund C. Expression of COX-2 is increased with age in papillary thyroid cancer. 2004 Histopathology.May; 44(5):490-7.

117. Silva AMTC. O polimorfismo do gene *P53* $^{72\ (RP)}$ no câncer de cabeça e pescoço: estudo da associação e meta-análise. [Tese de Doutorado] 2010.Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO.89 p.

118. Silva Júnior, R. L. Implicações dos polimorfismos genéticos de CYP1A1, GSTM1 E GSTT1 na suscetibilidade do carcinoma espinocelular da laringe. [Dissertação de Mestrado] 2008; Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO.163 p.

119. Siraj AK, Ibrahim M, Al-Rasheed M, Abubaker J *et al*. Polymorphisms of selected xenobiotic genes contribute to the development of papillary thyroid cancer susceptibility in Middle Eastern population. BMC Med Genet. 2008; 5: 9:61.

120. Song N, Tan W, Xing D, Lin D. CYP1A polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China. Carcinog. 2001; 22 (1):11-16.

121. Sourvinos G, Rizos E, Spandidos DA. p53 Codon 72 polymorphism is linked to the development and not the progression of benign and malignant laryngeal tumours. Oral Oncol. 2001; 37(7):572-8.

122. Sprenger, R; Schlagenhaufer, R; Kerb, R; Bruhn, C; Brockmoller, J, Roots, I; Brinkmann, U. Characterization of glutathione S-transferase GSTT1 deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotypephenotype correlation. Pharmacogenetics 2000; 10: 557-565.

123. Sreea L, Syamala V, Hariharan S et al. Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms: susceptibility and outcome in lung cancer patients. Exp Ther Oncol. 2008; 7(1):73-85.

124. Stankov K, Landi S, Gioia-Patricola L, Bonora E, Volante M, Papotti M, Romeo G. GSTT1 and M1 polymorphisms in Hürthle thyroid cancer patientsCancer Lett. 2006; 240(1):76-82.

125. Suk Y, Li S, SongJH, Kwon KH et al., Influence of the BRAF V600E on Expression Endothelial Growth Factor in papillary thyroid cancer. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2006; 91(9):3667-3670.

126. Sywak M, Pasieka JL e Ogilvie T. A review of thyroid cancer with intermediate differentiation. Journal of Surgical Oncology. 2004; 86:44-54.

127. Taylor JC, Gough SC, Hunt PJ, Brix TH et al. A genome-wide screen in119 relative pairs with autoimmune thyroid disease. Journal of Clin Endocrinol and Metabolism 2006; 91:646-653.

128. Tiwari AK, Prasad P, B K T, Kumar KM, Ammini AC, Gupta A, Gupta R. Oxidative stress pathway genes and chronic renal insufficiency in Asian Indians with Type 2 diabetes. J Diabetes Complications. 2009; 23(2):102-11.

129. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two Polymorphic Variants of Wild-Type p53 Differ Biochemically and Biologically. Mol Cell Biol 1999; 19(2): 1092-1100.

130. Tunstall RG, Sharma RA, Perkins S *et al.* Cyclooxygenase-2 expression and oxidative DNA adducts in murine intestinal adenomas: Modification by dietary curcumin and implications for clinical trials. European J Cancer. 42: 415-421, 2006.

131. Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, et al. Activation and localization correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. Jour Med Genetics. 2004:41:161-170.

132. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. Nature. 2008; 7:979-87.

133. Vineis, P, Veglia F, Anttila S, et al. CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and lung cancer: a pooled analysis of gene interactions. Biomarkers, 2004; 9: 298-305.

134. Volante M, Collini P, Nikiforov YE et al. Poorly differentiated thyroid carcinoma: the turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. Am. J. Surg. Pathol. 2007; 31, 1256-1264.

135. Ward LS & Assumpção LVM. Câncer diferenciado da tiróide: Fatores prognósticos e tratamento. Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48(1):126-136.

136. Ward LS. Epidemiologia do câncer de tiróide no Brasil: apontando direções na política de saúde do país. Arq Bras Endocrinol Metab, 2005; 49(4):474-6.

