

NATÁSSIA ELENA BUFALO

*ANÁLISE MOLECULAR DE GENES ENVOLVIDOS NA
METABOLIZAÇÃO DO ESTRÓGENO NA DOENÇA DE GRAVES E NO
CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIROIDE*

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

***ANÁLISE MOLECULAR DE GENES ENVOLVIDOS NA
METABOLIZAÇÃO DO ESTRÓGENO NA DOENÇA DE GRAVES E NO
CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIROIDE***

NATÁSSIA ELENA BUFALO

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas. Sob orientação da Profa. Dra. Laura Sterian Ward.

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B863e Bufalo, Natássia Elena, 1981 -
Análise molecular de genes envolvidos na
metabolização do estrógeno na doença de Graves e no
carcinoma diferenciado da tireoide / Natássia Elena
Bufalo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Laura Sterian Ward.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Câncer. 2. Hipertireoidismo. 3. Polimorfismo.
4. Estradiol. I. Ward, Sterian Laura. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Molecular analysis of genes involved in metabolism of estrogens in Graves' disease and differentiated thyroid carcinoma.

Palavras-chave em inglês:

Cancer

Hyperthyroidism

Polymorphism

Estradiol

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Laura Sterian Ward [Orientador]

José Vassalo

Carmem Sílvia Passos Lima

Gláucia Ferreira da Silva Mazeto

Fabiana Granja

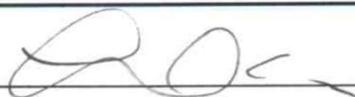
Data da defesa: 26-01-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da tese de Doutorado

Natássia Elena Bufalo

Orientador: Profa. Dra. Laura Sterian Ward



Membros:

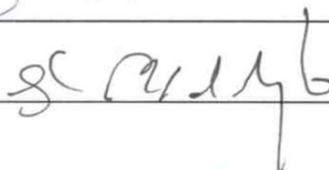
1. Prof. Dr. José Vassalo



2. Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Passos Lima



3. Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Ferreira da Silva Mazeto



4. Prof^a. Dr^a. Fabiana Granja



5. Profa. Dra. Laura Sterian Ward



Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/01/2012

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Walter e Elizabete, à minha irmã Sílvia e ao meu futuro marido Eduardo. Obrigada por todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado evidências de que é este o caminho profissional que eu devo seguir.

A minha grande mestra, Dra. Laura, que confiou em mim dando oportunidades únicas na minha vida.

Aos meus pais, Walter e Elizabete, que acreditaram nos meus sonhos e na minha capacidade, contribuindo para que meus estudos pudessem ser realizados.

A minha irmã Silvia, que sempre me apoiou como pode.

Ao meu noivo Eduardo Paparotto, pela paciência, compreensão, companheirismo e conselhos. Obrigada pela ajuda em todos os momentos difíceis e felizes das nossas vidas. Muito obrigada por tudo, meu amor.

Aos amigos de laboratório Aline Carolina de Nadai da Silva, Angélica Rocha, Catarina Ferreira, Carolina Fernandes Reis, Éder Brasão Junior, Fernando Batista, Jacqueline Almeida, Joyce do Rosário, Juliana Badke, Lucas Leite Cunha, Mariana Bonjiorno Martins, Marjory Alana Marcello, Marielly Guilhem, Raquel Bueno Barbieri, Renata Pastana Piai, Rita de Cássia Ferreira, Ulieme Cardoso, Wanessa Pinto, Willian Tsumura. Um agradecimento especial para Elaine, Janaína e Kika. Por todos os momentos de descontração e ajuda.

Ao Dr. João Romaldini pela ajuda com os pacientes portadores de Graves, pelos ensinamentos, paciência, congressos. Muito obrigada pela orientação.

À Dra. Lígia Assupção pelas amostras de sangue periférico e a parte clínica dos pacientes com câncer.

Aos vizinhos de laboratório, Helen, Viviane e Luisa. Um agradecimento especial a Luciana, Lidiane, Daniela, Estela, Fernando e Milena. E claro, ao Fábio Conte e a Mariana por me ensinarem a utilizar o Real Time.

Ao Dr. Roberto Santos, muito obrigada pela paciência por me explicar toda a parte clínica deste trabalho.

Ao meu grande amigo Romildo Siloto, o qual me ensinou a ver a Biologia com outros olhos, me mostrando que eu sou capaz de atingir meus objetivos.

Aos pacientes com câncer de tiróide e com doença de Graves. Obrigada pela inestimável ajuda.

Aos doadores de sangue do Hemocentro, por ajudar, além do próximo, a ciência.

À FAPESP e CAPES. Pelos auxílios financeiros.

À todos vocês, muito obrigada.

“Tenha coragem. Vá em frente. Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho. Devemos gerar coragem igual ao tamanho das dificuldades que enfrentamos.”

Dalai Lama

RESUMO

Tanto a Doença de Graves (DG) como o Carcinoma Diferenciado da Tireoide (CDT) são patologias de etiologia multifatorial e envolvem uma interação entre meio ambiente e fatores genéticos de predisposição. Ambas apresentam nítida preferência pelo sexo feminino. Por isso, variações no metabolismo do estrógeno poderiam estar associadas a esta preferência, pois, seus metabólitos podem causar dano ao material genético. Os objetivos foram determinar a influência dos polimorfismos dos genes *CYP17A1*, *HSD-17β1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *COMT* e *SULT1E1* no risco para a DG e para o CDT. Para tanto, foi estudado 282 pacientes com DG (234 mulheres e 48 homens; 39,80±11,69 anos), 292 pacientes com CDT (248 mulheres e 44 homens; 42,23±14,81 anos), comparados com 308 controles (246 mulheres e 62 homens; 36,86±12,95 anos). Para o estudo dos polimorfismos, utilizou-se a técnica TaqMan SNP Genotyping. Alterações polimórficas nos genes *CYP17A1* (p=0,0421), *CYP1A1* m1 (p=0,0328), *CYP1A2*1F* (p=0,0085), *CYP1B1* códon 119 (p<0,0001) e *CYP1B1* códon 432 (p=0,0059) aumentam a suscetibilidade ao CDT. Já as alterações polimórficas nos genes *CYP1A1* m1 (p<0,0001), *CYP1B1* códon 119 (p<0,0001) e *CYP1B1* códon 432 (p=0,0208) aumentam a suscetibilidade à DG. Entre os pacientes com DG, mulheres heterozigotas para *CYP1A1* m1 apresentam maior número de gestações (p=0,0071), paridade (p=0,0204) e abortos (p=0,0012), além de bócio mais pesado (gramas) (p=0,0082). Já entre os pacientes com CDT, mulheres heterozigotas para *CYP17A1* apresentam maior número de abortos (p=0,0150). A herança heterozigota para o gene *CYP1A2*F* está relacionada com idade mais precoce (p=0,0073) para o surgimento do CDT. A herança do polimorfismo do gene *CYP1B1* códon 119 está associada ao hábito tabagista (p=0,0269), uso de reposição hormonal (p=0,0197) e presença de menopausa (p=0,0317) para pacientes com CDT. Já para pacientes com DG, este polimorfismo se correlaciona com concentrações mais elevadas de T4livre (p=0,0409) e TRAb (p=0,0465). A herança em heterozigose do gene *CYP1B1* códon 432 foi mais frequente em pacientes com carcinoma papilífero do que nos pacientes com carcinoma folicular (p=0,0243), além da herança em homozigose se correlacionar com maior idade (p=0,0204) e com sobrepeso (p=0,0392) em pacientes com DG. Mulheres com o genótipo homozigoto polimórfico para *CYP1B1* códon 453 se correlacionam com uso de anticoncepcional (p=0,0332) no CDT. Maior número de gestações (p=0,0256) e de paridade (p=0,0141) se correlacionam com mulheres homozigotas para o gene *HSD-17β1* na DG. Concluímos que os fatores exógenos e endógenos ligados aos hormônios sexuais possuem considerável variabilidade individual,

devido aos polimorfismos da via de metabolização do estrógeno. As diferentes heranças polimórficas individuais, que são atribuídas aos polimorfismos dos genes codificadores de enzimas envolvidas na produção, metabolização e eliminação do estrógeno devem definir subpopulações de mulheres que são afetadas pela maior exposição aos estrógenos e aos seus metabólitos, os quais afetam o crescimento celular e podem induzir danos celulares carcinogênicos a ativar a resposta imune.

ABSTRACT

Graves' disease (GD) and Differentiated Thyroid Carcinoma (DTC) are multifactorial diseases and involved an interaction between environmental factors and genetic predisposition. Both diseases have preference for female. Therefore, variations in estrogen metabolism could be associated with that preference, because its metabolites can cause damage to genetic material. The objectives were to determine the influence of polymorphisms of genes *CYP17A1*, *HSD-17 β 1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *COMT* and *SULT1E1* at the susceptibility for GD and DTC. We studied 282 patients with GD (234 females and 48 males, 39.80 \pm 11.69 years old), 292 patients with DTC (248 women and 44 men, 42.23 \pm 14.81 years old), compared with 308 controls (246 women and 62 men, 36.86 \pm 12.95 years old). TaqMan SNP genotyping technique was used to study the polymorphisms. Polymorphisms in *CYP17A1* (p=0.0421), *CYP1A1* m1 (p=0.0328), *CYP1A2*1F* (p=0.0085), *CYP1B1* codon 119 (p<0.0001) and *CYP1B1* codon 432 (p=0.0059) increases the susceptibility to DTC. The polymorphisms of *CYP1A1* m1 (p<0.0001), *CYP1B1* codon 119 (p<0.0001) and *CYP1B1* codon 432 (p=0.0208) increases the susceptibility for GD. Women with GD have a higher number of pregnancies (p=0.0071), parity (p=0.0204), abortions (p=0.0012) and goiter heavier (grams) (p=0.0082) when heterozygous for *CYP1A1* m1. Among patients with DTC, women heterozygous for *CYP17A1* highest number of abortions (p=0.0150). The inheritance in heterozygous for the *CYP1A2*F* are correlated to younger age (p=0.0073) for the susceptibility to DTC. The inheritance of polymorphism of the *CYP1B1* codon 119 gene is associated with smoking (p=0.0269), use of hormone replacement therapy (p = 0.0197) and menopausal status (p=0.0317) for patients with DTC. However, for patients with GD, this polymorphism correlated with higher concentrations of FT4 (p=0.0409) and TRAb (p=0.0465). The inheritance in heterozygous for *CYP1B1* codon 432 gene was more frequent in patients with papillary carcinoma than in patients with follicular carcinoma (p=0.0243) and the homozygous inheritance correlate with older (p=0.0204) and overweight (p=0.0392) in patients with GD. Women with the inheritance for polymorphic homozygous for *CYP1B1* codon 453 correlated with contraceptive use (p=0.0332) in the DTC. Increased number of pregnancies (p=0.0256) and parity (p=0.0141) correlated with women homozygous for the *HSD-17 β 1* gene in GD. We conclude that exogenous and endogenous factors related to sex hormones have considerable individual variability due to polymorphisms of the estrogen metabolic pathway. The different polymorphic individual heritages, which are attributed to

the polymorphisms of genes encoding enzymes involved in the production, metabolism and excretion of estrogen should define subpopulations of women who are affected by increased exposure to estrogens and their metabolites, which affect cell growth and can induce cellular damage carcinogens activate the immune response.

95%IC: Coeficiente de Intervalo de Confiança de 95%

AhR: Receptor de Hidrocarboneto aromático; do inglês: *Aryl hydrocarbon receptor*

CDT: Carcinoma Diferenciado da Tiroide

COMT: Catechol-O-methyltransferase

CYP: Citocromo P-450

CYP11A1: Citocromo P-45011A1

CYP17A1: Citocromo P-45017A1

CYP19A1: Citocromo P-45019A1

CYP1A1: Citocromo P-4501A1

CYP1A2: Citocromo P-4501A2

CYP1B1: Citocromo P-4501B1

DAIT: Doenças Auto-Imunes da Tiroide

DG: Doença de Graves

DNA: Ácido desoxiribonucléico

E2: 17 β -estradiol

ER: Receptor de Estrógeno; do inglês: *Estrogen receptor*

ERalpha: Receptor de Estrógeno alpha; do inglês: *Estrogen receptor alpha*

ERbeta: Receptor de Estrógeno beta; do inglês: *Estrogen receptor beta*

ERE: Elementos de Resposta Clássica

ESR1: Receptor de Estrógeno 1; do inglês: *Estrogen receptor 1*

ESR2: Receptor de Estrógeno 2; do inglês: *Estrogen receptor 2*

EUA: Estados Unidos da América

F: Teste Exato de Fisher

FCM: Faculdade de Ciências Médicas

GEMOCA: Laboratório de Genética Molecular do Câncer

GST: Glutathione-S-transferase

HAP: Hidrocarboneto Aromático Policíclico

HSD17 β 1: 17- β -Hidroxiesteróide Dehidrogenase 1

HSD17 β 2: 17- β -Hidroxiesteróide Dehidrogenase 2

HSD3 β 1: 3- β -Hidroxiesteróide Dehidrogenase 1

HSD3 β 2: 3- β -Hidroxiesteróide Dehidrogenase 2
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC: Índice de Massa Corporal
INCA: Instituto Nacional do Câncer
NAT: N-Acetiltransferase
OR: Odds Ratio
p - value: Valor de p
PgR: Receptor de Progesterona; do inglês: *Progesterone receptor*
PUC-Campinas: Pontifícia Universidade Católica de Campinas
RNA: Ácido Ribonucléico
RNAm: Ácido Ribonucléico Mensageiro
SAS: Sistema de Análise Estatística; do inglês: *Statistical Analyses System*
SNP: Polimorfismo de Base Única; do inglês: *Single-Nucleotide Polymorphism*
SULT: Sulfotransferase
SUS: Sistema Único de Saúde
T3: Triiodotironina
T4L: Tiroxina Livre
Tg: Tireoglobulina
TH: Tiroidite de Hashimoto
TRAb: Anticorpo Contra Receptor do TSH
TSH: Hormônio Tiroestimulante; do inglês: *Thyroid-stimulating Hormone*
UDP: Glucoroniltransferase
UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas
UV: Ultra-violeta
VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular; do inglês, *vascular endothelial growth factor*
 x^2 : Qui-Quadrado

		PÁG.
Tabela 1	Genes estudados com suas respectivas sondas.	29
Tabela 2	Relação entre caso e controle quanto a características como sexo, etnia e hábito tabagista.	34
Tabela 3	Características dos pacientes e controles em relação ao uso de reposição hormonal, menopausa e uso de anticoncepcional.	35
Tabela 4	Distribuição dos genótipos do gene <i>CYP17A1</i> para CDT e grupo controle	35
Tabela 5	Análise de Kruskal-Wallis para o gene <i>CYP17A1</i> , variável aborto	36
Tabela 6	Distribuição dos genótipos do gene <i>HSD-17β1</i> entre casos e controles	37
Tabela 7	Distribuição dos genótipos do gene <i>CYP1A1 ml</i>	37
Tabela 8	Distribuição dos genótipos do gene <i>CYP1A2*F</i>	38
Tabela 9	Análise de Kruskal-Wallis para o gene <i>CYP1A2</i> , variável idade	39
Tabela 10	Distribuição dos genótipos do gene <i>CYP1B1</i>	40
Tabela 11	Genótipos do gene <i>COMT</i>	41
Tabela 12	Distribuição dos genótipos do gene <i>SULT1E1</i>	42
Tabela 13	Resultado na análise de regressão logística	43
Tabela 14	Resultado do teste estatístico Mann-Whitney	43
Tabela 15	Resultado do teste estatístico Stepwise	44

Tabela 16	Pacientes e controles que possuem ou não hábito tabagista, fazem ou não o uso de reposição hormonal; fazem o uso ou não de anticoncepcional ou ainda se já entraram ou não na menopausa	45
Tabela 17	Genótipos do gene <i>CYP17A1</i>	45
Tabela 18	Genótipos do gene <i>HSD-17β1</i>	46
Tabela 19	Análise de Kruskal-Wallis para o gene <i>HSD-17β1</i> , variáveis gravidez e paridade	47
Tabela 20	Distribuição dos genótipos do gene <i>CYP1A1 m1</i>	47
Tabela 21	Análise de Kruskal-Wallis para o gene <i>CYP1A1 m1</i> , variáveis gravidez, paridade, aborto e bócio	48
Tabela 22	Distribuição dos genótipos do gene <i>CYP1A2*F</i>	49
Tabela 23	Distribuição dos genótipos do gene <i>CYP1B1</i>	50
Tabela 24	Distribuição dos genótipos do gene <i>COMT</i> e <i>SULT1E1</i>	52
Tabela 25	Resultado na análise de regressão logística	52
Tabela 26	Resultado do teste estatístico Mann-Whitney	53
Tabela 27	Resultado do teste estatístico Stepwise	53

	<i>PÁG.</i>	
Figura 1	Estimativa de incidência dos tumores mais frequentes em ambos os sexos para o ano de 2012, excetuando-se os cânceres de pele não-melanoma	4
Figura 2	Taxa de incidência de câncer da glândula tireoide (IC95%), ajustada por idade, segundo município de residência – Homens	5
Figura 3	Taxa de incidência de câncer da glândula tireoide (IC95%), ajustada por idade, segundo município de residência - Mulheres	5
Figura 4	Influência da interação entre fatores genéticos, ambientais e endógenos na doença de Graves	8
Figura 5	Biosíntese e degradação do estrógeno	13
Figura 6	Esquema de ligações ou não entre o alvo e sequências de sonda pela técnica TaqMan. Esquema 1: Ligação apenas da sonda VIC indicando o genótipo homozigoto. Esquema 2: Ligação da sonda FAM, indicando também o genótipo homozigoto. Esquema 3: Ligação da sonda VIC e FAM indicando o genótipo heterozigoto	28
Figura 7	Resultado da técnica TaqMan® SNP Genotyping. Pode-se observar que a curva em destaque indica que o indivíduo apresenta o genótipo homozigoto selvagem	30
Figura 8	Resultado da técnica TaqMan® SNP Genotyping. Pode-se observar que a curva em destaque indica que o indivíduo apresenta o genótipo homozigoto polimórfico	30
Figura 9	Resultado da técnica TaqMan® SNP Genotyping. Pode-se observar que as curvas indicam que o indivíduo apresenta o genótipo heterozigoto	31

Figura 10 Resultados da técnica TaqMan® SNP Genotyping. Em azul, indica que as amostras são homozigotos para o alelo T; em verde, as amostras são heterozigotas, em vermelho, as amostras são homozigotas para o alelo C, e em preto, as amostras não foram identificadas

37

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças tiroidianas nodulares	2
1.1.1 Câncer de tiroide	3
1.2 Doenças autoimunes	6
1.2.1 Doença de Graves	7
1.3 Gênero	8
1.4 Metabolização de xenobióticos e de endobióticos	10
1.5 Esteroidogênese	11
1.6 Produção do estrógeno	13
1.6.1 Genes <i>CYP17A1</i> e <i>HSD - 17β1</i>	13
1.7 Metabolização, detoxificação e eliminação do estrógeno	14
1.7.1 Genes <i>CYP1A1</i> , <i>CYP1A2</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>COMT</i> e <i>SULT1E1</i>	14
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Casuística	22
3.1.1 Pacientes com doença de Graves	22
3.1.2 Pacientes com carcinoma diferenciado da tiroide	24
3.1.2.1 Seguimento	25
3.1.3 Controles	26
3.2 Metodologias	27
3.2.1 Extração de DNA	27
3.2.2 Análise dos genes <i>CYP17A1</i> , <i>HSD - 17β1</i> , <i>CYP1A1</i> , <i>CYP1A2</i> , <i>CYP1B1</i> , <i>COMT</i> e <i>SULT1E1</i>	27
3.2.3 Análise estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Resultados para CDT	34
4.1.1 Resultados para o Gene <i>CYP17A1</i>	35

4.1.2 Resultados para o Gene <i>HSD-17β1</i>	36
4.1.3 Resultados para o Gene <i>CYP1A1 M1</i>	37
4.1.4 Resultados para o Gene <i>CYP1A2*F</i>	38
4.1.5 Resultados para o Gene <i>CYP1B1</i>	39
4.1.6 Resultados para o Gene <i>COMT</i>	41
4.1.7 Resultados para o Gene <i>SULT1E1</i>	42
4.1.8 Resultados para o todos os genes	43
4.2 Resultados para DG	44
4.2.1 Resultados para o gene <i>CYP17A1</i>	45
4.2.2 Resultados para o gene <i>HSD-17B1</i>	46
4.2.3 Resultados para o gene <i>CYP1A1 ml</i>	47
4.2.4 Resultados para o gene <i>CYP1A2*F</i>	48
4.2.5 Resultados para o gene <i>CYP1B1</i>	49
4.2.6 Resultados para o gene <i>COMT e SULT1E1</i>	51
4.2.7 Resultados para o todos os genes	52
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO

A glândula tiroide é importante para o corpo humano devido a sua habilidade em produzir os hormônios necessários para manter os níveis de energia apropriados e a vida ativa. Tais moléculas possuem efeitos pleiotrópicos, desempenham um papel crítico no início do desenvolvimento cerebral, crescimento somático, maturação óssea e síntese de RNAm de mais de 100 proteínas que regulam cada função corporal [1].