137. Weinberg RA. Manutenção da integridade genômica e o desenvolvimento de câncer –genomas celulares estão sob ataque ocasional de mutágenos e seus metabólitos. In: A biologia do câncer. Porto Alegre –RS: Editora Artmed, 2008. Cap12. 483-490p.

138. Woichiechwska K & Lewinski A. Braf mutation in papillary thyroid carcinoma. Endocrine Regulations. 2006; 40:129-138.

139. Wünsch Filho V & Zago MA. Modern cancer epidemiological research: genetic polymophisms and environment. Rer Saud Pub. 2005; 39(3):490 - 497.

140. Xing D, Tan W, Lin D. 2003. Genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer among Chinese population. Oncol Reporters. 2003; 10: 1615-1623.

141. Xing, M. Braf mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases and clinical implications. Endocrine Reviews 2007; 28(7):742-762.

142. Yalin S, Hatungil R, Tamer L, Ates NA, Dogruer N, Yildirim H, Karakas S, Atik U. Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Turkish patients with diabetes mellitus. Cell Biochem Funct. 2007; 25(5):509-13.

143. Yun C, Park H, Kim S, Kim H. Identification of cytochrome P450 1A1 in human brain. 1998. Bioch Bioph Res Communications. 1998; 243: 88-810.

144. Yuspa S.H. Overview of carcinogenesis: past, present and future. Carcinogenesis. 2000; 7 (21): 341-344.

145. Zafereo ME, Sturgis EM, Aleem S, Chaung K, Wei Q, Li G. Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of second primary malignancy after index squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Prev Res (Phila Pa). 2009; 2(5):432-9.

8.Anexos

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG)

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

CEP/ACCG – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

PROTOCOLO CEPACCG Nº 025/07 **Goiânia, 13/09/2007**

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Biom. Prof. Aparecido Divino da Cruz, Ângela Adamski da Silva Reis, Caroline Dias Monteiro, Vera Aparecida Saddi e Leonardo Barcelos de Paula

TÍTULO: Polomorfismo de Arginina e prolina no Códon 72, do Gen TP53, nos Tumores Papilíferos da Tireóide

Área Temática: Genética Humana
Local de Realização: UCG – Núcleo de Pesquisas Replicon e Hospital Araújo Jorge/Setor de cabeça e Pescoço

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e *aprovou *com recomendação*** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

***Recomendamos:** Apresentação de termo de compromisso e informação no termo de consentimento livre e esclarecido de que as amostras de sangue periférico dos pacientes serão utilizados somente para esta pesquisa e não serão armazenados para pesquisas futuras..

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

DR. GERALDO SILVA QUEIROZ
Coordenador do CEP/ACCG

Rua 239 nº 181- Setor Universitário – Goiânia - Goiás CEP.74 605-070
Fone: (62) 3243-7050

PROTOCOLO CEP/ACCG Nº 053/09 **Goiânia, 05/11/2009**

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Biomédica: Ângela Adamski da Silva Reis.

Orientador: Biomédico Prof. Aparecido Divino da Cruz

TÍTULO: "Polimorfismos genéticos associados aos nódulos tiroideanos".

Área Temática: Grupo I – Genética Humana
Área de Conhecimento: Ciências da Saúde
Local de Realização: Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, **relatórios semestrais** do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).

Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi
Coordenadora do CEP/ACCG

ACCG
ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS
(62) 3878-7000 | 3243-7000
Rua 239, nº 206, St. Universitário
Goiânia - Goiás - Brasil - CEP 74.605-070
www.accg.org.br

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu,_____,RG:-_____, CPF:_____, nº de matricula _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **"POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AOS NÓDULOS TIROIDEANOS"** sob a responsabilidade do Drª. Angela Adamski da Silva Reis como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador_____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação.Foi me garantido que posso tirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento,assistência e tratamento.

Hospital Araújo Jorge

Data / /

_____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável

Assinatura Dactiloscópica :

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecido sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (Não vinculadas à equipe de pesquisa):

_____

_____

Nome: Nome:

Anexo 2.