As doenças da tiroide possuem elevada prevalência e se manifestam por meio de disfunção hormonal, seja por excesso ou por deficiência de produção hormonal, ou por alterações anatômicas decorrentes do crescimento difuso ou nodular da glândula [2].

Existem vários tipos de doenças tireoideas. Neste texto serão abordadas as doenças nodulares e autoimunes.

1.1 Doenças tiroidianas nodulares

Nódulos tiroidianos são detectados pelo seu tamanho, posição cervical ou ainda pela habilidade que o médico apresenta ao realizar o exame palpatório. No entanto, a maioria dos nódulos da tiroide não são clinicamente reconhecidos. A ultrassonografia, como ferramenta de triagem, é muito sensível, mas poderá resultar em preocupação desnecessária, já que os nódulos são tão comuns que raramente apresentam significado patológico. Porém, a sua utilização pode identificar se os pacientes apresentam nódulos simples ou múltiplos, suas dimensões e características. Como as técnicas de diagnóstico de nódulos de tiroide têm se tornado mais sensíveis, tem havido um aumento paralelo da detecção do carcinoma diferenciado da tiroide (CDT) [3].

De fato, a prevalência de nódulos tiroidianos varia de acordo com o método de rastreamento utilizado, passando de cerca de 1% nos homens e 5% das mulheres que vivem

em condições de suficiência de iodo, quando o diagnóstico é apenas clínico [4-7], para 76% quando se utiliza métodos de imagem como a ultrassonografia [4].

Além do uso de práticas de diagnóstico sensíveis, o aumento da detecção de nódulos da tireoide também é determinado pela associação de inúmeros fatores de risco como idade, sexo, etnia e localização geográfica, e exposição a fatores ambientais [8-9].

1.1.1 Câncer de Tireoide

O câncer de tireoide é a neoplasia endócrina mais comum e foi considerado responsável por 1.740 mortes nos EUA, onde 48.020 novos casos foram diagnosticados em 2011 [10]. A incidência do CDT continua a aumentar no mundo, tendo mais do que dobrado nas últimas três décadas [11-13].

Os CDTs são derivados das células foliculares e subdivididos em dois grupos: Carcinomas Papilíferos, que representam cerca de 80% de todos os tipos de cânceres de tireoide, e Carcinomas Foliculares, que representam cerca de 13%. Os Indiferenciados ou Anaplásicos constituem menos de 2% dos carcinomas tiroidianos, enquanto que os carcinomas medulares, originados nas células parafoliculares, produtoras de calcitonina, são responsáveis por menos de 3% desses tumores [14].

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CDT é o câncer mais comum de cabeça e pescoço, sendo três vezes mais frequente no sexo feminino [15]. O INCA estima que o câncer de tireoide tenha sido responsável por 12,9% de todas as neoplasias registradas no sexo feminino e por 3,2% das neoplasias do sexo masculino em 2009 [15]. São esperados 10.590 casos novos de câncer da tireoide em 2012, com um risco

estimado de 11 casos a cada 100 mil mulheres, projetando-se como o quarto mais frequente entre mulheres no ano de 2012, como mostrado na figura abaixo [15].

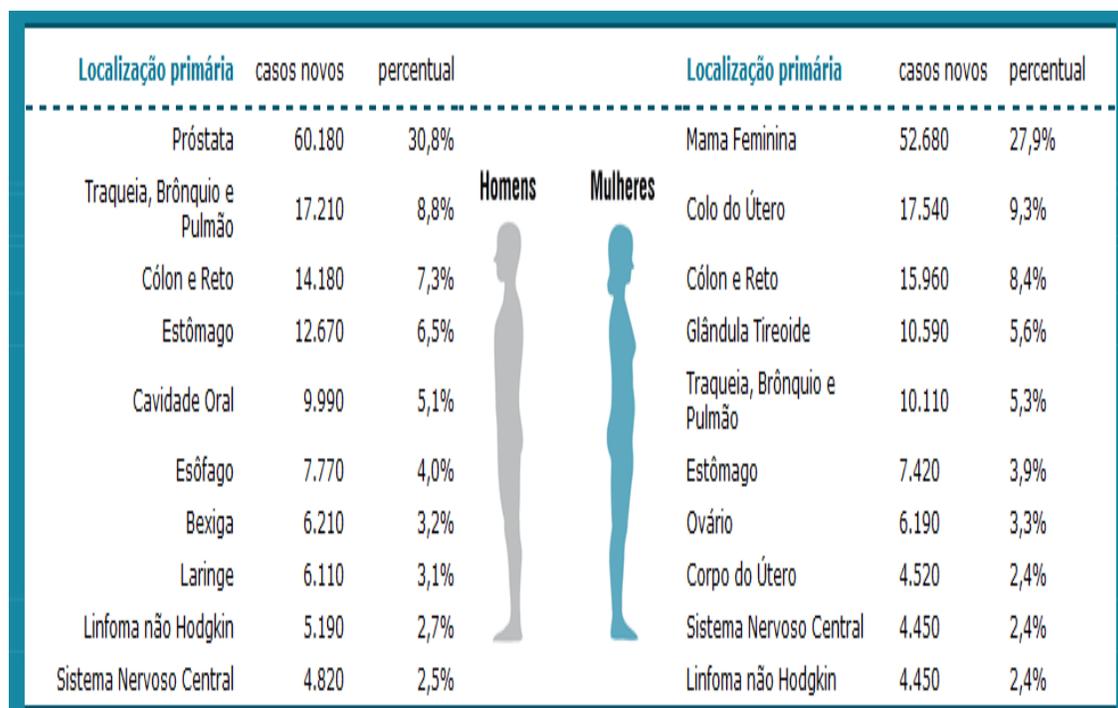


Figura 1. Estimativa de incidência dos tumores mais frequentes em ambos os sexos para o ano de 2012, excetuando-se os cânceres de pele não-melanoma [15].

Registros nacionais de câncer e publicações brasileiras confirmam que embora o aumento na incidência do CDT, particularmente entre as mulheres, seja marcante, a mortalidade pelo CDT está diminuindo [16-17]. Dados brasileiros também mostram uma grande variedade na incidência em diversos estados do país [16]. Sem dúvida, parte destes dados deve estar relacionada ao melhor acesso ao Sistema Único de Saúde (SUS) e a melhores meios de diagnóstico, como no Estado de São Paulo. No entanto, observa-se também uma grande variedade em outros Estados de similar nível sócio-econômico-cultural

e similar qualidade de serviços de atendimento em saúde, indicando que outros fatores também devem contribuir para tal divergência na incidência (figura 2 e 3) [7].

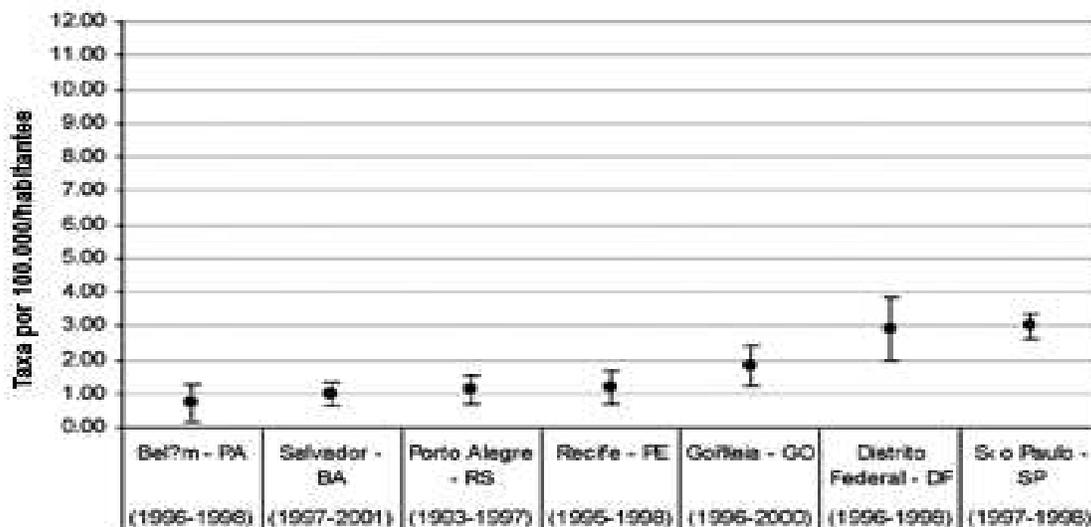


Figura 2. Taxa de incidência de câncer da glândula tireoide (IC95%), ajustada por idade, segundo município de residência – Homens [16].

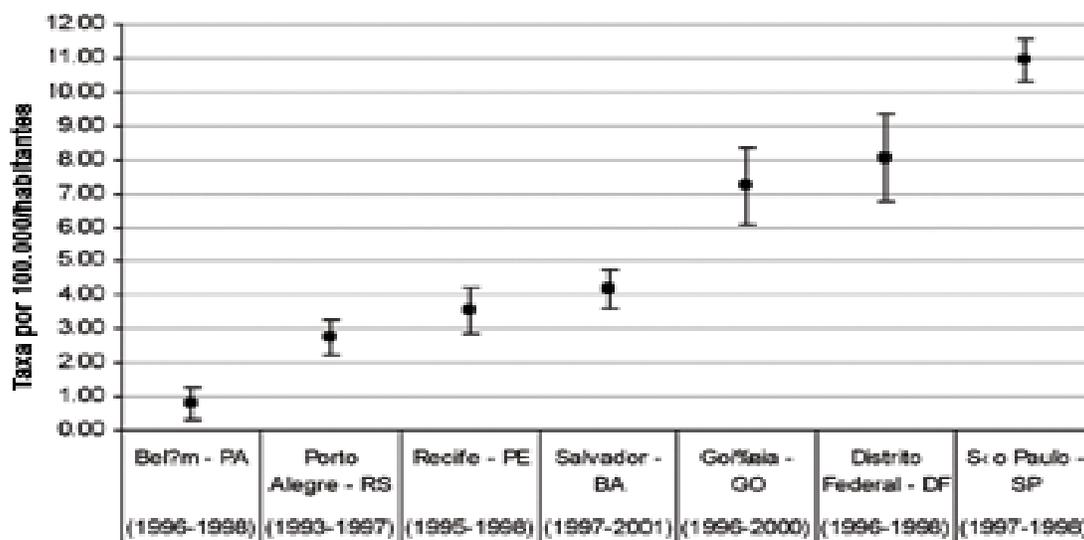


Figura 3. Taxa de incidência de câncer da glândula tireoide (IC95%), ajustada por idade, segundo município de residência - Mulheres [16].

Dentre os fatores de risco para câncer de tireoide temos a radiação ionizante, predisposição familiar, ingestão deficiente de iodo, fatores hormonais e reprodutivos,

fatores étnicos e geográficos, dieta e drogas. Nosso laboratório tem demonstrado que o perfil genético para a herança de genes codificadores de uma série de enzimas de detoxificação também é fator de predisposição ao CDT [18-23].

1.2 Doenças Autoimunes

As doenças autoimunes da tireoide (DAIT) são representadas por um amplo espectro de manifestações clínico-laboratoriais em que se destacam dois extremos. De um lado, a produção excessiva de anticorpos estimuladores da glândula tireoide leva ao desenvolvimento da doença de Graves (DG). De outro lado, a produção de anticorpos destruidores da glândula tireoide leva à sua destruição progressiva, com características de infiltração linfocitária, conhecida como tiroidite crônica linfocitária ou tiroidite de Hashimoto (TH) [24].

A tireoide é altamente vulnerável a doenças autoimunes que afetam de 2% a 5 % da população geral, em especial mulheres adultas e idosas [25-26]. A prevalência em mulheres chega a 5 - 10 casos para cada homem [27].

O papel dos fatores ambientais no desenvolvimento da autoimunidade tem sido amplamente estudado [28-30]. Evidências indicam vários fatores, tais como infecções, tabagismo, exposição a raios ultravioletas, nutrição, xenobióticos, além de estresse físico e psicológico na patogênese da autoimunidade [29-34].

1.2.1 Doença de Graves

A DG é conhecida por ser a causa mais comum de hipertiroidismo entre as idades de 20 e 50 anos. Em mulheres, a incidência anual varia de 15 a 200 para cada 100.000 mulheres [35]. As taxas observadas no sexo masculino são cerca de um décimo do sexo feminino, sendo também uma doença comum em regiões com excesso de iodo [36].

Nas últimas décadas, esta incidência tem atingindo 5% da população [1] e a prevalência é de nove mulheres para cada homem [33].

Na DG, a autoimunidade é considerada ponto central da doença. Porém, as células T podem ajudar tecidos danificados, indicando que a autoimunidade natural contribui para a manutenção da saúde [37]. O sistema imunológico decide seus próprios atos por meio da interação de múltiplos sinais com os tecidos. É provável que o tecido por si só forneça sinais que acionam o tipo de inflamação necessária para a sua auto-reparação [37-38].

A DG resulta de uma complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e endógenos (figura 4). Tal combinação é necessária para iniciar a autoimunidade tiroídiana [39-40]. Para o desenvolvimento da DG, os fatores genéticos são predominantes, estimando-se que contribuam com cerca de 80%, enquanto que apenas 20% são os fatores ambientais [41-42]. Nos últimos anos, excelentes revisões têm sido publicadas baseadas no background genéticos da DG [41-42].

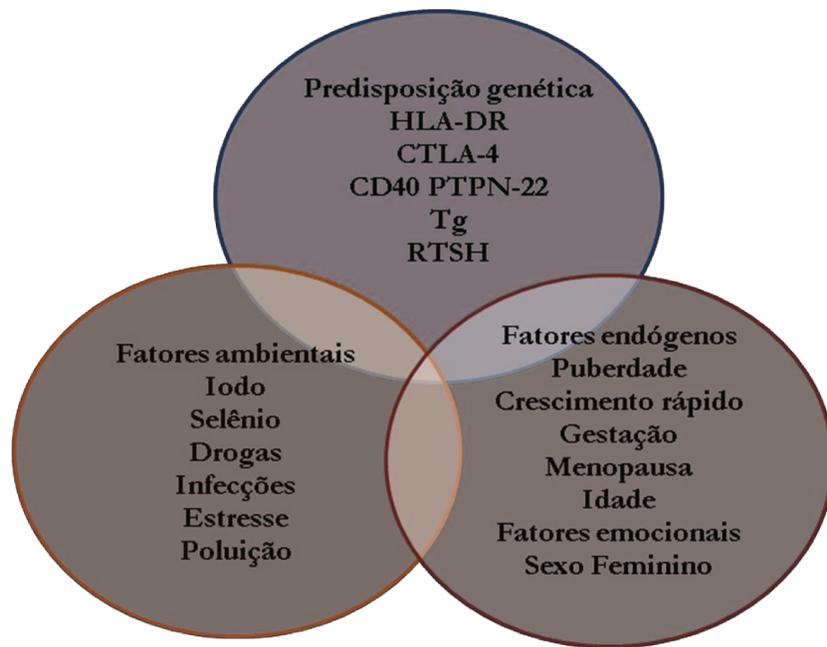


Figura 4: Influência da interação entre fatores genéticos, ambientais e endógenos na doença de Graves, adaptado de Saranac e col. [1].

1.3 Gênero

A disparidade de gênero na incidência do câncer de tireoide tem sido consistentemente relatada [23, 43-48]. Na verdade, as mulheres, especialmente aquelas com idade acima de 45 anos, têm sido responsáveis pela maior parte do aumento da taxa de incidência deste tipo de câncer [49].

A alta incidência de câncer de tireoide entre as mulheres quando comparadas aos homens [50] sugere que os hormônios sexuais femininos possuem um papel etiológico. Tal incidência se encontra também em maior proporção para os carcinomas papilíferos quando comparado com outros tipos histológicos [12]. A influência do sexo na incidência do CDT difere em diferentes faixas etárias, aumentando de valores praticamente iguais nas crianças menores de 9 anos de idade para uma proporção de cerca de 3 a 5 mulheres para cada

homem adulto [23]. Também há uma menor diferença na incidência entre os sexos no período após a menopausa [51].

Uma das possíveis causas do aparecimento do nódulo tiroídiano está ligada a esteróides. O estrógeno pode também estar correlacionado à manutenção do carcinoma, já que tal hormônio é capaz de interferir no crescimento celular afetando vias de sinalização dependentes de fatores de crescimento [52-54]. Além disso, já foi comprovada a presença de estrógeno em quantidades elevadas em tecidos neoplásicos de tireoide do que em tecidos saudáveis [51]. Estudos mostram ainda que o volume da glândula tiroídiana aumenta durante a puberdade, gestação e varia durante o ciclo menstrual [55-57] e que *in vitro*, as células tumorais tiroídianas expressam os receptores de estrógeno e estradiol estimulando a proliferação do carcinoma papilífero [43]. Mais recentemente, tem-se evidenciado que a promoção de crescimento da célula folicular e a indução de neoplasias de tipo folicular ou anaplásicas está relacionada à localização subcelular dos receptores de estrógeno ERalpha e ERbeta [58].

Já para a DG, estudos mostram que o estrógeno atua como modulador do sistema imune regulando a expressão de citocinas, linfopoiese de células B e na apresentação de antígenos [59]. Estudos indicam que a prevalência da DG é maior nas mulheres porque há menos testosterona e mais estrógeno, já que este aumenta a reatividade imunológica [60-62]. Este hormônio está envolvido na patogênese de doenças autoimunes com efeitos variados. Por exemplo, o estrógeno agrava o lúpus eritematoso sistêmico e em camundongos modelo 29, porém possuem um efeito protetor em doenças como a artrite, encefalomielite e a síndrome de Sjögren [63-64].

1.4 Metabolização de Xenobióticos e de Endobióticos

Mais do que os hormônios em si, seus metabólitos podem causar dano ao material genético, inibir a apoptose, estimular a transcrição gênica, promover angiogênese e estimular a divisão celular, sendo, portanto, elementos chave na carcinogênese, além de facilitar a indução de processos autoimunes [65]. A maioria dos agentes tóxicos, tanto externos (xenobióticos) como os provenientes de nosso próprio metabolismo (endobióticos), requer ativação metabólica antes de se ligar ao DNA, ao RNA e às proteínas, por isso, as variações nos processos de ativação e detoxificação de compostos químicos e drogas desempenham um importante papel na resposta orgânica [65]. Distúrbios no equilíbrio desses processos podem explicar a variabilidade na resposta individual à exposição a tais compostos [66].