2.1. Protocolo de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE 8%)

Todos os géis utilizados para separar os fragmentos de DNA, amplificados por PCR em *CYP1A1m1*, *CYP1A1m2* e *p53* foram de poliacrilamida a 8%. Para a realização da eletroforese submeteram-se os géis a uma voltagem constante de 10V/cm, por um tempo médio de 4h em TBE 1X. Em cada canaleta foram aplicados cerca de 10µL de amostra amplificada com 3µL de corante de corrida. Depois de realizada a corrida eletroforética, os géis foram corados utilizando a técnica de colaração por Nitrato de Prata ($AgNO_3$) ou por Brometo de Etídeo e em seguida as imagens foram capturadas para análise da amplificação.

A acrilamida é um monômero neurotóxico potente com ação cumulativa. O brometo de etídeo é uma substancia altamente mutagênica e carcinogênica. Por isso, para trabalhar com acrilamida e brometo de etídeo é necessário utilizar todos os procedimentos de segurança. O gel de poliacrilamida é o recomendado para o tamanho dos fragmentos esperados, pois permitem a separação de fragmentos de até 500pb

Tabela 23. Protocolo de preparação do gel de poliacrilamida a 8%

Gel para cuba de 45 mL	
Reagentes	**Volume**
Acrilamida 40%*	9,0 mL
TBE 10X	4,5 mL
H2O dd	31,5 mL
APS 10%	450 µL
TEMED	45µL

*Para a confecção da acrilamida a 40% acrescenta-se acrilamida e bis-acrilamida em uma proporção de 19:1 ou 38g de acrilamida para 2 g de bis - acrilamida q.s.p. 100mL

2. 2. Soluções utilizadas

2.2.1 TRIS-Borato de EDTA (TBE 10x)

- Tris Base 108 g
- Ácido Bórico 55 g
- EDTA 0,5 M (pH 8.0) 40 ml.
- H_2Odd q.s.p 1 litro

2.2.2. EDTA 0,5M pH (8.0)

- EDTA (p.m. 372,24) 186.12 g
- H_2Odd q.s.p 1000 ml
- Controle o pH com NaOH (20 g de NaOH)

2.2.3. Persulfato de Amônia (APS 10%)

- APS 10 g
- H_2Odd q.s.p 100 ml

2.2.4. Corante de corrida 6X

- Azul de Bromofenol 0,25%
- Xileno Cianol FF 0,25%
- Ficol tipo 4000 15%
- EDTA 120mM

2.2.5. Tampão de Eletroforese

Usa-se o tampão de corrida TBE 1X produzido a partir do tampão stock TBE 10x.

2.3. Método de Coloração Rápida por Nitrato de Prata ($AgNO_3$)

- Solução de Fixação 25:1 (Preparo no momento do uso)

Reagentes	*Volume*
Álcool Etílico P.A.	50 mL
Ácido Acético P.A	2 mL
Água deionizada	248 mL
Volume Final	**300 mL**

Solução de Nitrato de Prata ($AgNO_3$) a 15%

Reagentes	Volume
Nitrato de Prata (estoque)	7,5g
Água deionizada (q.s.p.)	50 mL
Volume Final	**50 mL**

- Solução de Revelação (Preparo no momento do uso)

Reagentes	Volume
NaOH 30%	15mL
Formaldeído a 37%*	2 mL
Água deion. (q.s.p.)	183 mL
Volume Final	**200 mL**

* Adicionar o Formaldeído somente no instante da revelação.

2.3.1. Procedimento:

1. Depositar o gel sobre um recipiente limpo e seco contendo 150mL de Solução de Fixação;
2. Adicionar 2mL da Solução de Nitrato de Prata sobre a solução e agitar por 5 minutos;
3. Desprezar a Solução de Fixação, segurando o gel com os dedos. Lavar 2X com água deionizada por 20 segundos cada lavagem;
4. Adicionar a Solução de Revelação com cuidado, aplicando na parede do recipiente sem manchar o gel; Aguardar a revelação das bandas por cerca de 5 minutos.
5. Desprezar a Solução de Revelação e adicionar a Solução de Fixação (150mL) e aguardar até o momento de captura de imagens e/ou secagem do gel.

Anexo 3. Dados brutos, idade, sexo, tipo de nódulo e análise polimórfica

3.1. Nódulos Neoplásicos Malignos

ID	Idade	sexo	prontuário	Tipo - maligno	P53	GSTT1	GSTM1	CYP1a1m1	CYP1a1m2
Ty-001	66	2	200105984	Ca folicular	A/P	0	1	T/T	A/G
Ty-106	57	1	2001103626	ca folicular	P/P	0	0	T/C	A/G
Ty-059	34	2	2000110944	ca medular	A/P	0	0	T/C	A/A
Ty-126	33	1	2002100059	ca medular	A/P	0	1	T/C	A/A
Ty-004	35	2	92105541	Ca papilar	A/P	1	1	T/T	A/A
Ty-009	21	1	2000107061	Ca papilar	A/P	1	1	T/T	A/G
Ty-022	64	2	2000108185	ca papilar	P/P	0	0	T/C	A/A
Ty-024	58	1	2000107531	Ca papilar	A/A	0	0	T/C	A/A
Ty-026	36	1	2000108622	Ca papilar	A/A	0	1	T/T	A/A
Ty-034	83	2	2000109521	Ca papilar	A/A	1	0	T/T	A/G
Ty-038	45	2	1996105613	Ca papilar	P/P	0	1	T/T	A/G
Ty-039	43	2	2000109836	Ca papilar	P/P	1	1	T/C	A/A
Ty-043	41	2	2000110047	Ca papilar	A/P	0	0	T/T	A/A
Ty-046	52	2	2000110407	Ca papilar	A/P	1	0	T/C	C/C
Ty-047	43	2	2000109359	Ca papilar	A/P	1	1	T/C	A/A
Ty-056	21	2	2001110573	Ca papilar	P/P	0	0	T/T	C/C
Ty-062	55	2	2000111117	ca papilar	A/A	0	0	T/T	C/C
Ty-075	46	2	2000011428	Ca papilar	A/P	1	0	T/T	A/A
Ty-078	21	2	2001100729	Ca papilar	A/P	0	0	T/C	A/A
Ty-094	45	2	2001103009	Ca papilar	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-102	36	2	2001104044	Ca papilar	A/P	1	1	T/T	A/A
Ty-104	34	2	2001109875	Ca papilar	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-110	50	2	2001104581	ca papilar	P/P	0	0	T/T	A/A
Ty-114	31	2	2001105022	ca papilar	P/P	1	0	C/C	A/A
Ty-116	71	2	2001105305	ca papilar	A/P	0	0	T/C	A/G
Ty-119	47	1	2001107019	Ca papilar	A/P	0	0	C/C	A/A
Ty-122	37	2	2001108619	Ca papilar	A/P	1	0	C/C	A/G
Ty-124	59	2	2001108924	Ca papilar	A/P	0	0	T/T	A/A
Ty-128	22	2	2002100867	ca papilar	A/P	0	0	C/C	A/A
Ty-132	71	2	2002101803	Ca papilar	A/P	0	0	T/C	A/G
Ty-134	35	1	2002102249	Ca papilar	A/P	0	0	T/C	A/A
Ty-138	43	2	2002102779	ca papilar	P/P	0	1	T/C	A/G
Ty-139	17	1	2002102923	Ca papilar	A/P	1	1	T/T	A/A
Ty-154	40	2	2002109183	ca papilar	A/P	1	1	T/T	A/A
Ty-113	26	2	2001104772	Carcinoma cels Hurtle	A/P	1	0	T/C	C/C