Existem duas formas de metabolização de compostos tóxicos no organismo humano: a metabolização mediada pelas oxidases de função mista – ou de Fase I – e aquela mediada pelas enzimas de conjugação – ou de Fase II. Muitos compostos tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), as nitrosaminas e várias drogas medicamentosas, são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas da Fase I, que são principalmente enzimas da família do citocromo P-450 (CYPs) [67]. Assim, com a introdução de um ou mais grupamentos hidroxila ao substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinogênico, como o benzopireno quando é convertido em epóxido de benzopireno, composto altamente reativo [67]. Já as reações da Fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutaciona, sulfato, glicose, acetato) por meio da Glutaciona-S-transferases (GSTs), Glucoroniltransferases (UDP) e N-Acetiltransferases (NATs), que agem como inativadores dos produtos da Fase I, tornando

os metabólitos mais hidrofílicos e, portanto, passíveis de excreção [68]. Portanto, a regulação e a expressão das enzimas de fase I e II, assim como seu equilíbrio metabólico na célula podem ser importantes fatores na determinação da suscetibilidade e da progressão de doenças relacionadas à exposição a agentes tóxicos [69].

1.5 Esteroidogênese

Estrógeno, progesterona e testosterona exercem uma variedade de efeitos fisiológicos importantes, que são mediados pelos seus respectivos receptores como o receptor de estrógeno 1 (ESR1) e 2 (ESR2), receptor de progesterona (PgR), receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AhR) e seus co-reguladores. Após os hormônios terem exercido seus efeitos fisiológicos, eles são metabolizados e excretados. Para que ocorra sucesso na detoxificação e eliminação do estrógeno e de seus metabólitos é necessário prevenir a sua exposição excessiva e/ou prolongada [70].

A produção de estrógeno, progesterona e testosterona ocorre por meio do processo da esteroidogênese (figura 5), no qual o colesterol é primeiramente sintetizado em pregnenolona pela enzima CYP11A1. Depois disso, a progesterona é produzida em pregnenolona pelas enzimas HSD3 β 1 e HSD3 β 2. A enzima CYP17A1 converte a pregnenolona e a progesterona em androstenediona, um precursor para estrógeno e produtor de testosterona. As enzimas CYP19A1, HSD17 β 1 e HSD17 β 2 estão envolvidas na produção dos estrógenos: estrona, estradiol, estriol e da testosterona [71].

O metabolismo e a eliminação do estrógeno envolvem duas fases principais. Na fase 1 ocorre a conversão do estrógenos em metabólitos catecol e derivados hidroxil pelas enzimas CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 por meio da hidroxilação [70].

CYP1A1 e CYP1A2 catalisam a 2-hidroxição do estrógeno no endométrio e no fígado [72-73]. Estudos mostram que a 2-hidroxição é a principal via oxidativa do endométrio e tais produtos do estrógeno previnem a formação de tumores [74-75].

CYP1B1 catalisa a 4-hidroxição do estrógeno que é encontrado em quantidades maiores que a 2-hidroxição [76]. Ainda, 4-hidroxiestrógenos podem ativar o receptor de estrógeno, aumentando a quantidade de estrógenos dentro da célula [70].

No câncer endometrial, a proporção entre a 4-hidroxição e 2-hidroxição aumenta proporcionalmente com a iniciação da tumorigênese [73].

Já a fase 2, envolve a inativação e eliminação do estrógeno catecol pelo processo de detoxificação, oxidação, metilação, sulfonação e glucuronidação [70]. As principais enzimas envolvidas nesse processo são: COMT, GST, SULT e UGT. Logo após o 2- e 4-hidroxiestrógeno, os estrógenos catecol são inativados pela enzima COMT (2- e 4-metoxiestrógeno) ou eles são oxidados em quinonas e semi-quinonas [77]. Tais produtos possuem a habilidade de realizar o ciclo da redução oxidativa podendo causar dano no DNA além da produção do estresse oxidativo [78].

Igualmente à fase 1, o 2-metoxiestrógeno não induz eventos que danifiquem o DNA; entretanto, a forma 4-metoxiestrógeno depurina as ligações do DNA, as quais podem ocorrer em genes vitais que controlam a biosíntese, o metabolismo e a inativação do estrógeno [70, 74, 79]. Por esse motivo, COMT é a enzima chave na prevenção da formação de quinonas e semi-quinonas pela metilação dos hidroxiestrógenos [80]. As enzimas GSTs, SULTs e UGTs inativam qualquer forma de quinonas e semi-quinonas, levando assim, à sua eliminação [81-85].

Sp-1 (CCACC box) de iniciação da tradução 34 pares de bases acima [90]. Acredita-se que a região promotora adicional influencie a expressão gênica resultando no aumento da atividade enzimática levando a um aumento da quantidade de estrógeno biodisponível [90].

17- β -Hidroxiesteróide Dehidrogenase é a última enzima na síntese do estrógeno, responsável por catalisar a conversão final, por meio da redução ($O \rightarrow OH$) da estrona em estradiol [91], o qual é o principal e mais potente hormônio estrogênico na mulher. Tal reação finaliza inúmeras vias pelas quais a estrona pode ser criada, uma possível diferença na atividade da enzima poderia afetar as concentrações de estrógeno [92].

O gene *HSD-17 β 1* está localizado no cromossomo 17q11-q21 [93], possui um polimorfismo no éxon 6, códon 312. Este códon possui uma troca de uma adenina por uma glicina (A \rightarrow G), gerando a troca de uma serina por uma glicina (rs605059) [94]. Embora algumas evidências indiquem que este polimorfismo não afete a capacidade de catalisação ou as propriedades imunológicas da enzima [95], alguns estudos sobre a relação com câncer de mama sugerem que indivíduos que são homocigotos para o aminoácido serina podem ter um risco significativamente aumentado para o câncer de mama [92].

1.7 Metabolização, detoxificação e eliminação do estrógeno

1.7.1 Genes *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *COMT* e *SULT1E1*

A enzima CYP1A1 tem sido estudada como a principal enzima ativadora de substâncias presentes na fumaça de cigarro e outros poluentes ambientais como HAPs, transformando-os em moléculas eletrofílicas e cancerígenas [96]. No entanto, também

catalisa a 2-hidroxilação do estradiol em vários tecidos extra-hepáticos incluindo câncer de mama [97-99].

Um dos polimorfismos mais estudados, localizado no cromossomo 15q24.1, se encontra abaixo do sítio de poliadenilação [100]. No gene *CYP1A1 ml* ocorre a troca da base timina pela citosina (T→C) na posição 6235, 3' não codificante [101]. Tal SNP (rs4646903), leva ao aumento da atividade enzimática e conseqüentemente a concentrações mais elevadas de carcinógenos ativados. As frequências dos alelos variam de acordo com a etnia, sendo consideravelmente menos prevalente em caucasianos do que em asiáticos [102].

A enzima CYP1A2 da família do citocromo P450, desempenha um papel importante no metabolismo de muitos medicamentos, incluindo a clozapina, a imipramina, a cafeína, paracetamol, fenacetina, teofilina, tacrina [103], e algumas neurotoxinas [104]. Além disso, CYP1A2 ativa várias aminas aromáticas, sendo, portanto, uma enzima chave na carcinogênese química [105].

O gene *CYP1A2*, localizado no cromossomo 15q24.1, é responsável pela maior parte do metabolismo do estradiol. Possui inúmeros polimorfismos, mas, o mais estudado e comum está localizado no íntron 1, *CYP1A2*F*, onde ocorre a troca de uma adenina por uma citosina (A→C) na posição 167. Tal SNP (rs762551), é associado com o aumento da inducibilidade, resultando na diminuição em aproximadamente duas vezes o nível da enzima [106].

O gene *CYP1B1* também pertence a família das CYPs, que codifica enzimas monooxigenases de domínio heme [107]. As enzimas dessa família têm como função ativar metabolicamente compostos químicos exógenos, como drogas, componentes da dieta,

substâncias presentes no tabaco, derivados de combustíveis fósseis e gases ambientais; e compostos químicos endógenos, como hormônios esteróides [101].

A hidroxilação do 17β -estradiol (E2) catalisada pelo *CYP1B1* se dá majoritariamente na posição C-4. O 4-hidroxiestrógeno é um antagonista muito forte, e sua afinidade de ligação com os receptores de estrógenos das células, como as do câncer de mama, por exemplo, foi mensurada em 1,5 vezes maior do que a do E2 [108]. Além disso, o período de dissociação desse composto com o receptor de estrógeno é mais longo do que o E2 [109]. O produto do 4-hidroxiestrógeno reage com o DNA formando aductos, o que poderia levar ao desenvolvimento de vários cânceres humanos [77]. Sua ligação é exclusiva na posição N-7 da guanina, proporcionando uma desestabilização na ligação glicosídica e subsequente depurinação [110].

O gene *CYP1B1* está localizado no cromossomo 2p22.2. No códon 119 deste gene ocorre a troca da base guanina por uma timina (G→T), gerando a troca de uma serina por uma alanina (rs743572). Já no códon 432, ocorre a troca da base citocina por guanina (C→G), levando a troca de uma leucina por uma valina (rs1056836) [111]. O genótipo valina/valina gera estresse oxidativo, por meio do aumento da formação de 4-hidroxiestrógeno [112]. No códon 453 ocorre a substituição de uma asparagina por uma serina (T→C) (rs1800440) [113]. Tais alterações levam ao aumento da atividade enzimática, reduz as concentrações de 2-hidroxiestrógeno e $16\text{-}\alpha$ -hidroxiestrógeno, elevando as concentrações de 4-hidroxiestrógeno [114].

As quinonas, que são os metabólitos gerados por meio da oxidação do 4-hidroxiestrógeno, podem reagir com as bases púricas do DNA formando aductos por meio da depurinação que gera sítios mutagênicos capazes até de remover tais bases púricas (adenina e guanina) [115]. A enzima COMT está envolvida na metilação, ou seja, na

inativação dos estrógenos catecol [116]. Além das propriedades mitóticas do estrógeno, os seus metabólitos dentro da via catecol conseguem danificar o DNA (quinonas e semi-quinonas) por meio da formação de radicais superóxidos e depuração do DNA [78, 115, 117].

O gene *COMT* está localizado no cromossomo 22q11.21. No códon 108, ocorre a transição de uma guanina para adenina, gerando a troca do aminoácido valina por metionina (rs4680) resultando em menor atividade da enzima COMT. A atividade enzimática do genótipo metionina/metionina é 75% menor do que a obtida com o genótipo selvagem, enquanto que os heterozigotos apresentam atividade enzimática intermediária [118-120].

As enzimas SULTs desempenham um importante papel na homeostase corporal por meio de duas vias. A primeira é pela sulfoconjugação de drogas e xenobióticos que são eliminados pela via hepatobiliar e sistema urinário. A segunda via é pela sulfoconjugação e desativação de substâncias ativas endógenas (dopamina, hormônios tireoidianos e estrógenos) [121]. Especificamente a enzima *SULT1E1* tem mostrado afinidade para estrona, estradiol e catecolestrogénos [121]. O gene *SULT1E1* está localizado no cromossomo 4q13.3, possui um polimorfismo na região promotora do éxon 1, onde ocorre a troca de uma guanina por uma adenina (-64 G→A) (rs3736599) [81]. Estudos indicam que tal polimorfismo leva a diminuição da concentração da enzima, mostrando uma associação com a diminuição da estabilidade térmica da enzima [122]. Rebbeck e col. mostrou que as variantes alélicas de *SULT1E1* produzem dehidroepiandrosterona em menor quantidade quando comparado com mulheres que não apresentam tal variação [123].

Por estas enzimas participarem do metabolismo, detoxificação e influenciarem na biodisponibilidade de estrógenos, os polimorfismos destes genes devem ter um efeito sobre

a expressão e função enzimáticas, atividade metabólica, carcinogênese e indução a doenças autoimunes. Por isso, a elevada expressão e ativação de enzimas biosintéticas e a redução da expressão e ativação de enzimas de conjugação devem levar a um aumento na toxicidade ou carcinogenicidade dos metabólitos estrogênicos. Por isso, torna-se necessário o estudo da influência destes SNPs nas doenças tiroidianas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste projeto é verificar a influência do perfil genotípico de genes relacionados ao metabolismo de estrógeno no desenvolvimento da DG e do CDT, respondendo as perguntas abaixo.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Alterações polimórficas nos genes *CYP17A1*, *HSD17-β1*, *CYP1A1 m1*, *CYP1A2*1F*, *CYP1B1* códon 432, *CYP1B1* códon 119, *CYP1B1* códon 453, *COMT* e *SULT1E1* aumentam a suscetibilidade à DG e ao CDT?

2.2.2 Idade da menopausa, uso de reposição hormonal, uso de anticoncepcional, idade de menarca, número de gestações, número de partos, número de abortos, hábito tabagista aumentam a suscetibilidade à DG e ao CDT?

2.2.3 Alterações polimórficas nos genes *CYP17A1*, *HSD17-β1*, *CYP1A1 m1*, *CYP1A2*1F*, *CYP1B1* códon 432, *CYP1B1* códon 119, *CYP1B1* códon 453, *COMT* e *SULT1E1* estão associadas idade de menopausa, uso de reposição hormonal, uso de anticoncepcional, idade de menarca, número de gestações, número de partos e número de abortos além de dados clínicos como peso do bócio em gramas, hábito tabagista, concentrações de T4L e TRAb?

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Câncer (GEMOCA) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) / Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em parceria com o Ambulatório de Tumores da Tireoide da Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica e Ambulatório de Tireoide do Hospital Universitário da Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas), além do Hemocentro da UNICAMP.

As origens demográficas e características do estilo de vida tanto do grupo-controle quanto dos pacientes com CDT ou DG foram similares. Indivíduos em que havia dúvida em relação a qualquer dado que pudesse influenciar a análise, fosse este dado relacionado com exposição a fatores ambientais, ou fosse relativo a qualquer condição patológica, foram excluídos da amostra.

3.1 Casuística

Todos os participantes, tanto pacientes quanto o grupo controle, foram devidamente informados dos objetivos da investigação e assinam o Termo de Consentimento Informado (anexo). Este estudo retro-prospectivo do tipo caso-controle foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa tanto da FCM (nº 621/2008) quanto da PUC-Campinas (nº 332/04) (anexo).

3.1.1 Pacientes com doença de Graves

Foram estudados 282 pacientes confirmados com a DG selecionados do Ambulatório de Tireoide da PUC-Campinas, sendo 234 mulheres e 48 homens, com média

de idade de $39,80 \pm 11,69$ anos. Dados clínicos foram obtidos por meio do questionário feito com os pacientes e confirmados na ficha na qual constam, além de dados de identificação, idade ao diagnóstico, sexo, etnia, dados clínicos pré-cirúrgicos (quando se trata de paciente submetido a procedimento cirúrgico), exposição a agentes ambientais, dieta, tabagismo, uso de medicamentos e drogas, exames realizados e dados ligados ao estrógeno, como, idade da menarca, idade da menopausa, uso de anticoncepcionais, número de gestação, número de paridade e número de abortos espontâneos, além do uso ou não de reposição hormonal e índice de massa corporal (IMC).

Os pacientes com DG apresentavam os seguintes critérios diagnósticos: evidências clínicas e laboratoriais de tirotoxicose com TSH suprimido, valores elevados de T4L e T3, valores de captação de radioiodo de 24h ou de Tecnécio aumentados, com uma distribuição do traçador homogênea e difusa e/ou a positividade dos anticorpos contra o receptor do TSH (TRAb).

Os pacientes foram cuidadosamente examinados e tratados com drogas anti-tiroidianas, como metimazol ou propiltiouracil. Cento e cinquenta e três pacientes foram submetidos à radioiodoterapia, 6 casos à cirurgia e 126 pacientes tratados somente com as drogas anti-tiroidianas. A terapia com drogas anti-tiroidianas foi mantida por pelo menos 12 meses, sendo os pacientes encaminhados ao radioiodo ou a cirurgia quando apresentavam efeitos colaterais ou falta de adesão ao tratamento. Foram dosados TSH e T4L após o início de cada opção terapêutica a cada 30-60 dias e depois a cada três meses. Se evoluíssem para hipotireoidismo, era instituído o tratamento com levotiroxina.

Dos 282 pacientes, 144 apresentaram oftalmopatia. Sua avaliação foi baseada nos seguintes critérios:

a) Atividade da oftalmopatia quantificada por meio de um escore clínico “clinical activity score” que leva em consideração sete manifestações da doença: dor retrobulbar espontânea, dor com o movimento ocular, eritema palpebral, edema palpebral, hiperemia conjuntival, quemose (edema de conjuntiva) e edema de carúncula. Um ponto é dado por cada manifestação e a somatória varia de zero (sem atividade) até sete (atividade muito alta);

b) Medidas de proptose por meio do exoftalmômetro de Lind, sendo considerados os valores de normalidade de 18mm para asiáticos, 20 mm para caucasianos e 22mm para negróides.

A presença de oftalmopatia foi baseada na positividade do escore de atividade clínica (1-7) e/ou confirmação de proptose acima dos valores de normalidade.

3.1.2 Pacientes com carcinoma diferenciado da tireoide

Todos os pacientes com diagnóstico de CDT seguiram um protocolo-padrão implantado no ambulatório de Tumores da Tireoide da UNICAMP há mais de 25 anos e possuem uma ficha na qual constam, além de dados de identificação, idade ao diagnóstico, sexo, etnia, dados clínicos pré-cirúrgicos, exposição a agentes ambientais, dieta, tabagismo, uso de medicamentos e drogas, exames realizados (ultrassom, pesquisa de corpo inteiro com iodo131, biópsia aspirativa), dados referentes à cirurgia e do exame anatomopatológico (medida do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação e presença de linfonodos metastáticos). Informações ligadas ao estrógeno, como, idade da menarca, idade da menopausa, uso de anticoncepcionais e por quanto tempo, número de gestações, número de paridade e número de abortos espontâneos, além do uso ou não de reposição hormonal.

Nenhum dos pacientes possuía histórico de exposição acidental ou médica à radiação ionizante ou de doença tiroídiana prévia e antecedentes de outras malignidades. Todos os dados, incluindo o diagnóstico de outras doenças concomitantes, foram confirmados nos prontuários dos pacientes.

A população estudada foi composta por 292 casos, sendo 248 mulheres e 44 homens, com média de idade de $42,23 \pm 14,81$ anos.

Duzentos e cinquenta e dois pacientes tinham diagnóstico de carcinomas papilíferos e 40 pacientes de carcinomas foliculares, todos selecionados após resultado confirmado do anatomopatológico.

A etnia dos pacientes foi determinada por meio de entrevista, seguindo os critérios do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mas por causa da dificuldade de classificação e pelo fato da população analisada ser altamente miscigenada, decidiu-se agrupá-los em brancos e não-brancos. Em relação ao tabagismo, foram agrupados apenas em não-fumantes e fumantes, para fins estatísticos, porque os dados relativos ao número de cigarros fumados e tempo de uso de cigarro foram considerados pouco confiáveis.

Os critérios de exclusão para os pacientes foram aqueles que possuem histórico de exposição acidental ou médica à radiação ionizante ou de doença tiroídiana prévia e antecedentes de outras malignidades. Todos os dados, incluindo o diagnóstico de outras doenças concomitantes, são confirmados nos prontuários dos pacientes.

3.1.2.1 Seguimento

Os pacientes com câncer foram acompanhados com pesquisa periódica de corpo inteiro com ^{131}I , TSH sérico e medidas de tireoglobulina (Tg) de acordo com o protocolo de

seguimento. Essa pesquisa também incluiu Raio-X, ultrassonografia, tomografia computadorizada e outros procedimentos para detectar metástase à distância, de acordo com cada caso. Pacientes com altos valores de tireoglobulina ($>2\text{mg/dL}$) e/ou pesquisas de corpo inteiro suspeitas foram submetidos a uma busca por meio de exames de imagens. Os tumores foram definidos como recorrentes e/ou apresentando metástases à longa distância a partir do encontro de lesões nos exames de imagem e da persistência de valores ascendentes de Tg. Foram considerados pacientes assintomáticos e livres de doença aqueles que apresentavam Tg indetectável ou $<1\text{ng/dL}$.

3.1.3 Controles

Para o grupo controle, foram selecionados 308 indivíduos saudáveis da região de Campinas, sendo 246 mulheres e 62 homens, com média de idade de $36,86\pm 12,95$ anos. Todas as amostras de sangue periféricos foram coletadas no Hemocentro da UNICAMP.

Critérios de exclusão: Indivíduos com história prévia de doenças tiroidianas, exposição à radiação ou outros antecedentes de malignidade.

Tanto os indivíduos do grupo-controle quanto os pacientes foram submetidos a exame físico completo e responderam a um questionário que inclui ocupação, tabagismo, uso de drogas ilícitas e médicas, condições gerais da saúde e informações sobre doenças prévias. Informações ligadas ao estrógeno, como, idade da menarca, idade da menopausa, uso de anticoncepcionais, número de gestações, número de paridade e número de abortos espontâneos, além do uso ou não de reposição hormonal.

A etnia foi classificada em brancos e não-brancos de acordo com a auto-classificação do paciente e segundo o IBGE.

Os pacientes foram agrupados apenas em não-fumantes e fumantes para fins estatísticos já que os dados relativos a números de cigarros fumados e tempo de uso foram considerados pouco confiáveis.

3.2 Metodologias

3.2.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído de todas as amostras de sangue periférico por meio de protocolo adaptado pelo GEMOCA, utilizando-se como base o método do fenol-clorofórmio. Após a extração, o DNA foi quantificado pelo equipamento espectrofotômetro UV-Visível modelo PICODROP, marca Picodrop Limited (Cambridgeshire, UK) e armazenado em congelador a -20° C.

3.2.2 Análise dos genes *CYP17A1*, *HSD - 17 β 1*, *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *COMT* e *SULT1E1*

Para a verificação da presença ou ausência dos polimorfismos, utilizou-se o TaqMan® SNP Genotyping (7500 Real Time PCR Systems). Tal técnica tem como base a estabilidade térmica do DNA de dupla fita. Em condições de alta stringência, essa estabilidade é suficiente para distinguir entre pares de sonda o DNA-alvo perfeitos e imperfeitos. A hibridização só acontece se ocorrer pareamento perfeito entre sonda e DNA-alvo. Assim, podem ser construídas sondas específicas para cada alelo. O ensaio para genotipagem de TaqMan® SNP Genotyping (Applied Biosystems, CA), constitui uma

combinação da hibridização e da atividade exonucleásica 5' da DNA-polimerase, acoplada à detecção de fluorescência [124].

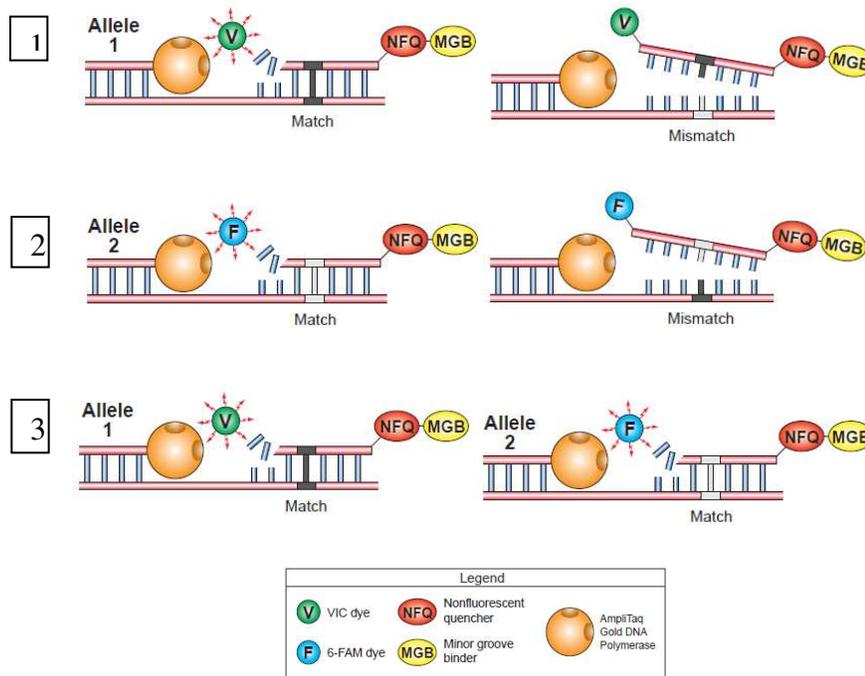


Figura 6: Esquema de ligações ou não entre o alvo e sequências de sonda pela técnica TaqMan. Esquema 1: Ligação apenas da sonda VIC indicando o genótipo homocigoto. Esquema 2: Ligação da sonda FAM, indicando também o genótipo homocigoto. Esquema 3: Ligação da sonda VIC e FAM indicando o genótipo heterocigoto. Figura adaptada de Livak e col. [125].

As probes e os primers foram adquiridos pela TaqMan® SNP Genotyping. Abaixo está a lista dos números dos ensaios utilizados que são determinados pela empresa Applied Biosystems:

Tabela 1: Genes estudados com suas respectivas sondas.

Gene	Identificação do Ensaio	RS	Concentração	Sonda VIC/FAM
<i>CYP17A1</i>	C_2852784_30	rs743572	20x	GACAGC[A/G]GTGGAG
<i>HSD-17β1</i>	C_2350902_10	rs605059	40x	GGGCGC[A/G]GTGCGG
<i>CYP1A1</i>	AHS0729	rs4646903	40x	CCTCC[T/C]GGGCTCA
<i>CYP1A2</i>	C_8881221_40	rs762551	20x	GTGGGC[C/A]CAGGAC
<i>CYP1B1</i>	C_3099976_30	rs1056836	20x	ACTTCA[C/G]TGGGTC
<i>CYP1B1</i>	C_11642651_30	rs1800440	20x	TCCTTG[C/T]TGATGA
<i>CYP1B1</i>	AH700PJ	rs743572	40x	GCCG[G/T]CCTT
<i>COMT</i>	C_25746809_50	rs4680	20x	GCTGGC[A/G]TGAAGG
<i>SULT1E1</i>	C_30633927_10	rs3736599	20x	AAATAC[C/T]AAGGCA

O volume utilizado na solução foi de 5 µl, contendo 20 ng de DNA da amostra, 2,5 µl de Taqman universal PCR Master Mix (concentração final 1X), 0,25 µl do ensaio (sonda e primers) para a concentração de 20x e 0,125 µl para a concentração de 40x (concentração final de 1x) e 2,25 µl de água milli-q. Em todas as reações utilizou-se um controle negativo e outro positivo.

Os seguintes ciclos foram utilizados na PCR: a fase inicial de desnaturação foi de dez minutos a 95°C, seguida por 50 ciclos de 92°C por 15 segundos, 60°C por 90 segundos. O software utilizado para a análise foi “Sequence Detection Software”, versão 1.3 (Applied Biosystems, CA).

Nas figuras 7, 8, 9 e 10, exemplificamos os resultados observados no Real Time para os genes, *CYP17A1*, *HSD17β1*, *CYP1A1 MI*, *CYP1A2*F*, *CYP1B1* códon 119, *CYP1B1* códon 432, *CYP1B1* códon 453, *COMT* e *SULT1E1*.

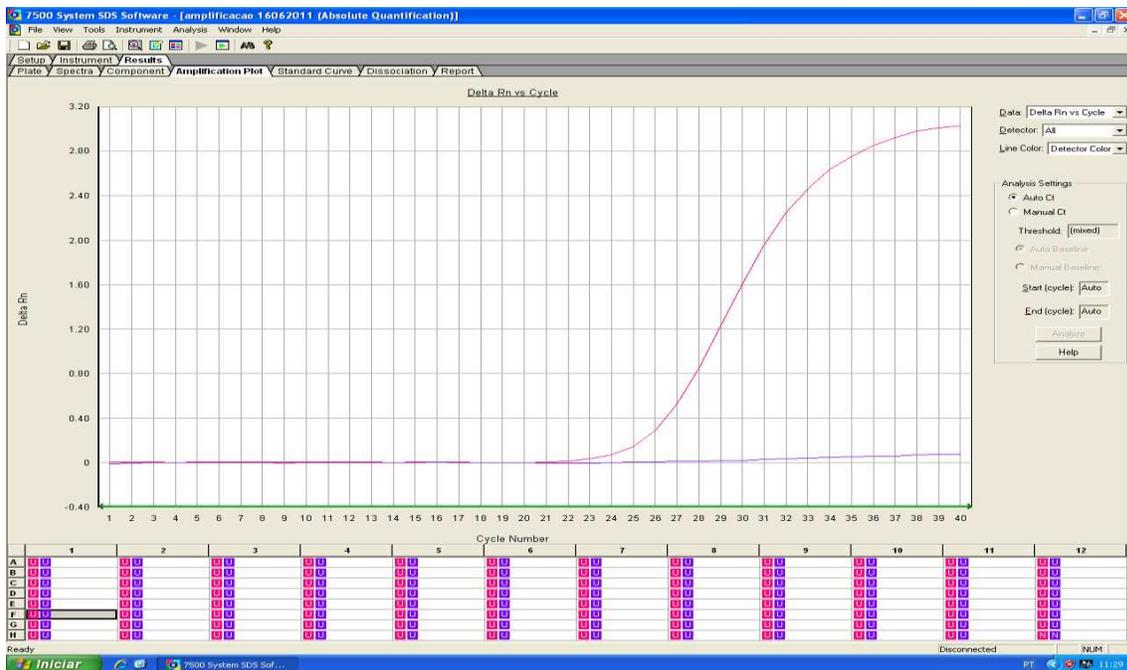


Figura 7: Esta figura mostra o resultado da técnica TaqMan® SNP Genotyping. Pode-se observar que a curva em destaque indica que o indivíduo apresenta o genótipo homozigoto selvagem.

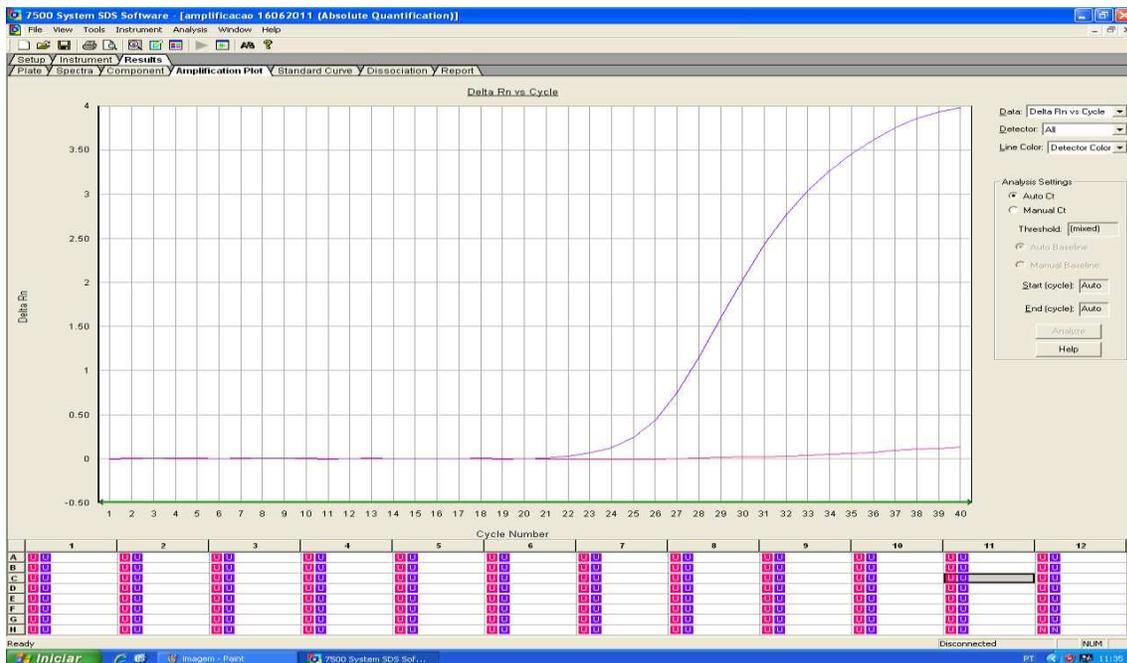


Figura 8: Esta figura mostra o resultado da técnica TaqMan® SNP Genotyping. Pode-se observar que a curva em destaque indica que o indivíduo apresenta o genótipo homozigoto polimórfico.

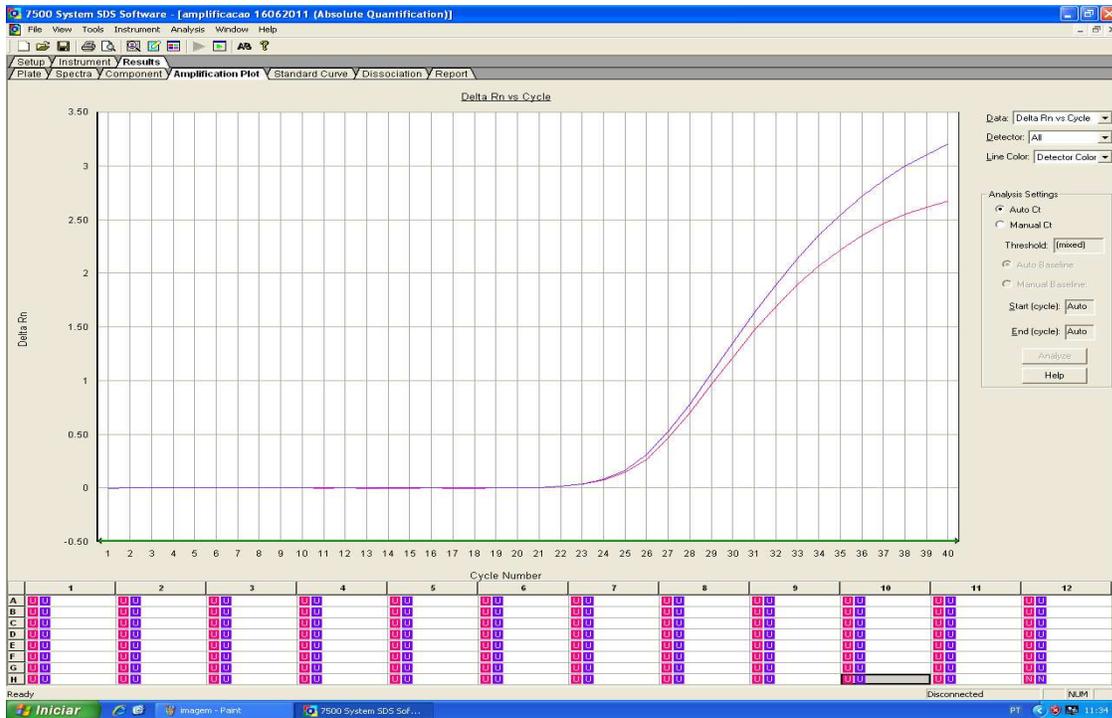


Figura 9: Esta figura mostra o resultado da técnica TaqMan® SNP Genotyping. Pode-se observar que as curvas indicam que o indivíduo apresenta o genótipo heterozigoto.

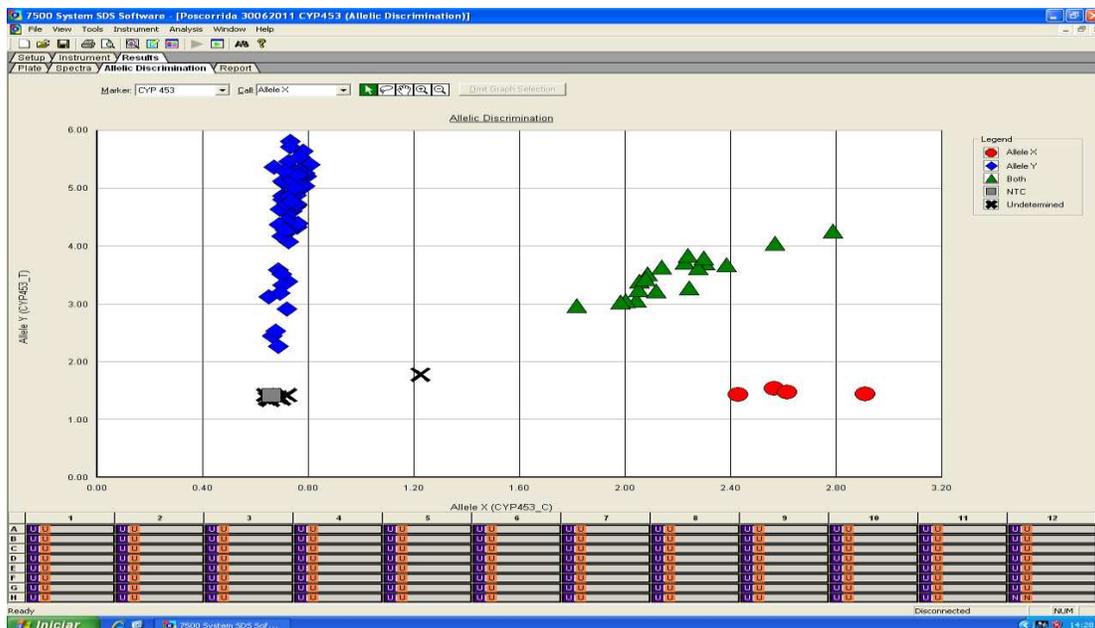


Figura 10: Esta figura resume os resultados da técnica TaqMan® SNP Genotyping. Em azul, indica que as amostras são homozigotos para o alelo T; em verde, as amostras são heterozigotas, em vermelho, as amostras são homozigotas para o alelo C, e em preto, as amostras não foram identificadas.

3.2.3 Análise estatística

Para a análise estatística realizada tanto para os pacientes com CDT como os com DG foi utilizado o software SAS (Statistical Analyses System), versão 8.1, Cary, NC, USA, 1999- 2000. Testes exatos de qui-quadrado (χ^2) e o teste exato de Fisher (F) foram usados para examinar a homogeneidade entre os casos e os controles com relação ao sexo, etnia, tabagismo e para os genótipos. Os testes de Mann-Whitney ou Wilcoxon foram usados para se comparar a idade entre diferentes grupos genotípicos. O odds ratio (OR) e o coeficiente de intervalo de 95% “confidence interval- CI” foram usados para indicar o risco que um determinado genótipo de um determinado nódulo possui em relação ao grupo controle. Para identificar fatores de risco para as doenças foi utilizada a análise de regressão logística múltipla. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados para CDT

A análise descritiva das associações mostrou que não houve diferença entre casos e controles quanto a sexo, etnia e hábito tabagista (tabela 2).

Tabela 2: Relação entre caso e controle quanto a características como sexo, etnia e hábito tabagista.

Características	CDT (N)	Controles (N)	p
Mulheres	248	246	0,1032
Homens	44	62	
Branco	247	259	0,8668
Não-Branco	45	49	
Tabagista	86	26	0,3006
Não-Tabagista	67	241	

No entanto, observou-se diferença entre os casos e controles em relação a alguns dados relacionados com estrógeno, como menopausa ($p < 0.0001$) e reposição hormonal ($p < 0.0001$), mas não para o uso de anticoncepcional (tabela 3).

Tabela 3: Características dos pacientes e controles em relação ao uso de reposição hormonal, menopausa e uso de anticoncepcional.