3.2. Nódulos Neoplásicos Benignos

ID	Idade	sexo	prontuário	Tipo - benigno	P53	GSTT1	GSTM1	CYP1a1 m1	CYP1a1m2
Ty-070	39	2	93104146	Adenoma Cels Hurtle	A/P	0	0	C/C	A/A
Ty-072	35	2	2000110533	Adenoma Cels Hurtle	P/P	0	0	T/C	A/A
Ty-085	40	1	2000111569	Adenoma Cels Hurtle	A/P	0	0	T/C	A/A
Ty-092	49	2	93101113	Adenoma Cels Hurtle	A/P	0	0	T/T	A/A
Ty-097	35	1	2001103394	Adenoma Cels Hurtle	A/P	0	0	T/T	A/A
Ty-048	50	2	2000110519	Adenoma Cels Hurtle	A/A	0	1	T/T	A/A
Ty-079	52	2	2001101121	Adenoma Cels Hurtle	A/A	0	1	T/T	A/A
Ty-152	48	2	92104125	Adenoma Cels Hurtle	P/P	0	1	T/T	A/A
Ty-042	52	2	2000110132	Adenoma Cels Hurtle	A/A	1	1	T/T	A/A
Ty-010	22	2	2000101764	adenoma folicular	A/A	0	0	T/C	A/A
Ty-019	46	1	2000104155	adenoma folicular	A/P	0	0	T/T	A/A
Ty-060	45	2	2000107019	adenoma folicular	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-065	29	2	2000111360	adenoma folicular	A/P	0	0	T/T	A/A
Ty-069	43	2	2000111075	adenoma folicular	A/P	0	0	T/C	A/A
Ty-087	47	2	2001101166	adenoma folicular	P/P	0	0	T/T	A/A
Ty-091	58	2	2001101411	adenoma folicular	A/P	0	0	T/T	A/A
Ty-112	56	2	2001104108	Adenoma folicular	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-125	48	2	2002100090	adenoma folicular	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-084	51	2	200011569	adenoma folicular	A/P	0	1	T/T	A/A
Ty-149	48	2	2002106286	adenoma folicular	P/P	0	1	T/C	A/A

3.3. Nódulos Não Neoplásicos

ID	Idade	sexo	prontuário	Tipo – doença tireoideana	P53	GSTT1	GSTM1	CYP1Am1	CYP1Am2
Ty-003	40	1	2000104584	bócio coloide multinodular	A/P	1	1	T/T	A/G
Ty-006	32	2	2000107998	tiroidite hashimoto	P/P	1	0	T/C	A/G
Ty-007	41	2	2000104333	bócio coloide	A/P	0	0	T/C	A/G
Ty-008	23	2	2000106649	bócio coloide difuso + hashimoto	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-011	21	2	2000105653	tiroidite hashimoto	A/P	0	0	C/C	A/A
Ty-012	43	2	2000107741	bócio multinodular	P/P	0	0	T/T	A/A
Ty-013	59	1	2000107989	Bócio coloide multinodular	A/A	0	0	T/T	A/G
Ty-014	51	2	2000104472	bócio coloide nodular	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-015	35	2	2000103360	bócio coloide multinodular	A/P	0	0	T/C	A/G
Ty-016	74	2	2000107556	bócio coloide multinodular	A/P	0	0	T/T	A/G
Ty-017	28	2	2000103892	tiroidite hashimoto	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-018	20	2	1994109171	bócio coloide cisitificado	A/A	0	0	T/C	A/A
Ty-020	68	2	2000104721	bócio coloide	P/P	0	0	T/T	A/G
Ty-025	43	2	2000105765	bócio coloide	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-027	43	2	2000104932	bócio coloide multinodular	A/P	1	1	T/T	A/A
Ty-028	34	2	2000108829	bócio coloide nodular	A/P	1	1	C/C	A/A
Ty-029	45	2	200108769	bócio coloide multinodular	A/P	1	1	T/C	A/G
Ty-030	31	2	2000105454	tiroidite hashimoto	A/P	0	0	T/C	A/G
Ty-031	32	2	2000109299	bócio coloide	A/A	1	0	T/C	A/A
Ty-032	61	2	97101973	bócio coloide nodular	A/P	1	0	C/C	A/A
Ty-033	64	2	95106997	bócio coloide	A/P	1	1	T/T	A/G
Ty-035	28	2	2000109151	Bócio coloide	A/A	1	1	T/C	A/A
Ty-036	52	2	2000108268	bócio coloide	A/A	1	1	T/C	A/A
Ty-037	35	2	2000106455	bócio coloide multinodular	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-040	27	2	94106877	bócio coloide nodular	A/A	0	0	T/C	A/A
Ty-041	42	2	2000106022	bócio coloide nodular	A/A	1	1	T/C	A/A
Ty-044	44	2	98110259	bócio coloide multinodular	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-052	48	2	2000110657	bócio coloide nodular	A/P	1	0	T/T	A/A
Ty-053	41	2	2000109223	bócio coloide	A/P	0	0	T/T	A/A
Ty-054	67	2	97110474	Bócio coloide	A/A	0	0	C/C	A/A
Ty-055	43	2	2000107263	bócio coloide nodular	A/P	0	0	T/T	G/G
Ty-058	39	2	2000107611	bócio coloide	A/P	1	1	T/C	A/A
Ty-061	44	2	2000110879	bócio coloide	A/A	0	0	C/C	A/A
Ty-063	36	2	2000109895	bócio coloide nodular	A/P	0	1	T/T	A/A
Ty-064	48	2	2000107955	bócio coloide multinodular	A/A	1	1	T/T	A/A
Ty-066	56	2	2000110284	bócio coloide	A/P	0	0	T/T	A/G
Ty-067	25	2	2000108105	hiperplasia difusa	A/A	0	0	T/C	A/A
Ty-068	46	2	2000110313	bócio coloide nodular	A/P	0	0	T/T	A/A
Ty-071	50	2	2000111490	bócio coloide multinodular	A/P	0	0	T/T	G/G
Ty-073	34	1	2001100612	bócio coloide multinodular	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-076	60	2	2000108589	bócio coloide nodular	A/A	0	0	T/T	G/G
Ty-077	60	2	99109939	bócio coloide nodular	A/A	0	0	T/T	A/A
Ty-081	50	1	2001100945	bócio coloide nodular	A/A	0	1	T/T	G/G
Ty-082	71	2	92106826	bócio coloide multinodular	A/A	1	0	T/T	A/A
Ty-088	44	2	2000105780	bócio coloide nodular	P/P	0	0	T/T	A/A
Ty-089	35	1	2001101985	bócio coloide	A/P	0	0	T/C	A/A
Ty-093	52	2	2001102728	tiroidite hashimoto	A/P	1	0	T/C	A/A

ID	Idade	sexo	prontuário	Tipo – doença tireoideana	P53	GSTT1	GSTM1	CYP1Am1	CYP1Am2
Ty-096	27	2	2001102622	bócio coiloide	P/P	0	1	T/T	A/A
Ty-098	49	2	2001103289	bócio coloide multinodular	A/A	0	0	T/T	A/G
Ty-099	20	2	2001103500	bócio coloide nodular c cistificação	A/P	0	0	T/T	A/A
Ty-109	50	2	2001104657	bócio coloide nodular	A/A	1	0	T/T	A/A
Ty-115	53	2	97100536	bócio coloide multinodular	A/P	1	0	T/T	A/G
Ty-118	28	2	2001107945	bócio coloide	A/P	1	0	T/T	A/A
Ty-120	29	2	2001108879	bócio coloide	A/A	1	0	T/C	A/A
Ty-123	43	2	2001105649	bócio coloide	A/P	1	0	T/T	A/A
Ty-127	65	1	2002101170	bócio coloide	A/P	1	0	T/T	A/A
Ty-129	33	1	2002101300	bócio adenomatoso	A/A	1	0	T/T	A/A
Ty-140	62	2	2002102253	bócio coloide multinodular	A/P	0	0	T/C	A/A
Ty-141	53	2	2002103877	bócio coloide nodular	A/A	0	0	T/C	A/G
Ty-146	64	1	2002105687	bócio coloide nodular	A/P	0	0	T/C	A/A
Ty-151	42	2	2002107249	bócio coloide	P/P	0	1	T/T	A/A
Ty-158	45	2	2000100507	bócio coloide multinodular	A/A	0	0	T/T	A/G