Características	CDT		CONTROLE		P
	SIM N (%)	NÃO N (%)	SIM N (%)	NÃO N (%)	
Reposição Hormonal	21 (8,47)	94 (37,90)	10 (4,69)	17 (7,98)	<0,0001
Menopausa	115 (46,37)	133 (53,63)	31(14,29)	186 (85,71)	<0,0001
Anticoncepcional	153 (61,69)	95 (38,31)	136 (62,96)	80 (37,04)	0,7784

4.1.1 Resultados para o Gene *CYP17A1*

A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos do gene *CYP17A1* para CDT e grupo controle. O perfil genético dos pacientes com CDT diferiu do perfil dos controles (tabela 4).

Tabela 4: Distribuição dos genótipos do gene *CYP17A1* para CDT e grupo controle

Gene	Genótipos	Controles N (%)	CDT N (%)
<i>CYP17A1</i>	TT	113 (36,69)	105 (35,96)
	TC	137(44,48)	150 (51,37)
	CC	58 (18,83)	37 (12,67)

A análise de regressão logística mostrou que a herança do genótipo CC, ou seja, homocigoto polimórfico do gene *CYP17A1* aumenta a suscetibilidade para o CDT (p=0,0421) (OR= 1,648; IC95%= 1,018 - 2,669).

A análise descritiva e as associações das variáveis clínicas para o polimorfismo do gene *CYP17A1* mostrou que não há correlação entre o perfil genético e fatores como sexo ($p= 0,8242$), etnia ($p= 0,9893$), hábito tabagista ($p= 0,7623$), idade da menarca ($p= 0,4073$), idade da menopausa ($p= 0,1263$), uso de anticoncepcional ($p= 0,9006$), reposição hormonal ($p= 0,2749$), ou mesmo com o tipo de tumor: papilífero ou folicular ($p= 0,2953$). Porém a análise de Kruskal-Wallis mostrou que a herança em heterozigose do gene *CYP17A1* se correlaciona com o número de abortos como mostra a tabela 5:

Tabela 5: Análise de Kruskal-Wallis para o gene *CYP17A1*, variável aborto:

Gene	Genótipo	Aborto (N)	Média	p
<i>CYP17A1</i>	TT	89	0,4	0,0150*
	TC	125	0,8	
	CC	30	0,7	

*(TC≠TT)

4.1.2 Resultados para o Gene *HSD-17β1*

Não encontramos diferença entre os genótipos do gene *HSD-17β1* nos pacientes com CDT e no grupo controle ($p= 0,8885$), já que a distribuição genotípica foi similar entre casos e controles (tabela 6).

Tabela 6: Distribuição dos genótipos do gene *HSD-17β1* entre casos e controles

Gene	Genótipos	Controles N (%)	CDT N (%)
<i>HSD-17β1</i>	AA	76 (24,68)	64 (21,92)
	AG	151 (49,03)	158 (54,11)
	GG	81 (26,30)	70 (23,97)

Não houve correlação entre os genótipos do gene *HSD-17β1* com as características clínicas como sexo ($p= 0,4057$), etnia ($p= 0,1683$), hábito tabagista ($p= 0,8110$), idade da menarca ($p= 0,1239$) e menopausa ($p= 0,8811$), uso de anticoncepcional ($p= 0,3143$), reposição hormonal ($p= 0,7997$). Não há diferença também entre o carcinoma papilífero e o folicular ($p= 0,5089$).

4.1.3 Resultados para o Gene *CYP1A1 M1*

A tabela 7 mostra a distribuição dos genótipos do gene *CYP1A1 m1* em pacientes e controles.

Tabela 7: Distribuição dos genótipos do gene *CYP1A1 m1*

Gene	Genótipos	Controles N (%)	CDT N (%)
<i>CYP1A1 M1</i>	CC	14 (4,55)	7 (2,40)
	CT	82 (26,62)	94 (32,19)
	TT	212 (68,83)	191 (65,41)

A análise de regressão logística múltipla mostra que a herança do genótipo CT aumenta a suscetibilidade em 1,3 vezes para o CDT ($p= 0,0328$; $OR= 1,302$; $IC\ 95\%= 0,906-1,872$).

Não houve correlação entre os genótipos do gene *CYP1A1 ml* e variáveis clínicas como sexo ($p= 0,5215$), etnia ($p= 0,9822$), hábito tabagista ($p= 0,2755$), menopausa ($p= 0,7713$), uso de anticoncepcional ($p= 0,1780$), reposição hormonal ($p= 0,8189$) e menarca ($p= 0,8908$) ou mesmo com os tipos histológicos do CDT, papilífero e o folicular ($p= 0,9159$).

4.1.4 Resultados para o Gene *CYP1A2*F*

A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos do gene *CYP1A2* nos pacientes com CDT e grupo controle (tabela 8).

Tabela 8: Distribuição dos genótipos do gene *CYP1A2*F*

Gene	Genótipos	Controles N (%)	Câncer N (%)
<i>CYP1A2*F</i>	AA	158 (51,30)	125 (42,81)
	AC	114 (37,01)	131 (44,86)
	CC	36 (12,33)	36 (11,69)

Indivíduos que herdaram o genótipo AC tem um risco aumentado em 1,6 vezes na suscetibilidade ao desenvolvimento do CDT do que os indivíduos que herdaram o genótipo AA ($p= 0,0085$), segundo a análise de regressão logística.

Não houve correlação entre os genótipos do gene *CYP1A2*F* e variáveis clínicas como sexo (p= 0,8281), etnia (p= 0,4565), uso de anticoncepcional (p= 0,2997), reposição hormonal (p= 0,0553) e menarca (p= 0,0744) e também entre o carcinoma papilífero e o folicular (p= 0,8708). Porém encontramos correlação entre o hábito tabagista (p= 0,0091), mulheres que ainda não entraram na menopausa (p= 0,0161) e a herança do genótipo AC. A análise de Kruskal-Wallis indica que a herança do genótipo AC está relacionado ao aparecimento de CDT em idade mais precoce (p= 0,0073) (tabela 9).

Tabela 9: Análise de Kruskal-Wallis para o gene *CYP1A2*, variável idade.

Gene	Genótipo	Idade	Média	p
<i>CYP1A2*F</i>	AA	125	45	0,0073*
	AC	131	39,5	
	CC	36	42,6	

*(AA≠AC)

4.1.5 Resultados para o Gene *CYP1B1*

A tabela 10 mostra a distribuição dos genótipos do gene *CYP1B1* códon 453, 119 e 432.

Tabela 10: Distribuição dos genótipos do gene *CYP1B1*

Códon	Genótipos	Controles N (%)	Câncer N (%)
453	CC	12 (3,90)	15 (5,14)
	CT	82 (26,62)	74 (25,34)
	TT	214 (69,48)	203 (69,52)
119	TT	44 (14,29)	59 (20,21)
	GT	142 (46,10)	145 (49,66)
	GG	122 (39,61)	88 (30,14)
432	GG	57 (18,51)	58 (19,86)
	CG	137 (44,48)	156 (53,42)
	CC	114 (37,01)	78 (26,71)

A análise de regressão logística mostrou que a herança do genótipo TT do códon 119 aumenta o risco do desenvolvimento do CDT em mais de 4 vezes quando comparado com o genótipo GG, e em mais de 2 vezes quando comparado com o genótipo GT. Observou-se também que a presença do genótipo CG do códon 432 influencia na suscetibilidade para o desenvolvimento do CDT. Não há relação entre os polimorfismos do códon 453 e a suscetibilidade ao surgimento do CDT ($p= 0,6866$).

A análise das associações entre as variáveis clínicas e o polimorfismo do gene *CYP1B1* códon 119 indica que há uma relação da herança para tal polimorfismo com o hábito tabagista ($p= 0,0269$), menopausa ($p= 0,0317$) e reposição hormonal ($p= 0,0197$), porém não houve correlação com sexo ($p= 0,8584$), etnia ($p= 0,9073$) ou uso de anticoncepcional ($p= 0,1532$). Não há diferença também entre o carcinoma papilífero e o folicular ($p= 0,3334$). Já a análise de Kruskal-Wallis mostrou que a herança do genótipo TT se associa com a idade da menarca ($p= 0,0077$).

Não houve correlação entre as características clínicas e o polimorfismo do códon 453 para sexo ($p= 0,0739$), etnia ($p= 0,1271$), habito tabagista ($p=0,7109$), menopausa ($p= 0,3745$), reposição hormonal ($p= 0,6873$) e menarca ($p= 0,9963$). Não há diferença também entre o carcinoma papilífero e o folicular ($p= 0,3597$), mas há associação entre o uso de anticoncepcional e o genótipo CC do códon 453 ($p= 0,0332$).

Já a análise do polimorfismo códon 432 indica que não existe correlação entre as características clínicas como sexo ($p= 0,4058$), etnia ($p= 0,9286$), habito tabagista ($p= 0,4425$), menopausa ($p= 0,3448$), uso de anticoncepcional ($p= 0,6151$), reposição hormonal ($p= 0,1925$) e menarca ($p= 0,8365$), mas há associação do carcinoma papilífero com a herança do genótipo GG ($p= 0,0243$).

4.1.6 Resultados para o Gene *COMT*

Na população estudada o perfil genético foi similar entre pacientes com CDT e o grupo-controle, como mostra a tabela abaixo (tabela 11).

Tabela 11: Genótipos do gene *COMT*

Gene	Genótipos	Controles N (%)	Câncer N (%)
<i>COMT</i>	AA	59 (19,16)	54 (18,49)
	AG	141 (45,78)	144 (49,32)
	GG	108 (35,06)	94 (32,19)

Na análise de regressão logística também não se observou diferença ($p= 0.8153$). Também não houve diferença entre o polimorfismo de *COMT* e as características clínicas

como sexo ($p= 0,9015$), etnia ($p= 0,1600$), habito tabagista ($p= 0,4793$), menopausa ($p= 0,9562$), uso de anticoncepcional ($p= 0,2201$), reposição hormonal ($p= 0,9613$) e menarca ($p= 0,9089$) e também entre o carcinoma papilífero e o folicular ($p= 0,5070$).

4.1.7 Resultados para o Gene *SULT1E1*

Não houve diferença de perfil genotípico entre os pacientes com CDT e os controles (tabela 12). Na análise de regressão logística também não se observou diferença ($p= 0,2662$).

Tabela 12: Distribuição dos genótipos do gene *SULT1E1*

Gene	Genótipos	Controles N (%)	Câncer N (%)
<i>SULT1E1</i>	GG	239 (77,60)	213 (72,95%)
	GA	65 (21,10)	71 (24,32)
	AA	4 (1,30)	8 (2,74)

Também não houve associação entre o polimorfismo de *SULT1E1* e as características clínicas como sexo ($p= 0,9718$), etnia ($p= 0,5054$), hábito tabagista ($p= 0,8323$), menopausa ($p= 0,4096$), uso de anticoncepcional ($p= 0,3266$), reposição hormonal ($p= 0,6978$) e menarca ($p= 0,9806$) e também entre o carcinoma papilífero e o folicular ($p= 0,1094$).

4.1.8 Resultados para o todos os genes

A tabela 13 mostra todos os resultados das análises de regressão logística para os genes *CYP17A1*, *CYP11A1 m1*, *CYP11A2* e *CYP11B1*.

Tabela 13: Resultado na análise de regressão logística

Gene	Comparação	OR	IC95%	p
<i>CYP17A1</i>	TC x CC	1,648	1,018-2,669	0,0421
<i>CYP11A1 M1</i>	TC x TT	1,302	0,906-1,872	0,0328
<i>CYP11A2*F</i>	AC x AA	1.612	1,129-2,300	0,0085
<i>CYP11B1 119</i>	GG x TT	4,009	2,468-6,513	<0,0001
	GT x TT	2,153	1,448-3,201	0,0002
<i>CYP11B1 432</i>	CC x GC	1,697	1,165-2,472	0,0059

O teste estatístico Mann-Whitney mostrou que há associação entre idade, menarca, gestação, paridade, aborto e o risco de aparecimento de CDT como mostra a tabela 14, porém não há relação com menopausa.

Tabela 14: Resultado do teste estatístico Mann-Whitney.

Características	Controles		CDT		p
	N	Mediana	N	Mediana	
Idade	308	36,9	292	42,2	<0,0001
Menarca	221	12,3	248	12,9	<0,0001
Gestações	217	1,3	244	3,3	<0,0001
Paridade	217	1,1	244	2,6	<0,0001
Aborto	217	0,2	244	0,6	<0,0001

O modelo múltiplo selecionado pelo processo stepwise, ajustado para idade e tabagismo mostrou que há associação entre idade e os polimorfismos dos genes *CYP1B1* códon 119 e 432, *CYP1A1 m1*, *CYP1A2* e a suscetibilidade para o CDT como demonstrado na tabela 15.

Tabela 15: Resultado do teste estatístico Stepwise

Variável	Referencia	p	OR	IC95%
Idade	-	<0,0001	-	-
<i>CYP1B1 119</i>	GG x TT	<0,0001	4,572	2,761-7,572
	GT x TT	<0,0001	2,283	1,516-3,437
<i>CYP1B1 432</i>	CC x GC	0,0038	1,793	1,207-2,665
<i>CYP1A1 M1</i>	TC x TT	0,0272	3,172	1,139-8,834
<i>CYP1A2</i>	AC x AA	0,0040	1,744	1,195-2,548

4.2 Resultados para DG

Para todos os polimorfismos, foi estudado um total 282 casos de DG (234 mulheres e 48 homens) com média de idade = 39,80±11,70 anos comparados com 308 controles (246 mulheres e 62 homens) com média de idade = 36,86±12,96 anos.

A análise descritiva das associações mostrou que não houve diferença entre casos e controles quanto a sexo e etnia. No entanto, observou-se predomínio de indivíduos de hábito tabagista (p=0.0006), entre os pacientes com DG; a ocorrência de menopausa também se associou com a doença (p=0.0002), mas o uso de anticoncepcional foi mais raro entre pacientes do que nos controles (p<0.0001) assim como ocorreu com reposição hormonal (p=0.0042) como mostrado na tabela 16.

Tabela 16: Pacientes e controles que possuem ou não hábito tabagista, fazem ou não o uso de reposição hormonal; fazem o uso ou não de anticoncepcional ou ainda se já entraram ou não na menopausa.

Características	DG		CONTROLE		P
	SIM N (%)	NÃO N (%)	SIM N (%)	NÃO N (%)	
Tabagismo	97 (34,40)	185 (65,60)	67 (21,75)	241 (78,25)	0,0006
Reposição Hormonal	6 (3,80)	31 (19,62)	10 (4,69)	17 (7,98)	0,0042
Menopausa	62 (28,97)	152 (71,03)	31 (14,29)	186 (85,71)	0,0002
Anticoncepcional	33 (21,29)	122 (78,71)	136 (62,96)	80 (37,04)	<0,0001

4.2.1 Resultados para o gene *CYP17A1*

A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos do gene *CYP17A1* (tabela 17).

Tabela 17: Genótipos do gene *CYP17A1*.

Gene	Genótipos	Controles N (%)	DG N (%)
<i>CYP17A1</i>	AA	113 (36,69)	106 (37,59)
	AG	137 (44,48)	134 (47,52)
	CC	58 (18,83)	42 (14,89)

Não houve diferença de perfil genotípico entre os pacientes com DG e controles para o gene *CYP17A1* ($p= 0,3077$).

A análise das variáveis mostrou que não há relação entre os genótipos do gene *CYP17A1* e dados clínicos como sexo ($p= 0,4826$), etnia ($p= 0,4470$), hábito tabagista ($p=$

0,3209), presença ou ausência de oftalmopatia (p= 0,4540), positividade para AcTPO (p= 0,5144) e AcTg (p= 0,4077), idade (p= 0,4590), menarca (p= 0,5309), menopausa (p= 0,9825), gravidez (p= 0,5120), paridade (p= 0,6502), aborto (p= 0,3939), bócio – palpação gramas (p= 0,2067), bócio ultrasson (p= 0,6007), TSH (p= 0,7811), T4L (p= 0,6042), T3 (p= 0,5116), TRAb (p= 0,4377), IMC (p= 0,9545).

4.2.2 Resultados para o gene *HSD-17B1*

Não encontramos diferença para o gene *HSD-17β1* nos pacientes com DG quando comparados aos controles (p= 0,7220) (tabela 18).

Tabela 18: Genótipos do gene *HSD-17β1*.

Gene	Genótipos	Controles N (%)	DG N (%)
<i>HSD-17β1</i>	AA	76 (24,68)	59 (20,92)
	AG	151 (49,03)	154 (54,61)
	GG	81 (26,30)	69 (24,47)

A análise das variáveis mostrou que também não há relação entre os genótipos do gene *HSD-17β1* e dados clínicos como sexo (p= 0,6543), etnia (p= 0,6573), hábito tabagista (p= 0,4928), presença ou ausência de oftalmopatia (p= 0,3818), positividade para AcTPO (p= 0,7503) e AcTg (p=0,5097), idade (p= 0,2336), menarca (p= 0,9879), menopausa (p= 0,3765), aborto (p= 0,5485), bócio – palpação gramas (p= 0,7166), bócio ultrasson (p= 0,4807), TSH (p= 0,0519), T4L (p= 0,8134), T3 (p= 0,3073), TRAb (p= 0,9838), IMC (p= 0,0995).

A análise de Kruskal-Wallis mostrou que o genótipo GG se correlaciona com o número de gestações (p= 0,0256) e com a paridade (p= 0,0141) como mostra a tabela 19.

Tabela 19: Análise de Kruskal-Wallis para o gene *HSD-17β1*, variáveis gravidez e paridade.

Gene	Genótipo	Gestações (N)	Média	p	Paridade (N)	Média	p
<i>HSD-17β1</i>	AA	21	2,3	0,0256*	21	2,0	0,0141*
	AG	67	2,3		67	1,9	
	GG	29	3,2		26	3,2	

*(GG≠AG)

4.2.3 Resultados para o gene *CYP1A1 ml*

A tabela 20 mostra a distribuição dos genótipos do gene *CYP1A1 ml* em pacientes e controles.

Tabela 20: Distribuição dos genótipos do gene *CYP1A1 ml*.

Gene	Genótipos	Controles N (%)	DG N (%)
<i>CYP1A1 MI</i>	CC	14 (4,55)	12 (4,26)
	CT	82 (26,62)	122 (43,26)
	TT	212 (68,83)	148 (52,48)

A diferença entre os genótipos por meio da regressão logística mostra que a presença do genótipo CT influencia na suscetibilidade para o desenvolvimento da DG (p <0,0001).

A análise das variáveis mostrou que não há relação entre os genótipos do gene *CYP1A1* e dados clínicos como sexo (p= 0,0563), etnia (p= 0,1484), hábito tabagista (p= 0,7737), presença ou ausência de oftalmopatia (p= 0,5387), positividade para AcTPO (p= 0,3972) e AcTg (p= 0,1110), idade (p= 0,8204), menarca (p= 0,9941), menopausa (p= 0,2263), bócio ultrasson (p= 0,4504), TSH (p= 0,8719), T4L (p= 0,1357), T3 (p= 0,1093), TRAb (p= 0,1038), IMC (p= 0,2043).

A análise de Kruskal-Wallis mostrou que o genótipo CT se associa com o número maior de gestações (p= 0, 0071), número maior de paridade (p= 0,0204), maior número de aborto (p= 0,0012) e no maior peso do bócio em gramas por meio da palpação (p= 0,0082) como mostra a tabela 21.

Tabela 21: Análise de Kruskal-Wallis para o gene *CYP1A1 M1*, variáveis gravidez, paridade, aborto e bócio.

Características	Genótipos			Média	P
	TT	TC	CC		
Gravidez	40	25	3	4,3	0, 0071
Paridade	40	25	3	3,6	0,0204
Aborto	40	25	3	0,7	0,0012
Bócio	98	83	4	2,3	0,0082

*(TC≠TT)

4.2.4 Resultados para o gene *CYP1A2*F*

A tabela abaixo mostra a distribuição dos genótipos do gene *CYP1A2* nos pacientes com DG e grupo controle (tabela 22).

Tabela 22: Distribuição dos genótipos do gene *CYP1A2*F*.

Gene	Genótipos	Controles N (%)	DG N (%)
<i>CYP1A2*F</i>	AA	158 (51,30)	140 (49,65)
	AC	114 (37,01)	113 (40,07)
	CC	36 (11,69)	29 (10,28)

A análise de regressão logística mostrou que não houve diferença de perfil genotípico dos pacientes com DG e do grupo-controle ($p= 0,8587$).

A análise das variáveis clínicas mostrou que não há relação entre os genótipos do gene *CYP1A2* e sexo ($p= 0,3578$), etnia ($p= 0,3342$), hábito tabagista ($p= 0,2619$), presença ou ausência de oftalmopatia ($p= 0,2357$), positividade para AcTPO ($p= 0,2112$) e AcTg ($p=0,1945$), idade ($p= 0,5687$), menarca ($p= 0,2189$), menopausa ($p= 0,2012$), gravidez ($p= 0,1981$), paridade ($p= 0,2052$), aborto ($p= 0,2546$), bócio – palpação gramas ($p= 0,1117$), bócio ultrasson ($p= 0,0822$), TSH ($p= 0,5930$), T4L ($p= 0,6022$), T3 ($p= 0,5616$), TRAb ($p= 0,4847$), IMC ($p= 0,7782$).

4.2.5 Resultados para o gene *CYP1B1*

A tabela abaixo (tabela 23) mostra a distribuição dos genótipos do gene *CYP1B1* códons 453, 119 e 432.

Tabela 23: Distribuição dos genótipos do gene *CYP1B1*

Códon	Genótipos	Controles N (%)	DG N (%)
453	CC	12 (3,90)	10 (3,55)
	CT	82 (26,62)	61 (21,63)
	TT	214 (69,48)	211 (72,82)
119	TT	44 (14,29)	44 (15,60)
	GT	142 (46,10)	124 (43,97)
	GG	122 (39,61)	114 (40,43)
432	GG	57 (18,51)	69 (24,47)
	CG	137 (44,48)	135 (47,87)
	CC	114 (37,01)	78 (27,66)

A análise dos grupos em relação aos seus genótipos por meio da regressão logística, mostrou que a herança do genótipo TT do códon 119 aumenta o risco do desenvolvimento da DG em quase 7 vezes quando comparado com o genótipo GG, e em mais de 2 vezes quando comparado com o genótipo GT. Observou-se também que a presença do genótipo GG do códon 432 aumenta a suscetibilidade para o desenvolvimento da DG em 1,7 vezes quando comparado com o genótipo CC, e em 1,4 vezes quando comparamos o genótipo CG *versus* CC.

Não encontramos relação entre os polimorfismos do códon 453 e a suscetibilidade ao surgimento da DG ($p= 0,4791$).

A análise das variáveis clínicas mostrou que não havia relação entre os genótipos do códon 432 e dados clínicos como sexo ($p= 0,2872$), etnia ($p= 0,1687$), hábito tabagista ($p= 0,2608$), presença ou ausência de oftalmopatia ($p= 0,3201$), positividade para AcTPO ($p= 0,0912$) e AcTg ($p= 0,4849$), menarca ($p= 0,2663$), menopausa ($p= 0,6018$), gravidez ($p=$

0,1348), paridade (p= 0,3280), aborto (p= 0,0944), bócio – palpação gramas (p= 0,9766), bócio ultrasson (p= 0,5153), TSH (p= 0,5156), T4L (p= 0,0815), T3 (p= 0,9640), TRAb (p= 0,0684).

Porém mostrou que a herança do genótipo GG influencia no desenvolvimento da DG quando associado à idade (41,6 anos) (p= 0,0204) e ao IMC (26,3 - sobrepeso) (p= 0,0392).

Já para o códon 119, não encontramos relação entre os genótipos e dados clínicos como sexo (p= 0,9044), etnia (p= 0,3795), hábito tabagista (p= 0,8704), presença ou ausência de oftalmopatia (p= 0,0702), positividade para AcTPO (p= 0,9884) e AcTg (p= 0,3224), idade (p= 0,8357), menarca (p= 0,5238), menopausa (p= 0,9288), gravidez (p= 0,6730), paridade (p= 0,3656), aborto (p= 0,9843), bócio – palpação gramas (p= 0,2286), bócio ultrasson (p= 0,2858), TSH (p= 0,0986), T3 (p= 0,5315), IMC (p= 0,1532).

Encontramos associação entre valores mais elevados (> 4,2 ng/dL) de T4l (p= 0,0409) e valores mais elevados (>159,9%) de TRAb (p= 0,0465) com os genótipos GT e TT, respectivamente para o desenvolvimento da DG.

4.2.6 Resultados para o gene *COMT* e *SULT1E1*

Não houve diferença entre de perfil genotípico dos pacientes e controles (tabela 24) tanto para o polimorfismo do gene *COMT* quanto do gene *SULT1E1*. Na análise de regressão logística também não se observou diferença.

Tabela 24: Distribuição dos genótipos do gene *COMT* e *SULT1E1*.

Gene	Genótipos	Controles N (%)	DG N (%)
<i>COMT</i>	GG	108 (35,06)	96 (34,04)
	GA	141 (45,78)	141 (50,00)
	AA	59 (19,16)	45 (15,96)
<i>SULT1E1</i>	GG	239 (77,60)	211 (72,82)
	GA	65 (21,10)	66 (23,40)
	AA	4 (1,30)	5 (1,77)

Nossos dados mostram que na população estudada não observamos diferença entre casos e controles para estes dois genes, provavelmente pela distribuição genotípica ser similar. Também não há diferença entre os genótipos e dos dados clínicos.

4.2.7 Resultados para o todos os genes

A tabela 25 mostra todos os resultados das análises de regressão logística para os genes *CYP1A1 m1* e *CYP1B1*.

Tabela 25: Resultado na análise de regressão logística.

Gene	Comparação	OR	IC95%	p
<i>CYP1A1 m1</i>	CT x TT	2,120	1,480-3,037	<0,0001
<i>CYP1B1 119</i>	GG x TT	6,942	4,213-11,440	< 0,0001
	GT x TT	2,374	1,547-3,643	< 0,0001
<i>CYP1B1 432</i>	GG x CC	1,733	1,087-2,764	0,0208
	GC x CC	1,498	1,017-2,205	0,0408

O teste estatístico Mann-Whitney mostrou que há associação entre maior idade e menarca, número maior de gestações, paridade e aborto, e o risco de aparecimento da DG como mostra a tabela 26.

Tabela 26: Resultado do teste estatístico Mann-Whitney.

Características	Controles		DG		p
	N	Media	N	Media	
Idade	308	36,9	282	39,8	0,0021
Menarca	221	12,3	185	12,9	0,0012
Gestações	217	1,3	168	2,7	<0,0001
Paridade	217	1,1	169	2,3	<0,0001
Aborto	217	0,2	169	0,4	0,0029

O processo múltiplo selecionado pelo *stepwise*, ajustado para idade, etnia e tabagismo confirma que há associação entre idade, etnia, tabagismo, os polimorfismos dos genes *CYP1B1* códon 119 e *CYP1A1* m1 e a suscetibilidade à DG.

Tabela 27: Resultado do teste estatístico Stepwise.

Variável	Referencia	p	OR	IC95 %
Idade	-	0,0467	-	-
Etnia	-	0,0197	-	-
Tabagismo	-	0,0101	-	-
<i>CYP1B1</i> 119	GG x TT	<0,0001	7,278	4,321-12,258
	GT x TT	<0,0001	2,559	1,633-4,008
<i>CYP1A1</i> M1	TC x TT	0,0009	1,951	1,317-2,892

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, uma quantidade significativa de evidências foram acumuladas no que diz respeito às variações individuais na suscetibilidade à doenças. Está claro que muitas doenças não são de origem monogénéticas, ao contrário, são resultados de uma complexa interação entre fatores ambientais e diferentes genes [126].

Consequentemente, fenótipos típicos não apresentam padrões de herança mendeliana clássica atribuível a um locus único. Além disso, genes diferentes parecem agir em várias combinações, causando graus individuais de suscetibilidade em uma determinada pessoa [126]. Uma característica poligenética foi proposta para características quantitativas, como por exemplo, diabetes, hipertensão e pré-eclâmpsia e, para características complexas, por exemplo, endometriose e câncer de mama [126].

De acordo com a American Thyroid Association, a incidência do câncer de tireóide é de 3 a 4 vezes maior em mulheres. O fato é que o risco de uma mulher desenvolver uma doença da tireóide é de 1 em cada 8, sendo portanto, comparável ao risco de uma mulher desenvolver o câncer de mama esporádico. A gravidez e a menopausa precoce aumentam este risco [127-129].

Estradiol é um hormônio pleiotrópico por ser um fator de transcrição nuclear para uma série de genes diferentes. O receptor de estrógeno (ER) liga-se a elementos de resposta clássica (EREs) no promotor de uma ampla variedade de genes-alvo e ativa a transcrição do gene recrutando proteínas coativadoras [130]. Assim, o estradiol parece estar envolvido na fisiopatologia de inúmeras doenças como a endometriose, doença de Alzheimer, hipertensão, osteoporose, câncer de mama, câncer de cólon, câncer de próstata, aterosclerose [126], e mais recentemente está sendo associado ao câncer de tireóide [131-133].

Rajoria e col. sugerem que o estrógeno aumente a capacidade miogênica, migratória e invasiva de linhagem celular do câncer de tireóide [129]. Além disso, Ameet Kamat e col. mostraram que o estrógeno pode induzir a um fenótipo pró-angiogênico das células endoteliais no microambiente tumoral tireoidiano por meio da sinalização do ER e VEGF [134].

O estrógeno é capaz de regular a proliferação celular por meio da ligação com seus receptores. O receptor α possui atividade proliferativa e anti-apoptótica enquanto que o receptor β tem efeito pró-apoptótico e capacidade de diferenciação [135]. Estudos experimentais demonstram que o estrógeno contribui para o desenvolvimento do carcinoma papilífero por meio da sua ligação com o ER; desse modo, promove a proliferação celular das células epiteliais foliculares mutadas [43].

Nossos dados sugerem que há relação entre CDT e menopausa e reposição hormonal. Tal dado sugere que há uma possível relação entre hormônios sexuais e o câncer de tireoide, pois estudos mostram que as mulheres, especialmente aquelas com idade acima de 45 anos, têm sido responsáveis pela maior parte do aumento da taxa de incidência deste tipo de câncer [49] e já correlacionaram a presença de estrógeno em uma quantidade mais elevada em tecidos neoplásicos da tireoide do que em tecidos saudáveis [51]. Winters e col. sugerem que há aumento na expressão do estrógeno entre tumores iniciais e recorrentes em mulheres menopausadas sugerindo que o estrógeno influencie na progressão da doença [136]. A menopausa, o uso de anticoncepcional e reposição hormonal também influenciam na DG, reforçando a teoria de que há fatores hormonais estão envolvidos na patogenia da DG [137]. Observamos também a relação da DG com o hábito tabagista, a qual já é bem conhecida, como nós mesmos mostramos [19].

O estrógeno pode induzir a aneuploidia e alterações cromossômicas estruturais [76]. Estudos em animais identificam o estrógeno como cancerígeno [70, 138-139]. A hipótese é que as células proliferam rapidamente, portanto, com maior chance de erro genético. A fita simples do DNA, presente durante a divisão celular, é mais suscetível a danos do que a dupla fita. Uma vez que as mutações são introduzidas em uma célula-alvo, os estrógenos aumentam a replicação dos clones de células que carregam tais erros genéticos [140].

Estudos sugerem que os metabólitos do estrógeno atuem como iniciadores de dano genético [70, 76-77]. Entre os danos causados pelos radicais livres ao DNA induzido pelo estrógeno e seus metabólitos estão quebra de fita simples, o aumento da formação de 8-hidroxi guanina, ligações estrógeno-DNA e oxidação de proteínas e lipídios [76, 141-143]. O aumento da proliferação celular e metabólitos genotóxicos podem agir como aditivos ou de forma sinérgica [89].

Nós demonstramos que a herança polimórfica em homozigose do gene *CYP17A1* aumenta a suscetibilidade para o CDT em 1,6 vezes. Feigelson e col. foram os primeiros a mostrarem uma associação entre o risco para o câncer de mama e o polimorfismo do gene *CYP17A1*, sugerindo que as concentrações hormonais séricas podem variar em função do genótipo [144]. Outro estudo constatou que o polimorfismo do gene *CYP17A1* foi associado com concentrações séricas de estradiol e progesterona entre mulheres jovens nulíparas [145]. Vários estudos discutem sobre *CYP17A1* e o câncer de mama, porém os resultados são inconsistentes e mostram evidências de heterogeneidade entre etnias [146-148]. Não há na literatura de nosso conhecimento registros de associação entre o polimorfismo de *CYP17A1* e o câncer de tireoide. Observamos também que a herança em heterozigose está associada com o número de aborto. Litridis e col. indicam que o polimorfismo em heterozigose não influencia no aborto espontâneo [149] enquanto que

Sata e col. sugerem que o heterozigoto do gene *CYP17A1* pode predispor a um risco aumentado para o aborto [150].

Apesar de não termos encontrado correlação entre *CYP17A1* e a DG, a literatura indica que este gene esteja diretamente ligado a doenças autoimunes [151-153]. Mais uma vez, a composição étnica das populações estudadas pode ter sido responsável pela disparidade de nossos dados com os da literatura.

Nossos dados sugerem também que o gene *HSD-17β1* não influencie na suscetibilidade ao CDT. Sugerimos que a herança polimórfica em homozigose pode estar associada com o número de gestações e a paridade das pacientes com DG, já que *HSD-17β1* foi associado com a alteração das concentrações de estrógeno [154], e esta alteração com gravidez e paridade [155].

O estradiol e a estrona são metabolizadas por duas vias principais por meio da hidroxilação dos anéis A e D [156]. A hidroxilação pelo anel A leva a formação dos estrógenos catecol, 2- ou 4- hidroxiestrogênio, enquanto que a hidroxilação do anel D produz o 16α-hidroxiestrogênio. Os estrógenos catecol são os principais metabólitos do estrógeno [138]. A maior via metabólica do estrógeno é a 2-hidroxilação, que é catalisada em humanos pelas enzimas *CYP1A1* e *CYP1A2* [70].

A análise do gene *CYP1A1* m1 e *CYP1A2**F em nossos pacientes indica que a herança do genótipo CT aumenta a suscetibilidade em 1,3 vezes e a herança do genótipo AC tem um risco aumentado em 1,6 vezes na suscetibilidade ao desenvolvimento do CDT respectivamente. Inúmeros trabalhos indicam que essa associação realmente existe, porém com outros tipos de cânceres [157-161]. Apenas Siraj e col. mostraram que o gene *CYP1A1* estava envolvido da suscetibilidade ao CDT [162]. O 2-hidroxiestrogênio possui uma fraca capacidade de ligação ao receptor de estrógeno e tem sido associado a diferenciação celular

e apoptose, apresentando portanto, propriedades antiestrogênica [163-166]. Porém quando estes genes apresentam polimorfismos, estas variantes levam a um aumento da atividade enzimática e por consequência ao aumento nas concentrações de carcinógenos ativados [102].

A associação entre o hábito tabagista e o gene *CYP1A2* também já foi mostrada pelo nosso grupo [167]. Porém não há dados que indiquem que mulheres que ainda não entraram na menopausa estejam relacionadas à herança do genótipo AC como mostram os nossos achados atuais, apenas indica que ele atua na menarca, e nem que tal genótipo influencie na idade [168].

Na DG encontramos que a presença do genótipo TC influencia na suscetibilidade para a doença e que este genótipo se associa ao número de gestações, paridade, aborto e no peso do bócio em gramas. Nosso grupo já mostrou anteriormente que o polimorfismo deste gene aumenta o risco de DG [19]. Muitas mulheres com DAIT apresentam irregularidades menstruais, problemas de fertilidade e aumento no número de aborto [169].

Em contraste com a 2-hidroxilação, está a produção da 4- hidroxilação que tem como responsável o gene *CYP1B1* [70]. A razão da concentração entre o 4-hidroxiestrógeno para o 2-hidroxiestrógeno é de 4:1 [76].

Nossos achados mostram que a herança do genótipo TT do códon 119 aumenta o risco do desenvolvimento do CDT em mais de 4 vezes quando comparado com o genótipo GG, e em mais de 2 vezes quando comparado com o genótipo GT. Indica também que há associação com o hábito tabagista, menopausa e reposição hormonal além de mostrar que se associa com a idade da menarca. Para a DG, a herança do genótipo TT também aumenta o risco do desenvolvimento da doença em quase 7 vezes quando comparado com o genótipo GG, e em mais de 2 vezes quando comparado com o genótipo GT. Tanto as

concentrações de T4L quanto os de TRAb sofrem a influencia do genótipo GT e TT, respectivamente, para o desenvolvimento da DG.

Observou-se também que a presença do heterozigoto do códon 432 influencia na suscetibilidade para o desenvolvimento do CDT e que a herança do homozigoto polimórfico influencia o carcinoma papilífero da tiróide. O homozigoto polimórfico influencia na suscetibilidade para o desenvolvimento da DG em 1,7 e o heterozigoto em 1,4 vezes. A idade e o IMC sofrem influência do genótipo GG.

Não observamos relação entre os polimorfismos do códon 453 e a suscetibilidade ao surgimento do CDT ou a DG, mas encontramos associação como uso de anticoncepcional para as mulheres com CDT e o genótipo CC. Esta herança, portanto, também pode caracterizar um grupo de risco para o câncer.

O polimorfismo do códon 432 possui grande impacto sobre as propriedades catalíticas de *CYP1B1*, o genótipo Val/Val possui três vezes maior atividade da 4-hidroxilase do que o genótipo Leu/Leu [170]. Grandes atividades catalíticas também são associadas ao códon 119, Ser/Ser [171]. Tais alterações são associadas com o receptor do estrógeno e da progesterona em mulheres com câncer de mama [172], enquanto que mulheres chinesas apresentam associação com essas alterações e o risco para o câncer de mama na pós-menopausa [173].

Fatores menstruais e reprodutivos são suspeitos de estarem associados a várias doenças por causa de uma incidência muito maior entre as mulheres e as implicações prováveis de fatores hormonais, sejam eles hormônios endógenos, tais como estrógenos (8-12), ou hormônios exógenos, como contraceptivos orais (13). Tais fatores menstruais e reprodutivos, como sugerem nossos dados, provavelmente são um dos causadores da diferença entre homens e mulheres para as doenças tiroidianas, sejam eles endógenos como

o estrógeno e os hormônios estimuladores da tiróide [51, 174], ou exógenos como contraceptivos orais, os quais aumentam o risco para o câncer de tiróide [175]. Negri e col. sugerem que a menarca tardia e a menopausa estão ligadas ao câncer de tiróide [176].

Não observamos qualquer relação entre os genes *COMT* e *SULT* e a suscetibilidade a DG e ao CDT e tampouco para as características clínicas, sugerindo que estes genes não sejam importantes na patogênese destas doenças.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados mostraram que o perfil genotípico de genes relacionados ao metabolismo de estrógeno influencia no desenvolvimento da DG e do CDT, permitindo-nos responder às seguintes perguntas:

6.1 Alterações polimórficas nos genes *CYP17A1*, *CYP1A1 m1*, *CYP1A2*1F*, *CYP1B1* códon 119 e *CYP1B1* códon 432 aumentam a suscetibilidade ao CDT, porém este não sofre influência dos genes *HSD-17β1*, *CYP1B1* códon 453, *COMT* e *SULT*.

6.2 Alterações polimórficas nos genes *CYP1A1 m1*, *CYP1B1* códon 119 e *CYP1B1* códon 432 aumentam a suscetibilidade à DG. Já os genes *CYP17A1*, *CYP1A2*F*, *CYP1B1* códon 453, *COMT* e *SULT* não influenciam na suscetibilidade à DG.

6.3 Idade de menopausa, uso de reposição hormonal, idade mais elevada para o surgimento da doença, menarca tardia, maior número de gestações, paridade e abortos aumentam a suscetibilidade à DG.

6.4 Idade de menopausa, uso de reposição hormonal, hábito tabagista, uso de anticoncepcional, idade mais elevada para o surgimento da doença, menarca tardia, maior número de gestações, paridade e abortos aumentam a suscetibilidade ao CDT.

6.5 Entre os pacientes com DG, mulheres heterozigotas para *CYP1A1 m1* apresentam maior número de gestações, paridade e abortos, além de bócio mais pesado (gramas). Já entre os pacientes com CDT, mulheres heterozigotas para *CYP17A1* apresentam maior número de abortos. A herança heterozigota para o gene *CYP1A2*F* está relacionada com idade mais

precoce para o surgimento do CDT. A herança do polimorfismo do gene *CYP1B1* códon 119 está associada ao hábito tabagista, uso de reposição hormonal e presença de menopausa para pacientes com CDT. Já para pacientes com DG, este polimorfismo se correlaciona com concentrações mais elevadas de T4livre e TRAb. A herança em heterozigose do gene *CYP1B1* códon 432 foi mais frequente em pacientes com carcinoma papilífero do que nos pacientes com carcinoma folicular. Além da herança em homozigose se correlacionar com maior idade e com sobrepeso em pacientes com DG. Mulheres com genótipo homozigoto polimórfico para *CYP1B1* códon 453 se correlacionam com uso de anticoncepcional no CDT. Maior número de gestações e de paridade se correlacionam com mulheres homozigotas para o gene *HSD-17β1* na DG.

Considerações Finais:

Os fatores exógenos e endógenos ligados aos hormônios sexuais possuem considerável variabilidade individual devida aos polimorfismos da via de metabolização do estrógeno. As diferentes heranças polimórficas individuais, que são atribuídas aos polimorfismos dos genes codificadores de enzimas envolvidas na produção, metabolização e eliminação do estrógeno devem definir subpopulações de mulheres que são afetadas pela maior exposição aos estrógenos e aos seus metabólitos, os quais afetam o crescimento celular e podem induzir danos celulares carcinogênicos a ativar a resposta imune.

Nossos dados sugerem como um modelo multigênico de suscetibilidade as doenças tireoidianas com base na síntese de estrógeno pode ajudar-nos a compreender a etiologia desta doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saranac, L., et al., *Why is the thyroid so prone to autoimmune disease?* Horm Res Paediatr, 2011. **75**(3): p. 157-65.
2. Arber, N., et al., *High incidence of occult thyroid disease among general medical ward patients.* J Med, 1995. **26**(3-4): p. 139-51.
3. Vanderpump, M.P., *The epidemiology of thyroid disease.* Br Med Bull, 2011. **99**: p. 39-51.
4. Furlanetto, T.W., et al., *[Prevalence of thyroid nodules in 40 years-old or old women].* Rev Assoc Med Bras, 2000. **46**(4): p. 331-4.
5. Knobel, M. and G. Medeiros-Neto, *[Disorders associated to chronic iodine deficiency].* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2004. **48**(1): p. 53-61.
6. Tomimori, E., et al., *Prevalence of incidental thyroid disease in a relatively low iodine intake area.* Thyroid, 1995. **5**(4): p. 273-6.
7. Welker, M.J. and D. Orlov, *Thyroid nodules.* Am Fam Physician, 2003. **67**(3): p. 559-66.
8. How, J. and R. Tabah, *Explaining the increasing incidence of differentiated thyroid cancer.* CMAJ, 2007. **177**(11): p. 1383-4.
9. Ward, L.S. and H. Graf, *[Thyroid cancer: increased occurrence of the disease or simply in its detection?].* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2008. **52**(9): p. 1515-6.
10. SEER, *Cancer Statistics Review 1975-2008.* http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008, 2011.
11. Burgess, J.R. and P. Tucker, *Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology.* Thyroid, 2006. **16**(1): p. 47-53.
12. Davies, L. and H.G. Welch, *Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002.* JAMA, 2006. **295**(18): p. 2164-7.
13. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010.* CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
14. Kilfoy, B.A., et al., *Gender is an age-specific effect modifier for papillary cancers of the thyroid gland.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(4): p. 1092-100.
15. INCA, *Instituto Nacional do Câncer.* 2011.
16. Coeli, C.M., et al., *[Incidence and mortality from thyroid cancer in Brazil].* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2005. **49**(4): p. 503-9.
17. Cordioli, M.I., M.H. Canalli, and M.H. Coral, *Increase incidence of thyroid cancer in Florianopolis, Brazil: comparative study of diagnosed cases in 2000 and 2005.* Arq Bras Endocrinol Metabol, 2009. **53**(4): p. 453-60.
18. Bufalo, N.E., et al., *Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants.* Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(4): p. 1185-93.
19. Bufalo, N.E., et al., *Genetic polymorphisms associated with cigarette smoking and the risk of Graves' disease.* Clin Endocrinol (Oxf), 2008. **68**(6): p. 982-7.
20. Granja, F., et al., *GSTO polymorphism analysis in thyroid nodules suggest that GSTO1 variants do not influence the risk for malignancy.* Eur J Cancer Prev, 2005. **14**(3): p. 277-80.
21. Granja, F., et al., *GST profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy.* Cancer Lett, 2004. **209**(2): p. 129-37.
22. Morari, E.C., et al., *The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. **11**(11): p. 1485-8.
23. Ward, L.S. and L.V. Assumpcao, *The impact of gender in differentiated thyroid cancer.* Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **66**(5): p. 752; author reply 752-3.
24. Buesco, A., *Tireóide: Propedêutica clínica, laboratorial e imaginológica.* In: *Tratado de endocrinologia e cirurgia endócrina.* . 2001, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
25. Tunbridge, W.M. and M.P. Vanderpump, *Population screening for autoimmune thyroid disease.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2000. **29**(2): p. 239-53, v.

26. Wang, C. and L.M. Crapo, *The epidemiology of thyroid disease and implications for screening*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1997. **26**(1): p. 189-218.
27. Tunbridge, W.M., et al., *The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1977. **7**(6): p. 481-93.
28. Hewagama, A. and B. Richardson, *The genetics and epigenetics of autoimmune diseases*. *J Autoimmun*, 2009. **33**(1): p. 3-11.
29. Kivity, S., et al., *Infections and autoimmunity--friends or foes?* *Trends Immunol*, 2009. **30**(8): p. 409-14.
30. Shoenfeld, Y., et al., *The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases--2008*. *Isr Med Assoc J*, 2008. **10**(1): p. 8-12.
31. Fournie, G.J., et al., *Induction of autoimmunity through bystander effects. Lessons from immunological disorders induced by heavy metals*. *J Autoimmun*, 2001. **16**(3): p. 319-26.
32. Rieger, R. and M.E. Gershwin, *The X and why of xenobiotics in primary biliary cirrhosis*. *J Autoimmun*, 2007. **28**(2-3): p. 76-84.
33. Shapira, Y., N. Agmon-Levin, and Y. Shoenfeld, *Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity*. *J Autoimmun*, 2010. **34**(3): p. J168-77.
34. Shoenfeld, N., H. Amital, and Y. Shoenfeld, *The effect of melanism and vitamin D synthesis on the incidence of autoimmune disease*. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2009. **5**(2): p. 99-105.
35. Vanderpump, M.P., et al., *The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1995. **43**(1): p. 55-68.
36. McIver, B. and J.C. Morris, *The pathogenesis of Graves' disease*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998. **27**(1): p. 73-89.
37. Schwartz, M. and I.R. Cohen, *Autoimmunity can benefit self-maintenance*. *Immunol Today*, 2000. **21**(6): p. 265-8.
38. Cohen, I.R. and M. Schwartz, *Autoimmune maintenance and neuroprotection of the central nervous system*. *J Neuroimmunol*, 1999. **100**(1-2): p. 111-4.
39. Weetman, A.P., *New aspects of thyroid immunity*. *Horm Res*, 1997. **48 Suppl 4**: p. 51-4.
40. Weetman, A.P., *Autoimmune thyroid disease: propagation and progression*. *Eur J Endocrinol*, 2003. **148**(1): p. 1-9.
41. Jacobson, E.M. and Y. Tomer, *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**(2-3): p. 85-98.
42. Tomer, Y. and A. Huber, *The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment*. *J Autoimmun*, 2009. **32**(3-4): p. 231-9.
43. Chen, G.G., et al., *Regulation of cell growth by estrogen signaling and potential targets in thyroid cancer*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008. **8**(5): p. 367-77.
44. Chen, G.G., et al., *Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor - ERK pathway*. *Cell Proliferation*, 2007. **40**(6): p. 921-935.
45. Kilfoy, B.A., et al., *Gender is an Age-Specific Effect Modifier for Papillary Cancers of the Thyroid Gland*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2009. **18**(4): p. 1092-1100.
46. Libutti, S.K., *Understanding the role of gender in the incidence of thyroid cancer*. *Cancer J*, 2005. **11**(2): p. 104-5.
47. Rukhman, N. and A. Silverberg, *Thyroid cancer in older men*. *Aging Male*, 2011. **14**(2): p. 91-8.
48. Tavangar, S.M., et al., *Immunohistochemical study of oestrogen receptors in 351 human thyroid glands*. *Singapore Med J*, 2007. **48**(8): p. 744-7.
49. Chen, A.Y., A. Jemal, and E.M. Ward, *Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005*. *Cancer*, 2009. **115**(16): p. 3801-7.

50. GLOBOCAN, *Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10*. 2010.
51. Manole, D., et al., *Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 1072-7.
52. Auricchio, F., et al., *Protein tyrosine phosphorylation and estradiol action*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **784**: p. 149-72.
53. Kato, S., et al., *Activation of the Estrogen-Receptor through Phosphorylation by Mitogen-Activated Protein-Kinase*. Science, 1995. **270**(5241): p. 1491-1494.
54. Kim-Schulze, S., W.L. Lowe, Jr., and H.W. Schnaper, *Estrogen stimulates delayed mitogen-activated protein kinase activity in human endothelial cells via an autocrine loop that involves basic fibroblast growth factor*. Circulation, 1998. **98**(5): p. 413-21.
55. Berghout, A. and W. Wiersinga, *Thyroid size and thyroid function during pregnancy: an analysis*. Eur J Endocrinol, 1998. **138**(5): p. 536-42.
56. Fleury, Y., et al., *Sex-dependent variations and timing of thyroid growth during puberty*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 750-4.
57. Hegedus, L., S. Karstrup, and N. Rasmussen, *Evidence of cyclic alterations of thyroid size during the menstrual cycle in healthy women*. Am J Obstet Gynecol, 1986. **155**(1): p. 142-5.
58. Zeng, Q., et al., *The contributions of oestrogen receptor isoforms to the development of papillary and anaplastic thyroid carcinomas*. J Pathol, 2008. **214**(4): p. 425-33.
59. Onoe, Y., et al., *Comparative effects of estrogen and raloxifene on B lymphopoiesis and bone loss induced by sex steroid deficiency in mice*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(3): p. 541-9.
60. Da Silva, J.A., *Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses*. Ann Rheum Dis, 1995. **54**(1): p. 6-16.
61. Kincade, P.W., et al., *Pregnancy: a clue to normal regulation of B lymphopoiesis*. Immunol Today, 1994. **15**(11): p. 539-44.
62. Paavonen, T., *Hormonal regulation of immune responses*. Ann Med, 1994. **26**(4): p. 255-8.
63. Ishimaru, N., et al., *Development of autoimmune exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in estrogen-deficient mice of healthy background*. Am J Pathol, 2003. **163**(4): p. 1481-90.
64. Jansson, L., T. Olsson, and R. Holmdahl, *Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice*. J Neuroimmunol, 1994. **53**(2): p. 203-7.
65. Bartsch, H. and E. Hietanen, *The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure*. Environ Health Perspect, 1996. **104 Suppl 3**: p. 569-77.
66. Anwar, W.A., et al., *Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients*. Carcinogenesis, 1996. **17**(9): p. 1923-9.
67. Bois, F.Y., G. Krowech, and L. Zeise, *Modeling human interindividual variability in metabolism and risk: the example of 4-aminobiphenyl*. Risk Anal, 1995. **15**(2): p. 205-13.
68. Kroemer, H.K. and M. Eichelbaum, *"It's the genes, stupid". Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism*. Life Sci, 1995. **56**(26): p. 2285-98.
69. Vineis, P., *The relationship between polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and susceptibility to cancer*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 457-62.
70. Zhu, B.T. and A.H. Conney, *Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives*. Carcinogenesis, 1998. **19**(1): p. 1-27.

71. Ashton, K.A., et al., *Polymorphisms in genes of the steroid hormone biosynthesis and metabolism pathways and endometrial cancer risk*. *Cancer Epidemiol*, 2010. **34**(3): p. 328-37.
72. Lee, A.J., et al., *Characterization of the oxidative metabolites of 17beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms*. *Endocrinology*, 2003. **144**(8): p. 3382-98.
73. Weisz, J., et al., *Elevated 4-hydroxylation of estradiol by hamster kidney microsomes: a potential pathway of metabolic activation of estrogens*. *Endocrinology*, 1992. **131**(2): p. 655-61.
74. Mooberry, S.L., *Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments*. *Drug Resist Updat*, 2003. **6**(6): p. 355-61.
75. Zhu, B.T. and A.H. Conney, *Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis?* *Cancer Res*, 1998. **58**(11): p. 2269-77.
76. Liehr, J.G., *Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?* *Endocr Rev*, 2000. **21**(1): p. 40-54.
77. Cavaliere, E.L., et al., *Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(20): p. 10937-42.
78. Yager, J.D., *Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation*. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2000(27): p. 67-73.
79. Doherty, J.A., et al., *Genetic factors in catechol estrogen metabolism in relation to the risk of endometrial cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(2): p. 357-66.
80. Dawling, S., et al., *Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms*. *Cancer Res*, 2001. **61**(18): p. 6716-22.
81. Adjei, A.A., et al., *Human estrogen sulfotransferase (SULT1E1) pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics*. *Br J Pharmacol*, 2003. **139**(8): p. 1373-82.
82. Belanger, A., et al., *Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1998. **65**(1-6): p. 301-10.
83. Hayes, J.D., J.U. Flanagan, and I.R. Jowsey, *Glutathione transferases*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. **45**: p. 51-88.
84. Kala, Z., et al., *Polymorphisms of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 in patients with reflux esophagitis and Barrett's esophagus*. *J Hum Genet*, 2007. **52**(6): p. 527-34.
85. Nowell, S., et al., *Relationship of phenol sulfotransferase activity (SULT1A1) genotype to sulfotransferase phenotype in platelet cytosol*. *Pharmacogenetics*, 2000. **10**(9): p. 789-97.
86. Tsuchiya, Y., M. Nakajima, and T. Yokoi, *Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human*. *Cancer Lett*, 2005. **227**(2): p. 115-24.
87. Brentano, S.T., et al., *Tissue-specific, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced, and phorbol ester-repressed transcription from the human P450c17 promoter in mouse cells*. *Mol Endocrinol*, 1990. **4**(12): p. 1972-9.
88. Picado-Leonard, J. and W.L. Miller, *Cloning and sequence of the human gene for P450c17 (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): similarity with the gene for P450c21*. *DNA*, 1987. **6**(5): p. 439-48.
89. Mitrunen, K. and A. Hirvonen, *Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism*. *Mutat Res*, 2003. **544**(1): p. 9-41.
90. Carey, A.H., et al., *Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17*. *Hum Mol Genet*, 1994. **3**(10): p. 1873-6.

91. Olson, S.H., E.V. Bandera, and I. Orlov, *Variants in estrogen biosynthesis genes, sex steroid hormone levels, and endometrial cancer: a HuGE review*. *Am J Epidemiol*, 2007. **165**(3): p. 235-45.
92. Mannermaa, A., et al., *Human familial and sporadic breast cancer: analysis of the coding regions of the 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene (EDH17B2) using a single-strand conformation polymorphism assay*. *Hum Genet*, 1994. **93**(3): p. 319-24.
93. Winqvist, R., et al., *The gene for 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase maps to human chromosome 17, bands q12-q21, and shows an RFLP with Scal*. *Hum Genet*, 1990. **85**(5): p. 473-6.
94. Wu, A.H., et al., *HSD17B1 and CYP17 polymorphisms and breast cancer risk among Chinese women in Singapore*. *Int J Cancer*, 2003. **104**(4): p. 450-7.
95. Puranen, T.J., et al., *Site-directed mutagenesis of the putative active site of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1*. *Biochem J*, 1994. **304 (Pt 1)**: p. 289-93.
96. Bartsch, H., et al., *Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000. **9**(1): p. 3-28.
97. Hellmold, H., et al., *Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammoplasties*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(3): p. 886-95.
98. Spink, D.C., et al., *17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1A1: a comparison of the activities induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 cells with those from heterologous expression of the cDNA*. *Arch Biochem Biophys*, 1992. **293**(2): p. 342-8.
99. Spink, D.C., et al., *Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells*. *Carcinogenesis*, 1998. **19**(2): p. 291-8.
100. Kawajiri, K., et al., *Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene*. *FEBS Lett*, 1990. **263**(1): p. 131-3.
101. Nebert, D.W., et al., *Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 23847-50.
102. Landi, M.T., et al., *Association between CYP1A1 genotype, mRNA expression and enzymatic activity in humans*. *Pharmacogenetics*, 1994. **4**(5): p. 242-6.
103. Bertz, R.J. and G.R. Granneman, *Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions*. *Clin Pharmacokinet*, 1997. **32**(3): p. 210-58.
104. Coleman, T., et al., *1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is N-demethylated by cytochromes P450 2D6, 1A2 and 3A4--implications for susceptibility to Parkinson's disease*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. **277**(2): p. 685-90.
105. Gooderham, N.J., et al., *Heterocyclic amines: evaluation of their role in diet associated human cancer*. *Br J Clin Pharmacol*, 1996. **42**(1): p. 91-8.
106. Sachse, C., et al., *Functional significance of a C->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine*. *Br J Clin Pharmacol*, 1999. **47**(4): p. 445-9.
107. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. *Science*, 1988. **240**(4854): p. 889-95.
108. Franks, S., N.J. MacLusky, and F. Naftolin, *Comparative pharmacology of oestrogens and catechol oestrogens: actions on the immature rat uterus in vivo and in vitro*. *J Endocrinol*, 1982. **94**(1): p. 91-8.
109. Barnea, E.R., N.J. MacLusky, and F. Naftolin, *Kinetics of catechol estrogen-estrogen receptor dissociation: a possible factor underlying differences in catechol estrogen biological activity*. *Steroids*, 1983. **41**(5): p. 643-56.

110. Stack, D.E., et al., *Molecular characteristics of catechol estrogen quinones in reactions with deoxyribonucleosides*. Chem Res Toxicol, 1996. **9**(5): p. 851-9.
111. Tang, Y.M., et al., *Human CYP1B1 Leu432Val gene polymorphism: ethnic distribution in African-Americans, Caucasians and Chinese; oestradiol hydroxylase activity; and distribution in prostate cancer cases and controls*. Pharmacogenetics, 2000. **10**(9): p. 761-6.
112. Goodman, M.T., et al., *Case-control study of ovarian cancer and polymorphisms in genes involved in catecholesterogen formation and metabolism*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. **10**(3): p. 209-16.
113. Rylander-Rudqvist, T., et al., *Cytochrome P450 1B1 gene polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk*. Carcinogenesis, 2003. **24**(9): p. 1533-9.
114. Greenlee, H., et al., *Variants in estrogen metabolism and biosynthesis genes and urinary estrogen metabolites in women with a family history of breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **102**(1): p. 111-7.
115. Cavalieri, E., et al., *Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2000(27): p. 75-93.
116. Raftogianis, R., et al., *Estrogen metabolism by conjugation*. J Natl Cancer Inst Monogr, 2000(27): p. 113-24.
117. Yue, W., et al., *Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **86**(3-5): p. 477-86.
118. Kocabas, N.A., et al., *Cytochrome P450 CYP1B1 and catechol O-methyltransferase (COMT) genetic polymorphisms and breast cancer susceptibility in a Turkish population*. Arch Toxicol, 2002. **76**(11): p. 643-9.
119. Lavigne, J.A., et al., *An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer*. Cancer Res, 1997. **57**(24): p. 5493-7.
120. Yim, D.S., et al., *Relationship between the Val158Met polymorphism of catechol O-methyl transferase and breast cancer*. Pharmacogenetics, 2001. **11**(4): p. 279-86.
121. Falany, C.N., *Enzymology of human cytosolic sulfotransferases*. FASEB J, 1997. **11**(4): p. 206-16.
122. Raftogianis, R.B., et al., *Phenol sulfotransferase pharmacogenetics in humans: association of common SULT1A1 alleles with TS PST phenotype*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **239**(1): p. 298-304.
123. Rebbeck, T.R., et al., *Effect of hormone metabolism genotypes on steroid hormone levels and menopausal symptoms in a prospective population-based cohort of women experiencing the menopausal transition*. Menopause, 2010. **17**(5): p. 1026-34.
124. De la Vega, F.M., et al., *Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPLex Genotyping System*. Mutat Res, 2005. **573**(1-2): p. 111-35.
125. Livak, K.J., J. Marmaro, and J.A. Todd, *Towards fully automated genome-wide polymorphism screening*. Nat Genet, 1995. **9**(4): p. 341-2.
126. Huber, J.C., C. Schneeberger, and C.B. Tempfer, *Genetic modeling of estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorders*. Maturitas, 2002. **41 Suppl 1**: p. S55-64.
127. Cook, M.B., et al., *Sex disparities in cancer incidence by period and age*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(4): p. 1174-82.
128. Levi, F., et al., *Female thyroid cancer: the role of reproductive and hormonal factors in Switzerland*. Oncology, 1993. **50**(4): p. 309-15.

129. Rajoria, S., et al., *Metastatic phenotype is regulated by estrogen in thyroid cells*. *Thyroid*, 2010. **20**(1): p. 33-41.
130. Kushner, P.J., et al., *Estrogen receptor pathways to AP-1*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000. **74**(5): p. 311-7.
131. Kumar, A., C.M. Klinge, and R.E. Goldstein, *Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta*. *Int J Oncol*, 2010. **36**(5): p. 1067-80.
132. Vaiman, M., et al., *The estrogen receptors in the papillary carcinoma of the thyroid gland*. *Oncol Res*, 2010. **18**(11-12): p. 537-40.
133. Vaiman, M., et al., *Diagnostic value of estrogen receptors in thyroid lesions*. *Med Sci Monit*, 2010. **16**(7): p. BR203-7.
134. Kamat, A., et al., *Estrogen-mediated angiogenesis in thyroid tumor microenvironment is mediated through VEGF signaling pathways*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2011. **137**(11): p. 1146-53.
135. Speirs, V. and R.A. Walker, *New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast*. *J Pathol*, 2007. **211**(5): p. 499-506.
136. Winters, A., et al., *A postmenopausal woman with gross cystic disease fluid protein-15 and estrogen receptor-positive recurrence of papillary thyroid cancer*. *Thyroid*, 2010. **20**(12): p. 1413-7.
137. Tomer, Y., et al., *Common and unique susceptibility loci in Graves and Hashimoto diseases: results of whole-genome screening in a data set of 102 multiplex families*. *Am J Hum Genet*, 2003. **73**(4): p. 736-47.
138. Liehr, J.G., et al., *Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters*. *J Steroid Biochem*, 1986. **24**(1): p. 353-6.
139. Nandi, S., R.C. Guzman, and J. Yang, *Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(9): p. 3650-7.
140. Jefcoate, C.R., et al., *Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens*. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2000(27): p. 95-112.
141. Matsui, A., et al., *Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes*. *Cancer Lett*, 2000. **151**(1): p. 87-95.
142. Mobley, J.A., A.S. Bhat, and R.W. Brueggemeier, *Measurement of oxidative DNA damage by catechol estrogens and analogues in vitro*. *Chem Res Toxicol*, 1999. **12**(3): p. 270-7.
143. Yoshie, Y. and H. Ohshima, *Synergistic induction of DNA strand breakage by catechol-estrogen and nitric oxide: implications for hormonal carcinogenesis*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **24**(2): p. 341-8.
144. Feigelson, H.S., et al., *A polymorphism in the CYP17 gene increases the risk of breast cancer*. *Cancer Res*, 1997. **57**(6): p. 1063-5.
145. Feigelson, H.S., et al., *Cytochrome p450c17 alpha gene (CYP17) polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations*. *Cancer Research*, 1998. **58**(4): p. 585-587.
146. Haiman, C.A., et al., *The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer*. *Cancer Res*, 1999. **59**(5): p. 1015-20.
147. Helzlsouer, K.J., et al., *Association between CYP17 polymorphisms and the development of breast cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998. **7**(10): p. 945-9.
148. Weston, A., et al., *CYP17 genotype and breast cancer risk*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998. **7**(10): p. 941-4.

149. Litridis, I., et al., *Genetic variation in the CYP17 gene and recurrent spontaneous abortions*. Arch Gynecol Obstet, 2011. **283**(2): p. 289-93.
150. Sata, F., et al., *A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(11): p. 725-8.
151. Stenberg, A.E., et al., *Absence of autoantibodies connected to autoimmune polyendocrine syndrome type I and II and Addison's disease in girls and women with Turner syndrome*. J Negat Results Biomed, 2007. **6**: p. 10.
152. Falorni, A., S. Laureti, and F. Santeusano, *Autoantibodies in autoimmune polyendocrine syndrome type II*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2002. **31**(2): p. 369-89, vii.
153. Seissler, J., et al., *Autoantibodies to adrenal cytochrome P450 antigens in isolated Addison's disease and autoimmune polyendocrine syndrome type II*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1999. **107**(3): p. 208-13.
154. Sakoda, L.C., et al., *Polymorphisms in steroid hormone biosynthesis genes and risk of breast cancer and fibrocystic breast conditions in Chinese women*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2008. **17**(5): p. 1066-1073.
155. Feigelson, H.S. and B.E. Henderson, *Estrogens and breast cancer*. Carcinogenesis, 1996. **17**(11): p. 2279-84.
156. Lippert, T.H., H. Seeger, and A.O. Mueck, *The impact of endogenous estradiol metabolites on carcinogenesis*. Steroids, 2000. **65**(7): p. 357-69.
157. Aiyer, H.S. and R.C. Gupta, *Berries and ellagic acid prevent estrogen-induced mammary tumorigenesis by modulating enzymes of estrogen metabolism*. Cancer Prev Res (Phila), 2010. **3**(6): p. 727-37.
158. Hirata, H., et al., *CYP1A1, SULT1A1, and SULT1E1 polymorphisms are risk factors for endometrial cancer susceptibility*. Cancer, 2008. **112**(9): p. 1964-73.
159. Khvostova, E.P., V.O. Pustyl'nyak, and L.F. Gulyaeva, *Genetic Polymorphism of Estrogen Metabolizing Enzymes in Siberian Women with Breast Cancer*. Genet Test Mol Biomarkers, 2011.
160. Planchard, D., et al., *Differential expression of biomarkers in men and women*. Semin Oncol, 2009. **36**(6): p. 553-65.
161. Syamala, V.S., et al., *Possible risk modification by polymorphisms of estrogen metabolizing genes in familial breast cancer susceptibility in an Indian population*. Cancer Invest, 2010. **28**(3): p. 304-11.
162. Siraj, A.K., et al., *Polymorphisms of selected Xenobiotic Genes contribute to the development of Papillary Thyroid Cancer susceptibility in Middle Eastern population*. BMC Medical Genetics, 2008. **9**.
163. Bradlow, H.L., et al., *2-hydroxyestrone: the 'good' estrogen*. J Endocrinol, 1996. **150 Suppl**: p. S259-65.
164. Gupta, M., A. McDougal, and S. Safe, *Estrogenic and antiestrogenic activities of 16alpha- and 2-hydroxy metabolites of 17beta-estradiol in MCF-7 and T47D human breast cancer cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. **67**(5-6): p. 413-9.
165. Li, G., et al., *Lycium barbarum inhibits growth of estrogen receptor positive human breast cancer cells by favorably altering estradiol metabolism*. Nutr Cancer, 2009. **61**(3): p. 408-14.
166. Telang, N.T., et al., *Estradiol metabolism: an endocrine biomarker for modulation of human mammary carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1997. **105 Suppl 3**: p. 559-64.
167. Guillhen, A.C., et al., *Role of the N-acetyltransferase 2 detoxification system in thyroid cancer susceptibility*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(1): p. 406-12.

168. Kadlubar, F.F., et al., *The CYP3A4*1B variant is related to the onset of puberty, a known risk factor for the development of breast cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. **12**(4): p. 327-31.
169. Poppe, K. and D. Glinoer, *Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy*. *Human Reproduction Update*, 2003. **9**(2): p. 149-161.
170. Li, D.N., et al., *Polymorphisms in P450 CYP1B1 affect the conversion of estradiol to the potentially carcinogenic metabolite 4-hydroxyestradiol*. *Pharmacogenetics*, 2000. **10**(4): p. 343-53.
171. Hanna, I.H., et al., *Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity*. *Cancer Res*, 2000. **60**(13): p. 3440-4.
172. Bailey, L.R., et al., *Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphism with steroid receptor status in breast cancer*. *Cancer Res*, 1998. **58**(22): p. 5038-41.
173. Watanabe, J., et al., *Association of CYP1B1 genetic polymorphism with incidence to breast and lung cancer*. *Pharmacogenetics*, 2000. **10**(1): p. 25-33.
174. Kawabata, W., et al., *Estrogen receptors (alpha and beta) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in thyroid disorders: possible in situ estrogen synthesis and actions*. *Mod Pathol*, 2003. **16**(5): p. 437-44.
175. La Vecchia, C., et al., *A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. III. Oral contraceptives, menopausal replacement therapy and other female hormones*. *Cancer Causes Control*, 1999. **10**(2): p. 157-66.
176. Negri, E., et al., *A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. II. Menstrual and reproductive factors*. *Cancer Causes Control*, 1999. **10**(2): p. 143-55.

8. ANEXOS



LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa em Câncer de Tireóide

Pesquisadora: Prof^a Dra Laura Sterian Ward

Prof^a Dra Lígia Vera Montalli Assumpção

Doador – indivíduo controle

Sr(a) _____

_____ anos RG: _____ HC: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Data: / /

Concordo em doar 9 mL de sangue para pesquisa de ácidos nucléicos e proteínas que podem estar envolvidas em doenças malignas e benignas da tireóide. A pesquisa tem por objetivo a melhor compreensão dos fatores moleculares de diagnóstico e prognóstico, fazendo comparação entre indivíduos doentes e saudáveis. Tal pesquisa justifica-se dada a importância da compreensão destes fatores para o tratamento dos pacientes. Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo em que os meus dados, registrados no meu prontuário médico, sejam utilizados na pesquisa, sabendo que meu nome assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento serei prejudicado por tal doação. Meus dados e o material biológico advindo da coleta poderão ser usados em novas pesquisas relacionadas ao câncer de tireóide, caso justificativa devida, sendo estas pesquisas aprovadas devidamente pelo CEP e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, submetidas totalmente à devida legislação. A cada nova pesquisa em que meu material será utilizado, receberei um novo termo de consentimento (pelo correio) para autorizar a utilização do material doado. Tenho a garantia de sigilo de dados confidenciais ou que, de algum modo, possam me provocar constrangimentos ou prejuízos, tornando anônimo o material ou dados obtidos. Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou tratamento das doenças tireoidianas no futuro. Não terei nenhuma forma de reembolso, já que não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento. Também não serei submetido a qualquer procedimento que não faça parte da rotina de doação de sangue, sob a orientação da equipe de enfermagem. Estou consciente da importância de minha participação da qual posso desistir em qualquer momento. Fui informado de que este projeto está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e sei que poderei obter todas as informações que desejar e necessitar no contato ao CEP (infracitado), bem como denunciar quaisquer procedimentos que infrinjam as normas do CEP. Poderei obter esclarecimentos antes, durante e depois da realização da pesquisa sobre a mesma, contatando a pesquisadora responsável Profa. Dra. Laura S. Ward no contato abaixo. Autorizo a guarda do material biológico para fins de pesquisas futuras? () Sim () Não

Assinatura do Paciente ou Responsável pelo Paciente

Prof^a Dra. Laura Sterian Ward: Coordenadora do GEMOCA- Clínica Médica/ FCM-UNICAMP,
CEP:13081-970, Campinas, SP, (19) 3521-8954, e-mail:ward@unicamp.br
CEP: Fone: (19) 3521-8938, Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP,
e-mail: cep@fcm.unicamp.br



LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa em Câncer de Tireóide

Pesquisadora: Profª Dra Laura Sterian Ward

Profª Dra Lígia Vera Montalli Assumpção

Paciente ou Responsável pelo paciente

Sr(a) _____

_____ anos RG: _____ HC: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Data: / /

Concordo em doar sangue e tecido para pesquisa de ácidos nucleicos e proteínas que podem estar envolvidas em doenças malignas e benignas da tireóide. A pesquisa tem por objetivo a melhor compreensão dos fatores moleculares de diagnóstico e prognóstico. Tal pesquisa justifica-se dada a importância da compreensão destes fatores para o tratamento dos pacientes. Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo em que os dados de meu caso, registrados no meu prontuário médico, sejam utilizados na pesquisa, sabendo que meu nome assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento meu diagnóstico ou tratamento serão prejudicados por tal doação. Meus dados e o material biológico advindo da coleta poderão ser usados em novas pesquisas, caso justificativa devida, sendo estas pesquisas aprovadas devidamente pelo CEP e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, submetidas totalmente à devida legislação. Tenho a garantia de sigilo de dados confidenciais ou que, de algum modo, possam me provocar constrangimentos ou prejuízos, tornando anônimo o material ou dados obtidos. Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou tratamento das doenças tireoidianas no futuro, mesmo que eu não me beneficie disso agora. Não terei nenhuma forma de reembolso, já que não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento. Também não serei submetido a qualquer procedimento que não faça parte da rotina de meu tratamento normal, sob a orientação de meu médico habitual. Estou consciente da importância de minha participação da qual posso desistir em qualquer momento. Fui informado de que este projeto está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e sei que poderei obter todas as informações que desejar e necessitar no contato ao CEP (infracitado), bem como denunciar quaisquer procedimentos que infringem as normas do CEP. Poderei obter esclarecimentos antes, durante e depois da realização da pesquisa sobre a mesma, contactando a pesquisadora responsável Profa. Dra. Laura S. Ward no contato abaixo.

Autorizo a guarda do material biológico para fins de pesquisas futuras? () Sim () Não

Assinatura do Paciente ou Responsável pelo Paciente

Profª Dra. Laura Sterian Ward: Coordenadora do GEMOCA- Clínica Médica/ FCM-UNICAMP,
CEP:13081-970, Campinas, SP, (19) 3521-8954, e-mail:ward@unicamp.br
CEP: Fone: (19) 3521-8938, Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP,
e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Campinas, 19 de Agosto de 2005

Protocolo 332/04

Prezado Senhor João Hamilton Romaldini,

Parecer Projeto: APROVADO

I – Identificação:

Título do projeto (completo): “PERFIL GENOTÍPICO DE PACIENTES COM DOENÇA DE GRAVES E SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA TERAPÊUTICA”.

Pesquisador (a) responsável: JOÃO HAMILTON ROMALDINI, ROBERTO BERNARDO DOS SANTOS E LAURA STERIAN WARD.

Instituição onde se realizará: ENDOCRINOLOGIA – HOSPITAL E MATERNIDADE CELSO PIERRO – PUC-CAMPINAS.

Data de apresentação dos esclarecimentos solicitados pelo CEP: 19/08/05

Apresentar relatório: AO TÉRMINO DA PESQUISA.

II – Objetivos:

Determinar o perfil genotípico de pacientes com Doença de Graves com e sem oftalmologia.

Correlacionar tal perfil com a resposta às diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento da Doença de Graves.

III - Sumário do projeto:

O estudo incluirá a avaliação clínica e ocular prospectiva em 150 pacientes com Doença de Graves hipertiroídianos. Serão avaliados também 150 indivíduos que não apresentem Doença de Graves (grupo controle) ou história familiar de doença tiroídiana. Estes pacientes serão submetidos a dosagens de TSH e anticorpo antiperoxidase para exclusão de doença auto-imune tiroídiana. Os pacientes serão divididos em 3 grupos:

- Pacientes em remissão anteriormente tratados com drogas antitiroídianas;
- Pacientes submetidos a radioiodoterapia que foram curados com uma única dose;
- Pacientes submetidos a radioiodoterapia que necessitam de 2 doses ou mais para serem curados.

Será analisada a influência do perfil genotípico (CTLA-4) na evolução (cura) dos diferentes tratamentos.

Serão avaliados de acordo com a evolução da oftalmopatia, e divididos novamente em 3 grupos:

G1 – Radioiodo associado com prednisona.

G2 – Somente radioiodo.

G3 – Uso de fármaco antitiroídiano.

IV - Parecer do CEP:

Após análise da mudança realizada no projeto (inclusão de um grupo controle), e dos esclarecimentos solicitados no parecer de 01.08.05, o parecer **ad referendum** do Comitê de Ética em Pesquisa é o que segue:

Dessa forma, e considerando a Resolução no. 196/96 item VII.13.b, que **define as atribuições dos CEPs e classifica os pareceres emitidos aos projetos de pesquisa envolvendo seres humanos**, e, ainda que a documentação apresentada atende ao solicitado, emitiu-se o segundo parecer para a presente modificação feita no projeto:
Aprovado.

V – Informações Complementares

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Incluir no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que o projeto foi avaliado por um Comitê de Ética em Pesquisa, assim como, incluir o telefone do mesmo.

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e.).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - Data da aprovação: 19/08/2005

Sendo só o que nos cumpre informar, aproveitamos da oportunidade para renovar votos de estima e consideração.

Atenciosamente.



Prof. Dra. Maria Luiza Cruz

Coordenadora do C.E.P.S.H.P
PUC-Campinas



CEP, 24/11/08.
(Grupo I)

PARECER CEP: N° 621/2008 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0497.1.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DA INFLUENCIA DOS GENES ENVOLVIDOS NA METABOLIZAÇÃO DO ESTRÓGENO NA DOENÇA DE GRAVES E NO CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIRÓIDE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Laura Sterian Ward

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 08/08/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/08/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Estudar a incidência de polimorfismos nos genes envolvidos no metabolismo do estrógeno na doença de graves em comparação com um grupo controle pareado para sexo, idade e fatores de exposição ambiental.

III - SUMÁRIO

O material para exame dos pacientes e controles já estão coletado, faz parte de outro estudo já aprovado pelo CEP/FCM/UNICAMP (Parecer CEP 072/98). As amostras da Holanda serão enviadas por um pesquisador daquele país. Serão realizados os testes necessários e os resultados tratados estatisticamente. Os critérios de inclusão e exclusão estão claros. A metodologia é adequada.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto está bem elaborado. Os riscos para os participantes são muito pequenos. Existe um orçamento e um cronograma adequados. Há um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido claro e completo.

As pendências foram respondidas pelo pesquisador. Um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentado, claro e completo, inclusive em relação ao uso do material coletado para futuros projetos. O parecer ético enviado pelo participante da Holanda foi traduzido e é favorável à realização do estudo.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem



restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologação VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de agosto de 2008.

Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP