

ELAINE CRISTINA MORARI

***ESTUDO DO SISTEMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE NOS
TUMORES DA TIRÓIDE HUMANA.***

200307331

CAMPINAS

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ELAINE CRISTINA MORARI

***ESTUDO DO SISTEMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE NOS
TUMORES DA TIRÓIDE HUMANA.***

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica, Área de Concentração
Ciências Básicas.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LAURA STERIAN WARD

CAMPINAS

2002

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	M796e
V	EX
TOMBO BC	52709
PROC.	16-124703
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,50
DATA	15/03/03
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00181001-2

B 10 284947

M797e
M796e

Morari, Elaine Cristina

Estudo do sistema glutatona S- transferase nos tumores da tireóide humana. / Elaine Cristina Morari. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

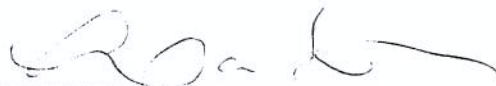
Orientador : Laura Sterian Ward

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Câncer. I. Laura Sterian Ward. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

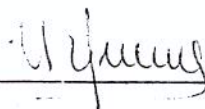
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Profa.Dra. Laura Sterian Ward*



Membros:

1. Professora Doutora Maria Tereza Nunes



2. Professora Doutora Ligia Vera Montalli de Assumpção



**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data:22.02.2002

DEDICATÓRIA

A meus pais Armando e Santana, que permitiram que eu chegasse até aqui, com muito amor, apoio e dedicação.

Aos meus irmãos César e Everson, que sempre me ajudaram em meus estudos, pelo apoio e pela nossa amizade.

Ao meu noivo Luciano, pessoa de grande importância, que sempre me deu forças e me ajudou muito durante todo esse tempo.

À **Deus**, o criador, superior a tudo e a todos, que me deu a vida, sem ele nada seria possível.

À **Profa. Dra. Laura**, pessoa muito batalhadora, de grande inteligência. Agradeço a dedicação a minha tese e a confiança concedida para que eu pudesse desenvolvê-la; pela compreensão e paciência com as minhas dificuldades.

À **Profa. Dra. Edi**, do CBMEG, pela paciência, todas as vezes que a procurei e pela grande ajuda no início do meu trabalho.

Aos **pacientes** que participaram da pesquisa.

À **Profa. Dra. Lígia** e todos os **residentes, funcionários e amigos**, da Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Unicamp, por terem me concedido as amostras de sangue periférico dos pacientes.

Ao **Dr. Alfio** e **residentes** da Cirurgia do Centro Médico de Campinas, pela valiosa colaboração me cedendo as amostras de tecido à fresco.

À **equipe** da Cirurgia do Tórax do Hospital das Clínicas da Unicamp, todos os residentes e funcionários pela colaboração com as amostras de tecido à fresco.

À **equipe** da Cirurgia da Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Unicamp, todos os residentes e funcionários pela colaboração com as amostras de tecido à fresco.

À **Mada** do CBMEG, pela paciência em ensinar a técnica de extração de sangue periférico.

Às minhas amigas de mestrado, **Hérika** e **Grabiela**, pelos momentos estressantes em que passamos juntas, pelas brigas, pelos momentos bons, por tudo que aprendemos.

Às minhas amigas **Janaina** e **Fabiana** do laboratório Gemoca que me ajudaram nas extrações de DNA, coletas de materiais e muitas outras coisas, obrigada pela amizade.

Às meninas do laboratório **Patrícia** e **Márcia**, que chegaram no final, mas nos tornamos amigas, obrigada pelo apoio.

À todos os **alunos** de iniciação científica do Gemoca.

Ao aluno de iniciação científica **Luíz** que fez parte do meu projeto, me ajudando nos dados clínicos e estatísticos.

Às vizinhas do nosso laboratório **Simone, Viviane e Hellen**, por terem me emprestado muitas coisas todas as vezes que precisei.

À **Angela e Helvia** do Hemocentro que me ajudaram na otimização da PCR.

À **Neli**, que fazia a limpeza no nosso laboratório.

À **Dra. Silvia**, minha querida amiga que me ajudou a escrever o projeto de pesquisa.

À **Claudia** por todas as caronas no início do meu mestrado, muito obrigada.

À minha amiga **Edna**, companheira da faculdade, depois do mestrado, obrigada pelas caronas.

Ao meu querido amigo **Romildo** pela paciência e compreensão, muito obrigada pela grande ajuda que você me deu todos esses anos.

Ao **peçoal** do Hemocentro que várias vezes me emprestaram o espectrofotômetro.

Ao **Ademir** da Clínica Médica que ajudou nas impressões e xerox.

Aos meninos do laboratório de informática da FCM, **Rafael, Daniel e Jefferson** que muitas vezes me ajudaram nas minhas dificuldades com o computador.

À **equipe** do setor de Doação de sangue do Hemocentro na coleta das amostras de sangue.

Aos motoristas da Unicamp **Jonas, Osnir, João** por todas as vezes me levaram para fazer as minhas coletas de materiais.

À **todos** que de alguma forma colaboraram para que esse trabalho fosse realizado.

Obrigada à todos vocês pela amizade, atenção e apoio

*“ Caminhar, caminhar sempre.....
Por caminhos difíceis e perigosos,
Cheios de obstáculos em todos os lugares;
Mas sem eles seria muito difícil caminhar.
Os obstáculos fortalecem os músculos
na caminhada da vida;
Os obstáculos fazem parte da vida
daquele que sabe o que quer,
E só sabe o que quer aquele que
nunca desiste de caminhar!
Caminhar apesar dos obstáculos.”*

(Evodite Gonçalves Amorim)

	PÁG
RESUMO	<i>xii</i>
INTRODUÇÃO	14
OBJETIVOS	23
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	48
SUMMARY	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

CF –	Carcinoma Folicular
CP –	Carcinoma Papilífero
EDTA –	Ácido Etilenodiaminotetra
GST –	Sistema Glutathione S-transferase
GST <i>mu</i> 1 –	GSTM1
GST <i>theta</i> 1 –	GSTT1
pb –	Pares de base
PCI –	Pesquisa de corpo inteiro com radiodo
PCR –	Reação de Polimerase em Cadeia
SDS –	Dodecil sulfato de sódio
T4l –	Tiroxina livre sérica
Tg –	Tiroglobulina sérica
Tg Ac –	Anticorpo anti-tiroglobulina
TSH –	Tirotrofina sérica

	PÁG
Tabela 1: Fatores clínicos relacionados à malignidade no nódulo de tiróide.....	19
Tabela 2: Fatores de risco epidemiológico para câncer de tiróide.....	19
Tabela 3: Distribuição das características clínicas dos pacientes com carcinoma de tiróide.....	29
Tabela 4: Reagentes utilizados na extração de DNA de tecido à fresco.....	30
Tabela 5: Reagentes utilizados na extração de DNA de sangue periférico.....	31
Tabela 6 : Reagentes utilizados na reação de PCR	32
Tabela 7: Condições utilizadas para amplificação da reação de PCR-multiplex.....	3
Tabela 8 : Primers utilizados para a amplificação da reação de PCR-multiplex	33
Tabela 9: Comparação do perfil de distribuição dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na população normal e nos pacientes portadores de doenças benignas e malignas da tiróide	37

	PÁG
Figura 1: Comparação estatística dos grupos controle, benigno e maligno em relação ao genótipo nulo combinado de GSTT1 e GSTM1.....	38
Figura 2: Gráfico evidenciando a tendência de aparecimento de câncer no grupo com ausência de ambas as enzimas.....	39
Figura 3: Gel de agarose a 0,8% de amostras de DNA extraídas de tecido à fresco.....	39
Figura 4: Gel de agarose a 0,8% de amostras de DNA extraídas de sangue periférico.....	40
Figura 5: Gel de agarose a 2% de produtos de PCR multiplex de DNA extraído de sangue periférico.....	40
Figura 6: Gel de agarose a 2% de produtos de PCR multiplex de DNA extraído de tecido tumoral à fresco.....	41
Figura 7: Gel de agarose a 2% de produtos de PCR multiplex de DNA extraído de sangue periférico de carcinomas papilíferos e foliculares.....	41
Figura 8: Gel de agarose a 2% de produtos de PCR multiplex de DNA extraído de tecido à fresco de lesões benignas como adenoma e bócio.....	42
Figura 9: Gel de agarose a 2% de produtos de PCR multiplex de DNA extraído de sangue periférico de doadores de sangue normais.....	42



RESUMO

A susceptibilidade a carcinógenos químicos tem um importante papel no desenvolvimento da maioria dos cânceres. Diversos polimorfismos de enzimas metabolizadoras de drogas em humanos influenciam esta susceptibilidade individual. Os genes que incluem as isoenzimas do sistema glutathione s-transferase (GST) apresentam um polimorfismo hereditário. Os genes GST mu 1 (GSTM1) and GST theta 1 (GSTT1) possuem uma variante alélica nula nos quais o gene inteiro está ausente e, portanto, não existe codificação ou produção da respectiva enzima. O genótipo nulo para ambas enzimas foi associado com diferentes tipos de cânceres.

Para observar a influência da herança dessas enzimas no risco do câncer da tireóide, utilizamos uma multiplex-PCR que inclui o gene β -globina como um controle de DNA na reação de PCR para comparar 300 indivíduos normais de nossa população com 116 pacientes portadores de lesões tireoidianas. Desses casos, 49 eram de bócio benigno e 67 de doenças malignas: 50 carcinomas papilíferos e 17 carcinomas foliculares.

A comparação entre tecidos de tumores da tireóide e 35 amostras correspondentes de sangue periférico de pacientes com câncer demonstraram padrão idêntico, sugerindo que o sistema GST não está envolvido no processo de desdiferenciação folicular. Não houve diferença estatística entre a prevalência da deleção dos genes GSTT1 e GSTM1 em indivíduos normais e em pacientes com bócio. Entretanto, os pacientes com carcinoma papilífero (10%) e pacientes com carcinoma folicular (17%) apresentaram uma prevalência de genótipo nulo mais elevada do que os indivíduos da população normal (5%) ($p=0,0479$).

Demonstramos que a herança de um genótipo nulo combinado para GSTM1 e GSTT1 é responsável por um aumento de 2.6 vezes no risco de câncer. Sugerimos que estes resultados podem ser usados como marcadores na susceptibilidade ao câncer da tireóide, auxiliando na seleção dos indivíduos de risco que merecem investigação e conduta mais rigorosa de seus bócios.



INTRODUÇÃO

O CÂNCER DO PONTO DE VISTA MOLECULAR

O eminente oncologista inglês, WILLIS, ainda em 1952, definiu neoplasia como “uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede aquele dos tecidos normais e não é coordenado, persistindo de maneira excessiva mesmo após o término do estímulo que induziu a alteração”. Após cinquenta anos, esta definição permanece apropriada.

O volume de informações sobre o câncer vem crescendo rapidamente nos últimos anos por várias razões. Primeiro porque, embora o câncer seja um conjunto de mais de 200 doenças, com múltiplas causas, história natural e diferentes formas de tratamento, os avanços em genética molecular permitiram o reconhecimento de mecanismos moleculares comuns a vários tipos de tumores. Segundo porque, com o envelhecimento da população, o câncer tornou-se um problema mais comum e merecedor de maior atenção científica. Trata-se da doença que mais mata nos países de primeiro mundo, após as moléstias cardiovasculares (LANDIS *et al*, 1998).

A oncologia, é uma das áreas que tem se desenvolvido mais rapidamente nos últimos anos, graças, em particular, aos recentes progressos na área molecular. Admitimos, atualmente, que o câncer surge quando danos genéticos, adquiridos ou herdados, conferem uma vantagem a uma célula, a qual consegue transmitir às suas células filhas esta vantagem, dando origem a um clone de células que escapa dos controles normais de crescimento e diferenciação (NAMBA *et al*, 1990). Anormalidades tanto nos genes estimuladores de divisão celular (chamados de oncogenes), como nos protetores ou bloqueadores do ciclo celular (chamados de genes supressores tumorais), podem conferir a uma célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células normais. Os genes que controlam o tempo de vida ou a morte celular, como o gene da telomerase, os genes envolvidos na apoptose e os genes de reparo do DNA, também intervêm diretamente no processo de tumorigênese (WARD, 1997). Quanto mais tempo uma célula viver, maior será sua chance de adquirir mutações vantajosas em termos de crescimento e diferenciação (WARD & FAGIN, 1998). No entanto, para que um tumor progrida, uma série de outros genes devem se alterar. Sabemos que o processo de metástase é seletivo para as poucas células que conseguem produzir vasos (angiogênese), mover-se vencendo barreiras e invadindo as células vizinhas, cápsulas, etc, embolizar e sobreviver na corrente sanguínea,

parar em leitos capilares distantes, extravasar e se multiplicar dentro do parênquima de outros órgãos. Todos estes passos requerem ativação e/ou desativação de uma série de genes (WARD & FAGIN, 1998; WARD 2000). Existem vários genes envolvidos no reconhecimento, reparo ou programação da morte celular (apoptose), assim como genes envolvidos no controle imunológico de reconhecimento e reparo/destruição das células danificadas, genes capazes de interferir na capacidade de multiplicação à distância (p.ex. o gene nm23), invadir tecidos circunjacentes (p.ex. o gene da sialoproteína, o gene da MUC1 mucina), fatores angiogênicos capazes de prover aporte nutricional a estas células de crescimento acelerado (p.ex. o gene VEGF) e vários outros fundamentais para a progressão de um clone tumoral primário para fenótipos mais agressivos com invasão e metastatização à distância (WARD, 1997).

O CÂNCER COMO DOENÇA AMBIENTAL

Sabemos também que a grande maioria dos cânceres do ser humano ocorrem por uma interação entre fatores ambientais como fumaça de cigarro, alimentos e bebidas, poluição urbana e industrial, etc e a bagagem genética de cada indivíduo (PALLI *et al*, 2000).

Os agentes ambientais lesivos ao ser humano podem ser didaticamente divididos em:

- eventos químicos, como os clássicos ésteres de forbol, o benzeno nas leucoses, etc
- agentes físicos, como a radiação ultra-violeta por exemplo no câncer de pele ou a radiação ionizante e o câncer de tiróide, etc
- agentes biológicos como o Papilomavirus no câncer de colo de útero, etc.

Agentes químicos são clássico indutores de câncer em animais de experimentação (MARKS & FURSTENBERGER, 1993). A exposição ambiental a agentes químicos carcinogênicos pode resultar de hábitos sociais, como o uso de tabaco e a ingestão de toxinas naturais, ou das condições de trabalho, especialmente em alguns tipos de atividade industrial. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer apresenta vários agentes químicos altamente suspeitos ou comprovadamente carcinogênicos para o homem, incluindo produtos naturais e subprodutos industriais, assim como poluentes ambientais; aflatoxina B1, que é um contaminante comum de cereais e amendoim; micotoxina, produzida pelo *Aspergillus flavus* ; cloreto de vinila, um produto da indústria; benzo(a) pireno, um poluente ambiental. Muitos xenobióticos (nome atribuído a agentes químicos não-nutritivos) que entram no corpo, incluindo os agentes químicos carcinogênicos, são pouco solúveis na água e não podem, portanto, ser diretamente eliminados pelos rins. A excreção eficiente desses agentes químicos depende de seu metabolismo, o qual ocorre geralmente em duas ou mais etapas que os deixam mais solúveis. A primeira etapa é a Fase I, composta pelas oxidações realizadas por enzimas ligadas à membrana celular. O metabolismo desses derivados oxidados, na assim chamada Fase II, resulta na produção de glucuronida, sulfatos ou conjugados mercaptúricos ácidos que são facilmente eliminados (DRINKWATER & SUGDEN, 1991).

NÓDULOS DE TIRÓIDE E CANCER

Nódulos de tiróide são um problema de saúde pública. Estima-se que 5 a 10 % da população venha a desenvolver um nódulo palpável durante a vida (WARD & FAGIN, 1998). No Brasil, não existem estatísticas a respeito mas o projeto Conexão T da Sociedade Brasileira de Endocrinologia Regional DF encontrou uma prevalência de 35% de alterações estruturais entre as 3500 tiróides palpadas durante uma campanha pública de prevenção a tiroidopatias: “Conexão T” (GUIMARÃES, 2000).

A prevalência de bócio é grande em regiões afetados por moderada ou severa deficiência de iodo, onde o bócio é endêmico (SCHLUMBERGER & PACINI, 1999). Considerando-se a presença, até há poucos anos atrás, de áreas de carência de iodo, onde a prevalência de bócio pode atingir mais da metade da população local, é provável que tenhamos no Brasil uma população de cerca de 10 milhões de portadores de nódulos tiroidianos (TOMIMORI *et al*, 1995).

Com o uso da ultrassonografia cada vez mais acessível, a frequência de nódulos descobertos por ultrassonografia excede 50% em mulheres acima dos 60 anos (SCHLUMBERGER & PACINI, 1999). A ultrassonografia é tão boa, tão prática e tão fácil de se fazer que, com seu uso cada vez mais popularizado, temos visto um crescente número de indivíduos em que se encontram lesões tiroidianas por acaso, os chamados “incidentalomas”. Ora, também sabemos que micronódulos (nódulos menores que 1cm) são achados extremamente freqüentes e que a maioria deste microcarcinomas não evolui clinicamente (BAUDIN *et al*, 1998).

O que fazer com estes indivíduos? Não temos até o presente nenhum parâmetro clínico ou laboratorial para distinguir qual a lesão que vai evoluir e qual não deve nos preocupar.

A maior parte destes nódulos deve ser benigna já que o câncer de tiróide é responsável por apenas 0.6 e 1.6% de todos os cânceres de homens e mulheres respectivamente, nos EUA. Entretanto a prevalência do câncer de tiróide apresenta grande variação geográfica. No Japão atinge 1.4/100.000 habitantes e no Kuwait relata-se que acomete 10,5% das mulheres (BURGUERA & GHARIB, 2000; SCHLUMBERGER, 2000). Mais ainda, uma grande variação é observada entre séries clínicas e cirúrgicas: por volta de 5% dos nódulos de tiróide clínicos são câncer, mas em cirurgias não previamente submetidas a análise citológica, a incidência pode variar entre 8 e 20%. Por outro lado, a mortalidade devida ao câncer de tiróide é considerada relativamente baixa (SCHLUMBERGER & PACINI, 1999).

FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE TIRÓIDE

Assim, do ponto de vista populacional, não restam dúvidas de que os critérios clínicos são fundamentais para selecionarmos os pacientes de risco para câncer de tiróide entre os portadores de nódulos. Na tabela 1 listamos os dados de história e exame físico considerados mais importantes nesta avaliação.

Tabela 1. Fatores clínicos relacionados à malignidade no nódulo de tiróide

História	Características do nódulo	Outros sintomas
Irradiação externa da região cervical	↑ de tamanho, principalmente durante terapia supressiva	Rouquidão, disfagia
História familiar de câncer de tiróide	Duro, firme, superfície irregular	Gânglios cervicais
Idade < 20 anos		
Idade > 60 anos		
Sexo masculino		

Na tabela 2 listamos os principais fatores reconhecidos a terem influência no desenvolvimento do câncer da tiróide do ponto de vista epidemiológico. Vale, no entanto, ressaltar que o único destes fatores que comprovadamente leva a câncer, é a radiação ionizante.

Tabela 2. Fatores de risco epidemiológico para câncer de tiróide

Radiação Ionizante	
	-carcinoma papilífero familiar: raro, caracterização genética pobre.
Predisposição familiar	-polipose adenomatosa familiar: ↑ até 160 vezes risco de câncer. em mulheres abaixo de 35 anos. -doença de Cowden -neoplasia endócrina múltipla
Ingestão de iodo	-déficit de iodo: maior risco de carcinoma folicular. -suficiência de iodo: predomina o carcinoma papilífero.
Tiroidopatias pré-existent	-adenoma folicular: predispõe ao carcinoma folicular -doença de Graves -tiroidite crônica de Hashimoto: linfoma tiroideano
Fatores hormonais e reprodutivos	
Fatores étnicos e geográficos	
Dieta e drogas	

Os critérios clínicos amparados pela citologia diferenciam e permitem conduzir adequadamente a maior parte dos casos (SCHLUMBERGER, 1998).

Reconhecemos os fatores de risco clínicos e epidemiológicos para o desenvolvimento do câncer. No entanto, temos um problema grave: não entendemos como ou porque o bócio nodular se desenvolve, e nem porque aparece o câncer. Sem esta compreensão, medidas preventivas e um melhor tratamento dos casos se torna muito difícil. A situação fica pior se considerarmos que uma parte considerável dos casos que vemos em nossa rotina de clínicos não é tão fácil de diagnosticar. O citologista pouco nos pode ajudar na diferenciação entre o adenoma e o carcinoma folicular da tiróide já que o critério de diferenciação fundamental entre ambos é a invasão, a qual ele não pode avaliar na ausência de um espécime histológico (SCHLUMBERGER, 2000).

Mais ainda, se, por um lado, está bem definido que 90-95% dos portadores de carcinoma papilífero (CP) e 70-95% dos carcinomas foliculares (CF) tem sobrevida acima de 10 anos, isto deixa cerca de 5-30% dos casos em uma condição de prognóstico relativamente desfavorável (SCHLUMBERGER, 1999). Como reconhecer estes pacientes? Vários sistemas prognósticos tem sido publicados: AGES, AMES, DAMES, MACIS, pTNM, EORTC. Infelizmente, nenhum deles é largamente utilizado o que torna difícil comparar dados. Por outro lado, estes sistemas prognósticos são muito interessantes do ponto de vista epidemiológico, mas, diante de nosso paciente, eles freqüentemente são de pequeno auxílio (SHAHA *et al*, 1998).

O SISTEMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

Estima-se que 80 a 90% de todos os cânceres são causados por fatores ambientais (WARD, 2000). Indivíduos expostos a poluentes do ar, como oficiais de polícia, motoristas de ônibus, vendedores de rua e residentes em áreas urbanizadas altamente poluídas tendem a apresentar elevada freqüência de modificações no DNA (NIELSEN *et al*, 1996). Alterações cromossômicas foram encontradas em tecidos de mucosa do cólon, bexiga, nariz, pulmão e em mama destes indivíduos, sugerindo que estes altos níveis de anormalidades possam ser preditivos para o aparecimento de câncer (PELUSO *et al*, 1997; PERERA *et al*, 1995; TANG *et al*, 1995).

A maior parte dos carcinógenos químicos precisa ser biotransformada no organismo para compostos não tóxicos, os quais podem então ser excretados pela urina, fezes ou perspiração. Um indivíduo com capacidade reduzida de detoxificar carcinógenos pode ter um risco maior para o desenvolvimento do câncer do que um indivíduo que detoxifica eficientemente os carcinógenos a que estamos todos, invariavelmente, expostos. A base bioquímica para essas variações de susceptibilidade a agentes agressivos está relacionada à distribuição polimórfica de enzimas específicas envolvidas na bioativação/detoxificação, como o sistema da glutathione S-transferase (GST) (AUTRUP, 2000).

O sistema GST é composto por uma família de proteínas que possuem ação enzimática e que agem em uma variedade de reações envolvendo substâncias tóxicas e compostos mutagênicos. Seu mecanismo de ação se baseia na conjugação destes compostos tóxicos com a glutathione (GSH) ((MANNERVIK & DANIELSON, 1988). As reações de conjugação e redução pela glutathione usualmente inativam as substâncias eletrofílicas e facilitam a sua excreção na urina e na bile (HAYES & PULFORD, 1995; SEIDEGARD & EKSTROM, 1997).

Além de protegerem o corpo contra o desenvolvimento do câncer, as GST também estão implicadas na resistência contra drogas usadas na quimioterapia (HAYES & PULFORD, 1995; BLACK & WOLF, 1991). Assim, a sua super expressão em células tumorais pode ser desvantajosa para o hospedeiro que responderá mal às drogas anti-neoplásicas, tais como o clorambucil (HAYES & PULFORD, 1995).

Os genes que codificam as proteínas do GST estão envolvidos no metabolismo de xenobióticos e são conhecidos pelo seu polimorfismo na população geral e tendem a variar com a etnia (ARAI *et al*, 1999; HAYES & PULFORD, 1995; SEIDEGARD *et al*, 1988; PEMBLE *et al*, 1994). Polimorfismos são definidos como fenótipos de ocorrência pouco freqüente, mas que ocorrem em ao menos 1% de uma população, e são causados por mutações gênicas (HENGSTLER *et al*, 1998).

Foram identificadas até o presente momento cinco classes de isoenzimas do sistema glutathione S-transferase: *alpha*, *mu*, *pi*, *sigma* e *theta* (MANNERVICK *et al*, 1985; MANNERVIK & DANIELSON, 1988). A ausência das enzimas das classes *mu* (GSTM1) e *theta* (GSTT1) tem sido relacionadas ao aumento de risco de câncer em diversos estudos (MILLER *et al*, 1997; PEMBLE *et al*, 1994). Em ambos os casos, a deleção do gene correspondente é responsável pela produção de um genótipo nulo em homozigose, isto é, a ausência de um ou de ambos os alelos codificadores da enzima em questão faz com que ela não seja produzida (ARAND *et al*, 1996; SALAGOVIC *et al*, 1998). Indivíduos que são portadores de deleções nos genes GSTM1 e GSTT1 podem ter a capacidade de eliminar metabolicamente compostos carcinogênicos prejudicada e, portanto, podem ter um risco de desenvolver câncer maior do que o restante da população (SALAGOVIC *et al*, 1998).

A enzima GSTM1 é codificada pelo gene GSTM1, localizado no cromossomo 1p13.3 e a enzima GSTT1 é codificada pelo gene GSTT1, localizado no cromossomo 22q11.2 (REBBECK, 1997). O gene GSTM1 está ativo na detoxificação de uma variedade de xenobióticos, incluindo produtos oxidativos, combustão produzida pelo cigarro, aflatoxina B1 (presente no amendoim), etc (HAYES & PULFORD, 1995; RANEY *et al*, 1992). O gene GSTT1 está envolvido na ativação e detoxificação de uma variedade de metabólitos oxidativos de importantes produtos químicos, incluindo metileno, brometo de etídeo, outros (HAYES & PULFORD, 1995).

Um estudo populacional realizado no Brasil, na cidade de Campinas, mostrou que o número de indivíduos homozigotos para o alelo nulo de GSTM1 e GSTT1 foi de 36,9% e 17,7%, respectivamente e para ambos os alelos foi de 5% (ARRUDA *et al*, 1998).



OBJETIVOS

Nosso objetivo foi avaliar a o papel do sistema GST no desenvolvimento de lesões tumorais benignas e malignas da glândula tiróide. Especificamente, pretendemos:

1. Analisar o padrão de herança do sistema GST e, em especial, a prevalência dos genótipos nulos dos genes GSTM1 e GSTT1 em pacientes com tumores de tiróide benignos e malignos comparando-a com a da população normal
2. Avaliar uma possível relação entre o padrão de herança dos genes GSTM1 e GSTT1 e a ocorrência de bócio e câncer da tiróide indicando que eles estariam implicados na susceptibilidade genética a substâncias bociogênicas ou carcinogênicas para a glândula tiróide.
3. Avaliar um possível papel do sistema GST no desenvolvimento e evolução do câncer de tiróide, investigando uma possível perda dos genes GSTM1 e GSTT1 nos tumores de comportamento mais agressivo.
4. Investigar uma possível relação entre a evolução clínica destes pacientes e seu padrão de herança para os genes GSTM1 e GSTT1.



MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAIS

Foram estudados 116 amostras de portadores de lesões tiroidianas, composta de 67 casos de neoplasias malignas (50 casos de Carcinoma papilífero e 17 casos de Carcinoma folicular) e 49 casos de neoplasias benignas (38 casos de Bócio Multinodular, 11 casos de Adenoma folicular). Os portadores de bócio multinodular (3 homens e 35 mulheres) possuíam idade de 12 a 71 anos (45 ± 15 anos). Os pacientes com adenomas (2 homens e 9 mulheres) possuíam de 20 a 71 anos de idade (43 ± 17 anos). Os portadores de carcinoma papilífero (10 homens e 40 mulheres) possuíam de 18 a 72 anos de idade (42 ± 13 anos). Os pacientes com carcinoma folicular (5 homens e 12 mulheres) possuíam idade de 28 a 81 anos (57 ± 17 anos). Os pacientes foram classificados como brancos e não brancos. As suas características clínicas gerais incluindo sexo, idade e cor estão resumidas na tabela 3.

Todos os pacientes submetidos à cirurgia e/ou acompanhados em nosso Hospital das Clínicas da FCM/UNICAMP ou em outros serviços, abaixo detalhados, foram devidamente informados de que participavam da presente investigação e assinaram o Termo de Consentimento Informado, conforme as determinações do nosso Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/UNICAMP.

Os tecidos tiroidianos de 82 indivíduos (66 mulheres e 16 homens) foram coletados no Hospital das Clínicas da UNICAMP, no Centro Médico de Campinas, no Hospital Sírio Libanês de São Paulo, no Hospital Amaral Carvalho de Jaú e no Hospital da UERJ no Rio de Janeiro. Um pedaço de tecido tiroidiano central e livre de necrose foi ressecado durante o ato cirúrgico e retirado, imediatamente foi imerso em nitrogênio líquido, sendo estocado em freezer -80°C até o seu processamento, detalhado a seguir. O diagnóstico foi comprovado através de laudo Anátomo Patológico. Laudos duvidosos e alguns casos especiais foram revistos após alguns meses, analisando-se novamente o material incluído em parafina e armazenado nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da UNICAMP, revisando-se as lâminas obtidas e confrontando os diagnósticos da punção aspirativa por agulha fina pré-operatória com o diagnóstico histológico e a evolução do paciente.

Também coletamos sangue periférico de 35 pacientes (8 homens e 27 mulheres) ainda à beira do leito cirúrgico do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Trata-se de pacientes de 12 a 78 anos de idade, 44 ± 15 anos. Foram coletados 3 ml de sangue periférico em tubo contendo EDTA e estocados em geladeira a 4°C até o seu processamento, detalhado a seguir.

Outros 33 indivíduos (5 homens e 28 mulheres), tiveram sangue periférico coletado apenas em suas visitas de rotina para seguimento de tumores tireoidianos na Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP havendo sido previamente operados no Hospital das Clínicas da UNICAMP ou em outros serviços. Não dispomos do tecido tumoral destes indivíduos. Trata-se de pacientes de 16 a 81 anos de idade, 47 ± 14 anos. Foram coletados 3 ml de sangue periférico em tubo contendo EDTA e estocados em geladeira a 4°C até o seu processamento, detalhado a seguir.

Devido à alta heterogeneidade na composição étnica da população do Brasil incluímos um grande grupo controle de 300 indivíduos (99 homens e 201 mulheres, 16 a 78 anos idade, 35 ± 23 anos) selecionados da população geral de nossa região. Foram reunidos 252 doadores de sangue saudáveis e 48 voluntários recrutados entre estudantes e trabalhadores.

Os pacientes submetidos à cirurgia no Hospital das Clínicas da UNICAMP continuaram o seguimento na Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP onde os mesmos eram seguidos conforme o protocolo padrão do qual constavam, além dos dados de identificação, a idade ao diagnóstico, sexo, cor, dados clínicos pré-cirúrgicos, ultra-som, cintilografia da tireóide, biópsia aspirativa, dados referentes à cirurgia, dados do exame anatomo-patológico (medida do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação, presença de linfonodos). O protocolo reunia ainda informações acerca da presença ou ausência de metástases à distância na data da cirurgia (detectadas pela pesquisa de corpo inteiro com radioiodo – PCI); resultados de exames laboratoriais de controle: tiroxina livre sérica (T4l), tirotrofina sérica (TSH), Tiroglobulina sérica (Tg) e anticorpos anti-Tiroglobulina (Tg), exames estes executados pelo Laboratório Central do HC – UNICAMP; resultados da PCI de controle pós-operatório; dose de radioterapia eventualmente utilizada para ablação de restos tireoidianos e/ou de metástases a

distância. Foram também anotados eventos mais tardios durante o seguimento como o aparecimento de metástases e morte em decorrência do tumor. Todos os pacientes foram questionados sobre suas condições de saúde geral e história médica com ênfase em doenças anteriores ou atuais da tiróide. O uso de drogas também foram questionados, bem como o hábito de fumar.

TABELA 3. Distribuição das características clínicas dos pacientes com carcinoma maligno da tireóide.

HISTOLOGIA	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS							DIAGNÓSTICO (Presença de metástases)			SEGUIMENTO
	Idade	Sexo		Cor		Doença tireoidiana prévia	Fumo	Uso de medicamentos	Linfonodos	Distância	Recorrência e/ou metástases
		M	F	B	NB						
Carcinomas Papilíferos	42±13	12	38	34	16	4	13	11	23	8	15
Carcinomas Foliculares	57±17	7	10	10	7	1	3	4	3	9	9

Distribuição dos pacientes com carcinoma maligno de tireóide de acordo com sua histologia, características clínicas incluindo idade (X±DP em anos), sexo (F: feminino; M: masculino), cor (B: branco, NB: não-branco), a história de doenças tireoidianas benignas prévias, fumo, uso de medicamentos, acometimento de linfonodos e presença de metástases na época do diagnóstico e o diagnóstico de recorrência e/ou de metástases à distância detectadas durante o seguimento.

2. MÉTODOS

EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO À FRESCO

Do material coletado a fresco, foram macerados 50 mg de tecido ainda congelado e o DNA foi extraído utilizando o clássico método do Fenol/Clorofórmio (SAMBROOK *et al*, 1989) com pequenas modificações nos reagentes, resumidas na tabela 4. Os tecidos foram digeridos com Proteinase K e tampão de Proteinase K e incubados a 55°C durante 16 horas.

TABELA 4. Reagentes utilizados na extração de DNA de tecido à fresco.

Reagentes utilizados na extração de	Concentração
DNA de tecido	
Proteinase K	20 mg/ml
Tampão de Proteinase K	Tris (100 mM), SDS (5%), EDTA (2 mM)
Fenol/Clorofórmio	(1:1)
Clorofórmio-Álcool-Isoamílico	(24:1)
Acetato de Amônio	10M
Etanol	100%
Etanol	70%

EXTRAÇÃO DE DNA DE LEUCÓCITOS

Foi feita lise das hemácias do sangue periférico coletado em tubos contendo EDTA usando tampão de lise de hemácias (descrição na tabela 5) seguida da lise dos leucócitos em tampão de lise de leucócitos e SDS seguindo-se incubação a 37°C durante 30 minutos.

TABELA 5. Reagentes utilizados na extração de DNA de sangue periférico.

Reagentes utilizados na extração de	Concentração
DNA de leucócitos	
Tampão de lise de hemácias	NaCl (10 mM), MgCl ₂ (5mmM), Tris-HCL (10 mM, pH 7,5)
Tampão de lise de leucócitos	NaCl (5N), EDTA (0,2M), Tris-HCL (10mM, pH 7,5), Uréia
SDS	20%
Fenol Saturado com Tris	Fenol ; Tris (10 mM, pH 8)
Clorofórmio-álcool-isoamílico	24 : 1
Acetato de sódio	3 M
Etanol	100%
Etanol	70%
TE	Tris (10mM); EDTA (1mM)

Os produtos de extração obtidos por ambos os procedimentos acima descritos foram avaliados e quantificados com o auxílio de espectrofotometria e em gel de agarose a 0.8% como mostram as figuras 3 e 4.

ANÁLISE DOS GENES GSTM1, GSTT1 E β GLOBINA COMO CONTROLE:

Os genes GSTM1 e GSTT1 foram amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando-se um termociclador da marca Perkin Elmer. Utilizamos primers destinados a amplificar o gene da β -globina como controle positivo das amostras de DNA na reação de amplificação. Os três pares de primers foram incluídos na mesma reação caracterizando assim uma PCR-multiplex (ARRUDA *et al*, 1998). A PCR-multiplex foi otimizada para detectar a presença ou ausência dos genes GSTM1 e GSTT1 incluindo o gene β -globina como controle da integridade do DNA de nossas amostras. Os reagentes utilizados estão descritos na Tabela 6 e nas condições de PCR estão resumidas na Tabela 7. A técnica PCR-multiplex foi padronizada no nosso laboratório, baseando-se em ARRUDA *et al* . A técnica foi otimizada com três pares de primers, os quais tinham diferentes tamanhos. Para chegarmos a um padrão de condições de amplificação comum aos três primers, foram feitos diversos testes de temperatura, concentrações diferentes de cada reagente utilizado.

TABELA 6. Reagentes utilizados na reação de PCR-multiplex.

Reagentes utilizados na reação de		Concentração
PCR-multiplex		
10X	PCR buffer	Tris-HCL (10 mM pH 8,4); KCL (25 mM)
	MgCl ₂	1,5 Mm
	DATP, dCTP, dGTP, dTTP	0,1 mM
	Primer GSTM1 (sense e antisense)	120 ng
	Primer GSTT1 (sense e antisense)	150 ng
	Primer β Globina (sense e antisense)	95 ng
	Taq DNA polymerase GIBCO BRL	2 U
	DNA genômico	500 ng

TABELA 7. Condições utilizadas para amplificação da reação de PCR-multiplex.

Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
94°C	2 minutos	1
95°C	1 minuto	
62°C	1 minuto	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1

Os *primers* utilizados para a amplificação e os respectivos tamanhos de segmentos amplificados estão descritos na tabela 8.

TABELA 8. Primers utilizados para a amplificação.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS	TAMANHO (pb)
GSTM1	s 5' CTGCCCTACTTGATTGATGGG 3' as 5' CTGGATTGTAGCAGATCATGC 3'	273
GSTT1	s 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3' as 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	480
B GLOBINA	s 5' ATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACC 3' as 5' GTATTTTCGCAAGGTTTGAAGTAGCTC 3'	630

s – fita sense

as – fita antisense

ELETROFORESE

Os produtos obtidos na reação de amplificação por PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%. Aliquotas de 8 µl do produto das reações de PCR foram misturadas com 2 µl de azul de bromofenol (azul de bromofenol 0,25%; sacarose 40%) e aplicadas no gel de agarose 2%. Após a migração o gel foi corado com brometo de etídeo (8 mg/ml) e a visualização foi feita sob iluminação ultra-violeta. Foi utilizado um marcador de peso molecular (Ladder 100 pb) para a calibração da reação, onde o gene β -globina amplifica em 630 pb, o gene GSTT1 amplifica em 480 pb e o gene GSTM1 amplifica em 273 pb. Foram considerados genótipos nulos para GSTM1, os casos em que as reações de PCR obtiveram amplificação visualizadas como bandas de 630 e de 480 pb, na ausência do produto de 273 pb. Foram considerados genótipos nulos para GSTT1, as reações que exibiram as bandas de 630 e 273 pb, e ausência do produto de 480 pb. A ausência de bandas em GSTT1 e GSTM1 quando o gene β -globina está claramente presente identifica os genótipos nulos para estes dois alelos.

Visualizamos os resultados da amplificação excitando o corante incorporado ao DNA (brometo de etídeo) com luz ultravioleta graças a um sistema Kodak de visualização e fotografia.



RESULTADOS

Na Tabela 3 estão resumidas as características clínicas e os parâmetros de agressividade ao diagnóstico e durante o seguimento dos pacientes com câncer de tiróide.

Não houve diferenças entre a população controle e os pacientes com bócio benigno ou maligno em relação a idade, cor, distribuição do gênero, hábito de fumar, o uso de drogas ou doenças benignas na tiróide pré-existentes. No entanto, os pacientes com carcinoma folicular (CF) eram mais idosos do que os pacientes com carcinoma papilífero (CP) (Kruskal-Wallis; $p=0.0012$). A ocorrência de envolvimento de linfonodos no diagnóstico do câncer foi mais freqüente entre os CP (39%) do que nos CF (6%) (X^2 ; $p=0.0101$). Entretanto, estes últimos tumores já apresentavam metástase a longa distância no tempo do diagnóstico (53%) mais freqüentemente do que os CP (16%) (X^2 ; $p=0.004$). Os dados coletados no seguimento não evidenciam diferenças estatísticas entre CP e CF a respeito de metástases à distância e/ou a recorrência de tumor embora pacientes com CF apresentem evidência de ocorrência de tumor e/ou metástases em 50% dos casos enquanto que apenas 30% dos CP recidivaram (X^2 ; $p=0.130$). Não ocorreram mortes de pacientes durante o período de observação.

Realizamos uma comparação entre o perfil genotípico no DNA leucocitário com o correspondente perfil genotípico do DNA extraído a partir de tecido tumoral. Nas figuras 5 e 6 mostramos um exemplo de tal comparação que mostrou perfil exatamente igual em todos os 35 casos em que possuíamos tecido tumoral e sangue periférico.

Na Tabela 9 estão resumidos os resultados obtidos em números absolutos e proporções dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na população controle e nos pacientes com doenças benignas e malignas da tiróide. Na figura 9 mostramos um gel de agarose a 2% da população controle estudada.

TABELA 9. Comparação do perfil de distribuição dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na população normal e nos pacientes portadores de doenças da tiróide benignas e malignas (papilífero e folicular).

Genótipo	População		Bócio benigno		Papilífero		Folicular	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	%
Teta – mu -	15	(5)	4	(8)	5	(10)	3	(18)
Teta – mu +	52	(17)	6	(12)	5	(10)	4	(24)
Teta + mu -	111	(37)	20	(41)	20	(40)	5	(29)
Teta + mu +	122	(40)	19	(39)	20	(40)	5	(29)
Total	300		49		50		17	

A ausência combinada de ambos os genes GSTT1 e GSTM1 foi mais freqüente em carcinomas da tiróide do que na população controle (F; $p=0.0479$). A figura 7 exemplifica os resultados obtidos em sangue periférico proveniente de pacientes com carcinomas de tiróide papilífero e folicular. No entanto, a comparação entre tumores benignos e malignos não mostrou diferença no padrão genotípico (F; $p= 0.5560$). A figura 8 mostra um exemplo de gel obtido a partir de DNA extraído de tecido de pacientes com bócio multinodular e adenomas foliculares Também não encontramos diferenças entre o perfil genotípico de pacientes com tumores da tiróide benignos e a população controle (F; $p= 0.3213$).

Não houve associação entre o genótipo e as características clínicas dos pacientes, parâmetros da agressividade do tumor no diagnóstico ou comportamento durante o seguimento. Também, não foi encontrada relação entre os alelos nulos do genótipo de GSTM1 ou de GSTT1 e os fatores de risco para o aparecimento de tumores da tiróide benignos e malignos que foram investigados, isto é, idade, sexo, cor, história de patologia tireoidiana prévia, uso de drogas ou medicamentos ou fumo.

A combinação dos genótipos nulos em GSTT1 e GSTM1 é responsável por um aumento de quase 2.6 vezes no risco de câncer: “odds ratio” de 2.576 (Intervalo de Confiança 95% = 1.044 a 6.355). O risco relativo de desenvolver câncer em portadores do genótipo nulo para GSTT1 e GSTM1 é 2.028 maior do que o da população controle.

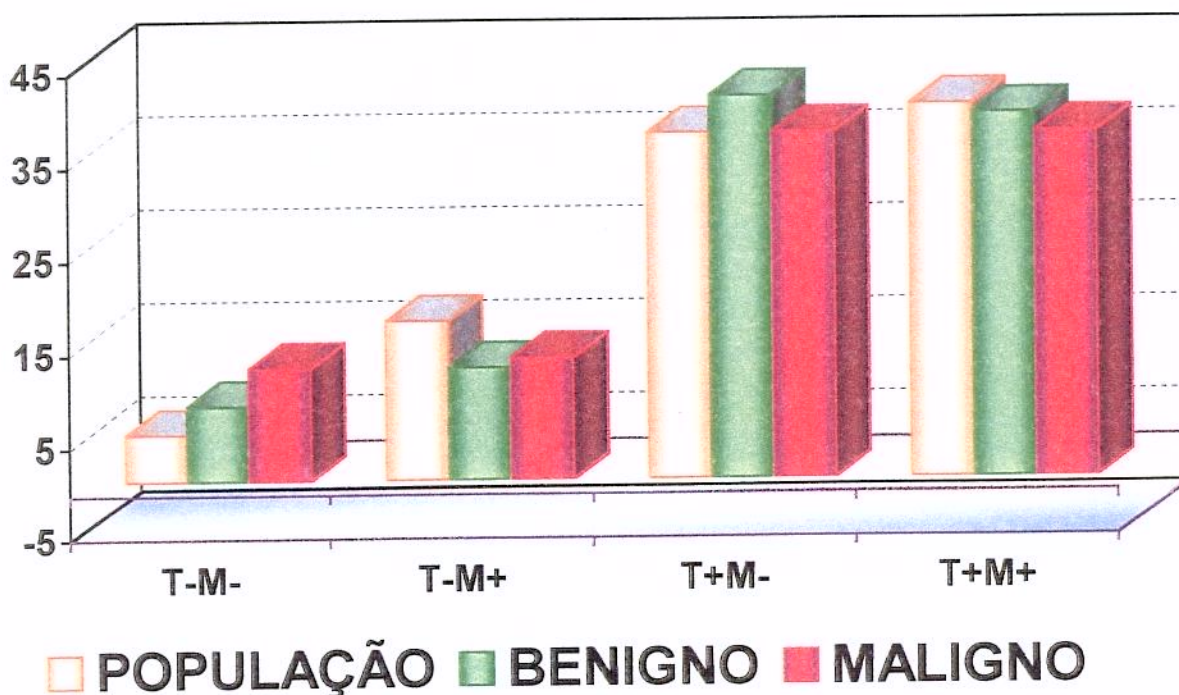


FIGURA 1. Apresentamos os dados em forma gráfica. Nesta figura mostramos a comparação estatística dos grupos controle, benigno e maligno em relação ao genótipo nulo combinado de GSTT1 e GSTM1.

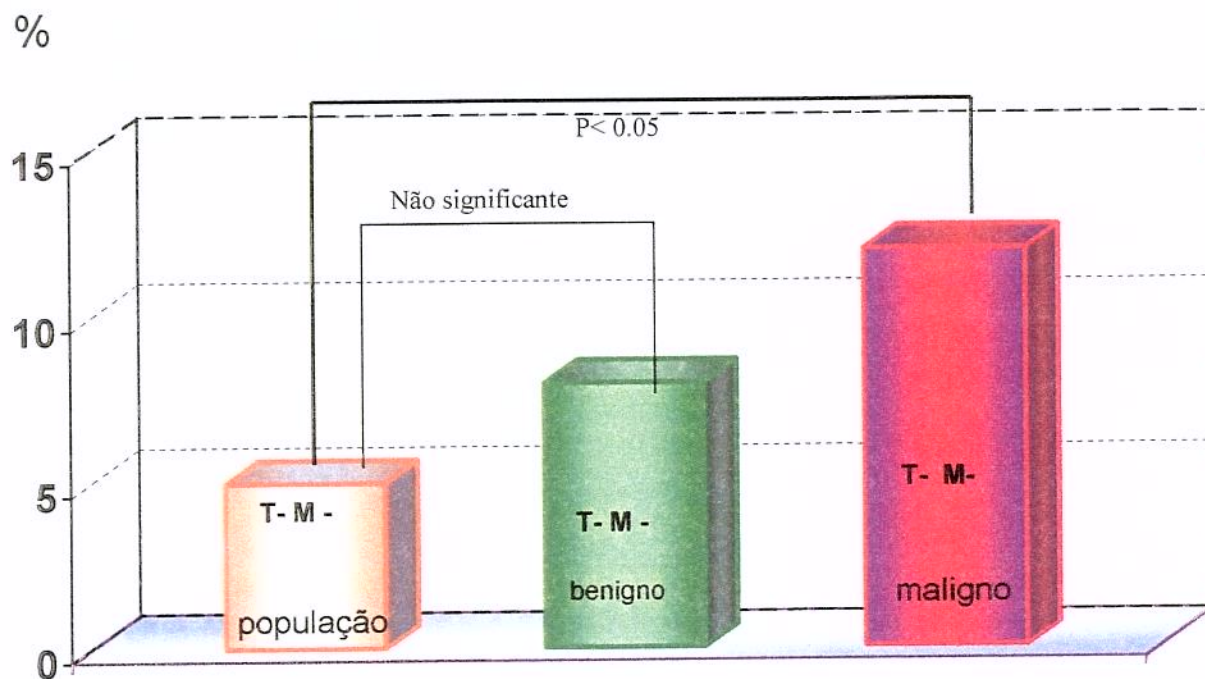


FIGURA 2. Neste gráfico, fica evidente a tendência de aparecimento de câncer no grupo com ausência de ambas as enzimas.

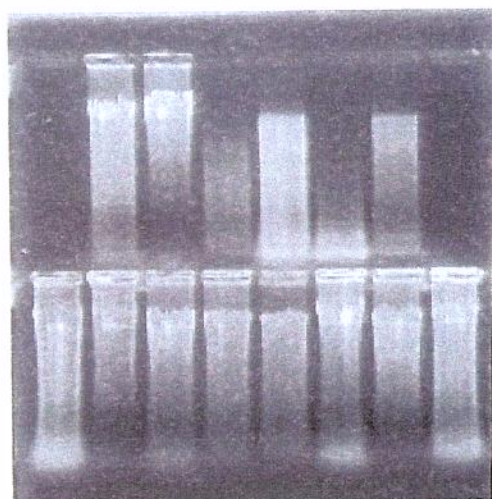


FIGURA 3. Exemplo de gel de agarose a 0.8% onde foram submetidas a eletroforese amostras de DNA extraídas de tecido a fresco através da técnica de Fenol/clorofórmio.

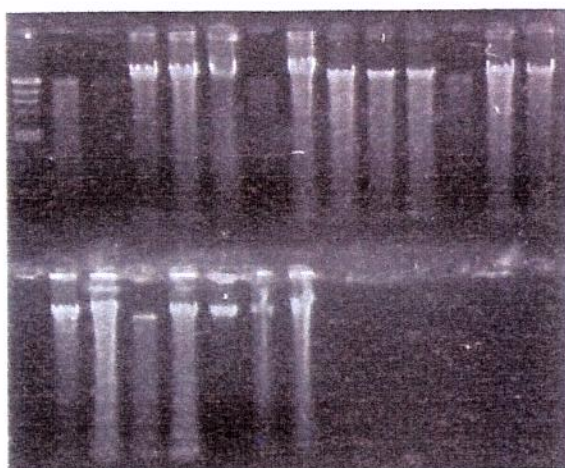


FIGURA 4. Exemplo de gel de agarose a 0.8% onde foram submetidas a eletroforese amostras de DNA extraídas de sangue periférico através da técnica de Fenol/clorofórmio.

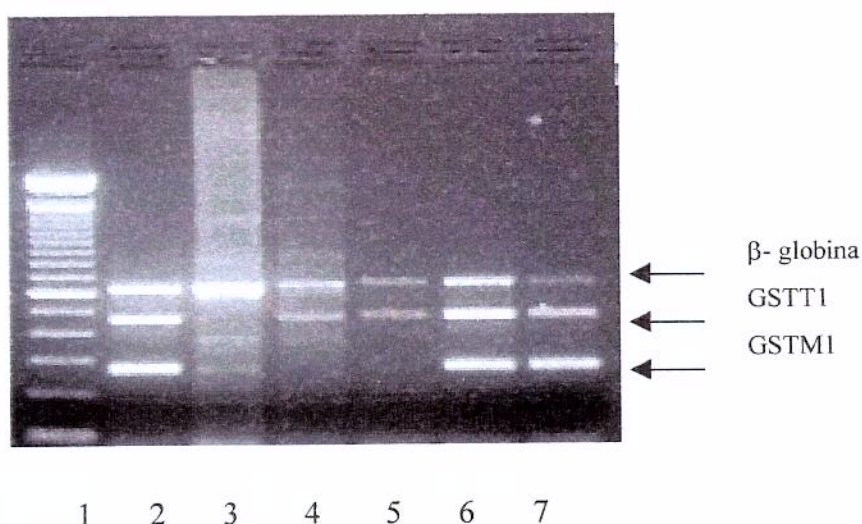


Figura 5. Gel de agarose 2% onde foram submetidas a eletroforese os produtos da PCR multiplex de DNA extraído de sangue periférico. Na coluna 1 temos um marcador de 100 pb. Nas colunas 2,6 e 7 os pacientes possuem os alelos GSTM1 e GSTT1. Na coluna 3 o paciente não possui ambos os alelos. Nas colunas 4 e 5 os pacientes não possuem o gene GSTM1.

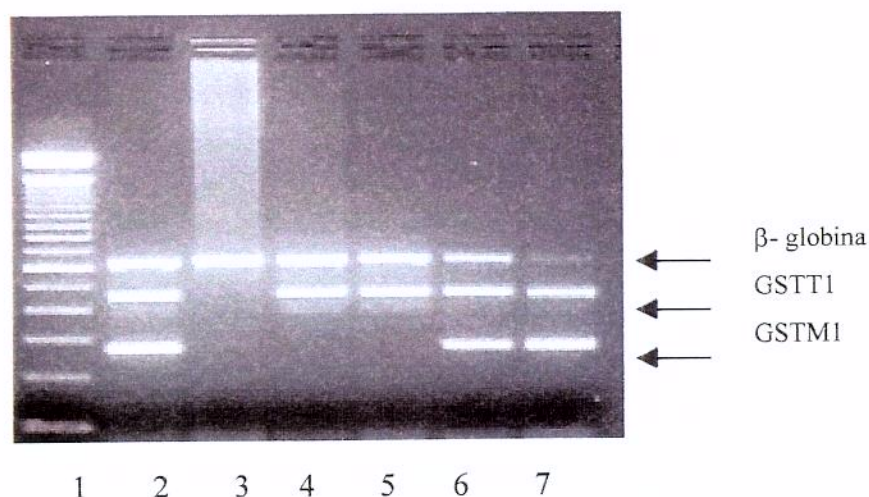


Figura 6. Gel de agarose 2% onde foram submetidas a eletroforese os produtos da PCR multiplex de DNA extraído de tecido tumoral à fresco. Os paciente são os mesmos representados na Figura 1, portanto com as mesmas deleções.

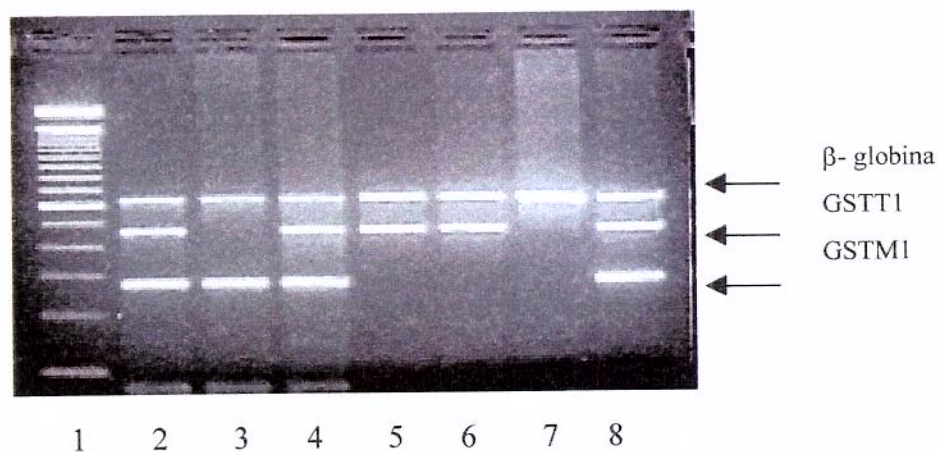


Figura 7. Gel de agarose 2% onde foram submetidas a eletroforese os produtos da PCR-multiplex de DNA extraído de sangue periférico de carcinomas papilíferos e foliculares. Na coluna 1 temos um marcador de 100 pb. Nas colunas 2,4 e 8 os pacientes possuem os alelos GSTM1 e GSTT1. Na coluna 7 o paciente não possui ambos os alelos. Nas colunas 5 e 6 os pacientes não possuem o gene GSTM1. Na coluna 3 o paciente não possui o alelo GSTT1. O fragmento de 630 bp correspondem ao gene β -globina, incluindo exon 3 e introns 2 e 3, que foi usado como controle para as amostras de DNA. A linha 1 mostra o marcador de peso molecular de 100 bp.

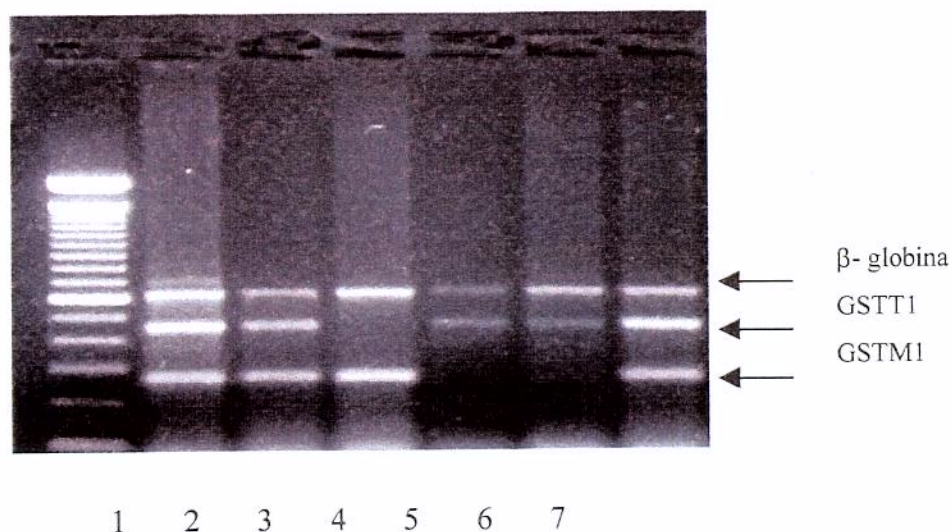


Figura 8. Gel de agarose 2% onde foram submetidas a eletroforese os produtos da PCR- multiplex de DNA extraído de tecido a fresco de paciente portadores de lesões benignas da tiróide como Bócio e Adenoma folicular. Na coluna 1 temos um marcador de 100 pb. Nas colunas 2,3 e 7 os pacientes possuem os alelos GSTM1 e GSTT1. Na coluna 4 o paciente não possui o alelo GSTT1. Nas colunas 5 e 6 os pacientes não possuem o gene GSTM1.

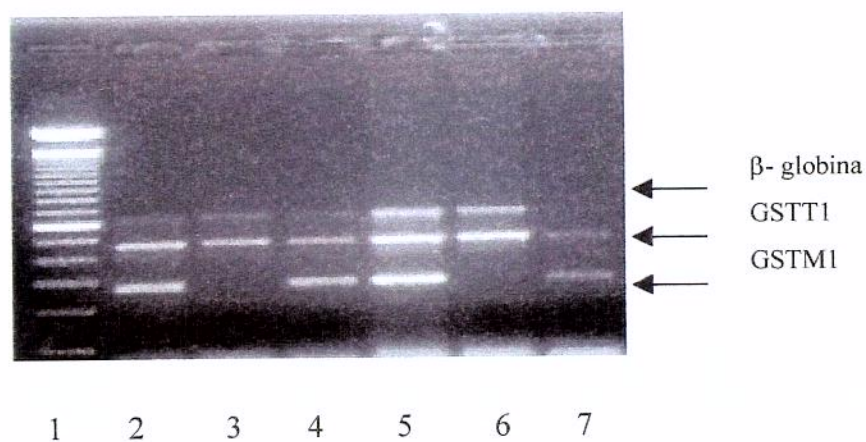


FIGURA 9. Gel de agarose 2% onde foram submetidas a eletroforese os produtos da PCR- multiplex de DNA extraído de sangue periférico de indivíduos normais doadores de sangue utilizados em nosso controle. Na coluna 1 temos um marcador de 100 pb. Nas colunas 2,4,5 e 7 os indivíduos possuem os alelos GSTM1 e GSTT1. Nas colunas 3 e 6 os indivíduos não possuem o gene GSTM1.



DISCUSSÃO

PRODUTOS QUÍMICOS E CÂNCER DA TIRÓIDE

Cinco a 10% da população apresenta nódulos detectáveis durante a vida, principalmente em comunidades com deficiência de iodo (AGHINI-LOMBARDI *et al*, 1999; SCHLUMBERGER, 2000; SCHLUMBERGER & PACINI, 1999). Entretanto, a maioria destes nódulos é benigna já que o câncer da tiróide é responsável por somente 0.6% a 1.6%, respectivamente, de todos os tipos de cânceres que ocorrem em homens e mulheres nos EUA (SCHLUMBERGER, 2000; SCHLUMBERGER & PACINI, 1999). A radiação ionizante é o único fator que, até o momento, foi reconhecido como capaz de levar à formação de tumores benignos e malignos da tiróide (SCHLUMBERGER, 2000; SCHLUMBERGER & PACINI, 1999). Existem inúmeros relatos de aparecimento de tumores de tiróide por exposição a radiação ionizante acidental, como após o bombardeio atômico das cidades de Hiroshima e Nagasaki durante a 2ª Guerra Mundial ou por ocasião dos acidentes com usinas atômicas, como o acidente nuclear ocorrido em Chernobyl – Bielorrússia, em 1986 (NIKIFOROVA *et al*, 2000). Também são abundantes os relatos na literatura de casos de câncer tireoidiano relacionado com irradiação ionizante diagnóstica ou terapêutica de indicação médica, particularmente em crianças (INSKIP, 2001).

Atuando juntamente com a susceptibilidade individual, fatores ambientais tais como cigarro, alimentação e poluentes tem um papel importante na maioria dos cânceres humanos (PERERA, 1996). No entanto, na tiróide, nenhum destes fatores tem sido solidamente correlacionado com o aparecimento de tumores. Variações na incidência do câncer de tiróide em diferentes grupos geográficos e étnicos sugerem que fatores ambientais podem influenciar no processo de tumorigênese, mas os dados referentes a produtos carcinogênicos para a glândula são conflitantes. Diversos produtos químicos causam neoplasia de tiróide em roedores, geralmente atuando através de dois mecanismos básicos. O primeiro envolve um efeito carcinogênico direto ativando os oncogenes, inativando os genes supressores tumorais e produzindo alterações específicas na expressão e função dos genes envolvidos no crescimento celular, diferenciação e tempo de vida da célula. O segundo envolve produtos químicos, os quais, através de uma variedade de mecanismos, alteram a função da tiróide e produzem uma neoplasia secundária ao desequilíbrio hormonal (McCLAIN, 1992). Entretanto, existem importantes diferenças espécie-específicas na fisiologia da glândula tireoidiana de humanos e de roedores.

Uma ampla pesquisa sobre o poder de carcinogênese de mais de 200 drogas revelou que apenas duas, griseofulvina e senna, estavam associadas com aumento no risco de carcinoma de tiróide em seres humanos (FRIEDMAN & URY, 1983). Espironolactona e vitamina D, mas não os suplementos de cálcio, foram demonstrados como significativamente associados ao carcinoma medular, um tumor que, embora acometa a tiróide, não provém das células foliculares tiroidianas. A ingestão de substâncias bociogênicas nutricionais, como vegetais contendo glucosídeos cianogênicos (principalmente o repolho, couve-flor, brócolis, e outros membros da família dos crucíferos), não foi associada com aumento no risco de carcinoma de tiróide na espécie humana (RON *et al*, 1987). Existem, no entanto, dados que sugerem aumento do risco de neoplasia tiroidiana em indivíduos que consomem cereais refinados, como os que existem no pão ou nas massas (CHATENOUD *et al*, 1999).

CIGARRO E CÂNCER DA TIRÓIDE

Também não existem evidências epidemiológicas do aumento do risco de câncer de tiróide em fumantes. Um amplo estudo investigou a relação entre o consumo de cigarros e o câncer de tiróide em uma população controle de 2659 indivíduos e 1224 portadores de câncer de tiróide. Todos os participantes da pesquisa foram questionados sobre eventual exposição a radiação ionizante (como diagnóstico ou tratamento, bem como relacionada ao trabalho), ocupação, doenças anteriores da tiróide, história reprodutiva e antecedentes de tabagismo. Os dados sobre o consumo de cigarros foram detalhados, especificando-se quem nunca fumou e, entre os fumantes, a idade em que começaram a fumar, o tempo de fumo, a quantidade de cigarros por dia e há quantos anos deixaram de fumar. Os resultados mostraram que o cigarro diminui o risco de câncer de tiróide na mulher. Os autores sugerem que este efeito seja produzido por ação do cigarro sobre o metabolismo do estrógeno e causando diminuição dos níveis de TSH, embora não existam comprovações experimentais sólidas de tais ações. (KREIGER & PARKES, 2000; GALANTI *et al*, 1996). Mais recentemente, PICCHI *et al*, 2001, comparou 78 portadoras de carcinomas diferenciados da tiróide com 150 controles normais também comprovando uma redução do risco de câncer em mulheres fumantes, novamente sugerindo que o fumo tenha uma ação anti-estrogênica protetora em relação a câncer tiroidiano. Usando dados de

companhias de seguros, IRIBAREEN estudou uma população de 204964 indivíduos seguidos por cerca de 20 anos. Nos 196 indivíduos que desenvolveram câncer de tireóide, identificou como fatores de risco o sexo feminino, raça asiática, a irradiação ionizante, bócio prévio e a história familiar de doença tireoidiana. Cigarro, álcool, uso de contraceptivos orais e outros medicamentos não se relacionaram com o aparecimento da doença (IRIBAREEN *et al*, 2001).

DELEÇÃO DAS ENZIMAS GST E CÂNCER DA ESPÉCIE HUMANA

Indivíduos que são portadores de deleções nos genes GSTM1 e GSTT1 podem ter a capacidade de metabolizar e eliminar compostos carcinogênicos prejudicada, podendo, portanto, ter um aumento no risco de câncer (SALAGOVIC *et al*, 1998). Estas enzimas tem uma particular importância porque estão envolvidas na ativação e detoxificação de uma variedade de metabólitos e substâncias produzidas por importantes indústrias químicas, incluindo metileno clorídrico, etileno, brometo de etídeo, oxido etileno, e 1,3-butadieno (HAYES & PULFORD, 1995).

Estudos epidemiológicos sugerem que o genótipo nulo do gene GSTM1 está associado à susceptibilidade a cânceres relacionados com o fumo (SALAGOVIC *et al*, 1998). Vários estudos, compilados em extensa revisão de HENGSTLER, 1998, demonstraram uma significativa associação entre a deleção do gene GSTM1 e o aumento no risco de câncer de pulmão. Para KELSEY *et al*, 1997, o risco de câncer de pulmão está aumentados em indivíduos que possuem polimorfismo nulo nos genes GSTM1 e GSTT1. A deleção do gene GSTM1 também predispõe ao câncer de bexiga (MUNGAN *et al*, 2000; LIN *et al*, 1994; AKTAS *et al*, 2001; GEORGIU *et al*, 2000), particularmente em pacientes fumantes (SALAGOVIC *et al*, 1999). A ausência de ambos os genes GSTM1 e GSTT1 também pode ser um fator de risco para a incidência do câncer de cabeça e pescoço (TRIZNA *et al*, 1995). O polimorfismo do gene GSTM1 altera o risco de câncer de cabeça e pescoço dependendo da história de tabagismo, da região do câncer e da idade (KIHARA *et al*, 1997). HANNA *et al*, 2001 encontrou uma associação significativa entre a deleção do gene GSTM1 e o risco do câncer de laringe, a qual parece novamente estar relacionado com o fumo (HONG *et al*, 2000; GRONAU *et al*, 2000).

Em neoplasias não tão estreitamente relacionadas com o fumo também tem havido vários estudos do sistema GST. Arruda demonstrou um aumento no risco de Leucemia mieloide aguda associado com o genótipo nulo combinado de GSTM1 e GSTT1 (ARRUDA *et al*, 2001). Por outro lado, apenas ausência do gene GSTT1 foi associada com Síndrome mielodisplásica (ARAI *et al*, 1999; CHEN *et al*, 1996). HONG *et al*, 2000 sugeriu que a deleção do gene GSTT1 pode servir de fator predisponente ao câncer coloretal. HELZLSOUER *et al*, 1998; MAUGARD *et al*, 2001, mostrou relação entre os genes GSTM1 e GSTT1 e o risco de câncer de mama. O polimorfismo dos genes GSTM1 e GSTT1 representa um fator de susceptibilidade ao câncer de mama em mulheres caucasianas e afro-americanas (BAILEY *et al*, 1998). SETIAWAN *et al*, 2000 encontrou um aumento no risco de câncer gástrico na população chinesa com deleção do gene GSTT1.

AS ENZIMAS GST E CÂNCER DA TIRÓIDE

Não encontramos estudos anteriores na literatura referentes ao papel das enzimas de detoxificação em geral, ou as GSTs em particular, em câncer de tiróide. Estudamos um grande grupo controle que apresentou um perfil genotípico similar ao previamente descrito em nossa população, confirmando sua alta heterogeneidade (ARRUDA *et al*, 1998; GATTAS & SOARES *et al*, 2000). Nossos dados nos nódulos de tiróide indicam uma alta prevalência de genótipos nulos combinados nos carcinomas diferenciados: CF (17%) e CP (10%). Esta prevalência é significativamente mais elevada do que a da população controle ($p < 0.05$). No entanto, não conseguimos encontrar qualquer associação entre as características clínicas, histológicas, os parâmetros de agressividade do tumor ao diagnóstico ou durante o seu seguimento e o perfil genotipo. Além disso, o genótipo de tumores e células normais correspondentes eram sempre idênticos, indicando que os genes estudados não tem nenhum papel importante no processo de transformação de células foliculares. Por outro lado, observamos que indivíduos com genótipos nulos combinados apresentam quase 2.6 vezes maior possibilidade de desenvolver nódulos malignos da tiróide do que a população normal. Assim, embora não estejam envolvidas no processo de desdiferenciação da célula folicular, é possível que estas enzimas de detoxificação nos protejam contra fatores de risco para carcinogênese tireoidiana.



CONCLUSÕES

1. O padrão de herança do sistema GST nos indivíduos portadores de patologias da tiróide difere da população normal de nossa região.
2. A prevalência mais elevada dos genótipos nulos dos genes GSTM1 e GSTT1 em pacientes com tumores malignos sugere a participação do sistema na susceptibilidade ao câncer da tiróide indicando um possível papel deste sistema enzimático no metabolismo de substâncias carcinogênicas para a glândula tiróide.
3. Não evidenciamos relação entre o padrão de herança dos genes GSTM1 e GSTT1 e outros fatores implicados no risco de ocorrência de bócio e câncer da tiróide como idade, sexo, cor, uso de drogas ou fumo, história pregressa de patologias da tiróide e sua evolução.
4. Não encontramos relação entre o perfil de herança dos genes GSTM1 e GSTT1 e os parâmetros de agressividade investigados ao diagnóstico e durante o seguimento dos portadores de câncer da tiróide
5. A detecção de um perfil genotípico nulo combinado para GSTT1 e GSTM1, aliado com outras características clínicas e moleculares, poderá ser importante para ajudar a distinguir indivíduos com alto risco de câncer de tiróide entre a população.



SUMMARY

Susceptibility to chemical carcinogens plays an important role in the development of most cancers. Several polymorphisms of human drug-metabolizing enzymes influence this individual susceptibility. The genes that encode the isoenzymes of the glutathione s-transferase (GST) system present a polymorphic inheritance. The GST mu 1 (GSTM1) and GST theta 1 (GSTT1) genes have a null allele variant in which the entire gene is absent. The null genotype for both enzymes has been associated with many different types of tumors.

In order to look for the influence of the inheritance pattern of these enzymes on thyroid cancer risk we used a triplex PCRⁱ that included β -globin gene as a DNA quality control in the PCR reaction to compare 300 normal individuals of our population to 116 goiter patients. There were 49 cases of benign goiters and 67 cases of malignant diseases: 50 papillary and 17 follicular carcinomas.

Comparison between thyroid tumor specimens and normal corresponding samples of 35 cancer patients demonstrated identical patterns, suggesting that the GST system is not involved in the process of follicular dedifferentiation. There was no statistical difference between the prevalence of the deleted alleles in the normal individuals and in the goiter patients. However, papillary carcinoma patients (10%) and follicular carcinoma patients (17%) presented a higher prevalence of the null genotype than the normal population individuals (5%) ($p=0,0479$).

We found a 2.6 increased risk of thyroid cancer associated with the GSTT1 and GSTM1 combined null inheritance, suggesting that this may be a useful marker for thyroid cancer susceptibility.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- AGHINI-LOMBARDI, F.; ANTONANGELI, L.; MARTINO, E.; VITTI, P.; MACCHERINI, D.; LEOLI, F.; RAGO, T.; GRASSO, L.; VALERIANO, R.; BALESTRIERI, A.; PINCHERA, A. The spectrum of thyroid disorders in an iodine-deficient community: the Pescopagano survey. J Clin Endocrinol Metab. 84(2): 561-6, 1999.
- AKTAS, D.; OZEN, H.; ATSU, N.; TEKIN, A.; SOZEN, S.; TUNCBILEK, E. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in bladder cancer patients. a marker for invasive bladder cancer? Cancer Genet Cytogenet. 125(1):1-4, 2001.
- ARAI, Y.; HIROSE, N.; YAMAMURA, K.; NAGAI, M.; JANG, H.; HATTORI, Y.; IKEDA, Y. A patient with genetic deletion of glutathione-S-transferase T1 and M1 who developed non-small-cell lung cancer and myelodysplastic syndromes. Am J Med Sci. 318(6):424-7, 1999.
- ARAND, M.; MUHLBAUER, R.; HENGSTLER, J.; JAGER, E.; FUCHS, J.; WINKLER, L.; OESCH, F. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. Anal Biochem. 236(1):184-6, 1996.
- ARRUDA, V.R.; GRIGNOLLI, C.E.; GONÇALVES, M.S.; SOARES, M.C.; MENEZES, R.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? Clin Genet. 54(3):210-4, 1998.
- ARRUDA, V.R.; LIMA, C.S.; GRIGNOLI, C.R.; DE MELO, M.B.; LORAND-METZE, I.; ALBERTO, F.L.; SAAD, S.T.; COSTA, F.F. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) gene defects. Eur J Haematol. 66(6):383-8, 2001.
- AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. Mutat Res. 3:464(1):65-76. Review, 2000.

- BAILEY, L.R.; ROODI, N.; VERRIER, C.S.; YEE, C.J.; DUPONT, W.D.; PARL, F.F. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasians and African Americans. Cancer Res. 1;58(1): 65-70, 1998.
- BAUDIN, E.; TRAVAGLI, J. P.; ROPERS, J.; MANCUSI, F.; BRUNO-BOSSIO, G.; CAILOU, B.; CAILLEUX, A.F.; LUMBROSO, J.D; PARMENTIER, C.; SCHLUMBERGER, M. Microcarcinoma of the thyroid gland -The Gustav-Roussy Institute Experience. Cancer. 83: 553-59, 1998.
- BLACK, S.M.; WOLF, C.R. The role of glutathione-dependent enzymes in drug resistance. Pharmacol Ther 51(1):139-54, 1991.
- BURGUERA, B.; GHARIB, H. Thyroid incidentalomas. Prevalence, diagnosis, significance, and management. Endocrinol Metab Clin North Am. 29(1): 187-203, 2000.
- CHATENOUDL, L.A.; VECCHIA, C.; FRANCESCHI, S.; TAVANI, A.; JACOBS, D.R. JR.; PARPINEL, M.T.; SOLER, M.; NEGRI, E. Refined-cereal intake and risk of selected cancers in Italy. Am J Clin Nutr. 70(6):1107-10, 1999.
- CHEN, H.; SANDLER, D.P.; TAYLOR, J.A.; SHORE, D.L.; LIU, E.; BLOOMFIELD, C.D.; BELL, D.A. Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. Lancet. 347(8997):295-7, 1996.
- DRINKWATER, N.R.; SUGDEN, B. Mecanismos da carcinogênese. EM HOSSFELD, D. K.; SHERMAN, C. D.; LOVE, R. R.; BOSCH, F. X. Manual de Oncologia Clínica, 5ª ed, pp. 7-21, Fundação Oncocentro de São Paulo, 1991.
- FRIEDMAN, G.D.; URY, H.K. Screening for possible drug carcinogenicity: second report of findings. J Natl Cancer Inst. 71(6):1165-75, 1983.
- GALANTI, M.R.; HANSSON, L.; LUND, E.; BERGSTROM, R.; GRIMELIUS, L.; STALSBERG, H.; CARLSEN, E.; BARON, J.A.; PERSSON, I., EKBOM, A. Reproductive history and cigarette smoking as risk factors for thyroid cancer in women: a population-based case-control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 5(6):425-31, 1996.

- GATTAS, G.J.; SOARES-VIEIRA, J.A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. Occup Med (Lond). 50(7):508-11, 2000.
- GEORGIOU, I.; FILIADIS, I.F.; ALAMANOS, Y.; BOUBA, I.; GIANNAKOPOULOS, X.; LOLIS, D. Glutathione S-transferase null genotypes in transitional cell bladder cancer: a case-control study. Eur Urol. 37(6):660-4, 2000.
- GRONAU, S.; KONIG-GREGER, D.; RETTINGER, G.; RIECHELMANN, H. [GSTM1 gene polymorphism in patients with head and neck tumors]. Laryngorhinootologie. 79(6):341-4, 2000.
- GUIMARÃES, V. Conexão T: o impacto de uma campanha pública. Apresentado em palestra ao 9º Encontro Brasileiro de Tiróide, Gramado, RS, 2000.
- HANNA, E.; MACLEOD, S.; VURAL, E.; LANG, N. Genetic deletions of glutathione-S-transferase as a risk factor in squamous cell carcinoma of the larynx: a preliminary report. Am J Otolaryngol. 22(2):121-3, 2001.
- HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol. 30(6):445-600, 1995.
- HELZLSouer, K.J.; SELMIN, O.; HUANG, H.Y.; STRICKLAND, P.T.; HOFFMAN, S.; ALBERG, A.J.; WATSON, M.; COMSTOCK, G.W.; BELL, D. Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. J Natl Cancer Inst. 1:90(7):512-8, 1998.
- HENGSTLER, J.G.; ARAND, M.; HERRERO, M.E.; OESCH, F. Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. Recent Results Cancer Res 154:47-85, 1998.

- HONG, Y.J.; LEE, J.K.; LEE, G.H.; HONG, S.I. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on larynx cancer risk among Korean smokers. Clin Chem Lab Med. 38(9):917-9, 2000.
- INSKIP, P.D. Thyroid cancer after radiotherapy for childhood cancer. Med Pediatr Oncol. 36(5):568-73, 2001.
- IRIBARREN, C.; HASELKORN, T.; TEKAWA, I.S.; FRIEDMAN, G.D. Cohort study of thyroid cancer in a San Francisco Bay area population. Int J Cancer. 1;93(5): 745-50, 2001.
- KELSEY, K.T.; SPITZ, M.R.; ZUO, Z.F.; WIENCKE, J.K. Polymorphisms in the glutathione S-transferase class mu and theta genes interact and increase susceptibility to lung cancer in minority populations (Texas, United States). Cancer Causes Control. 8(4):554-9, 1997.
- KIHARA, M.; KIHARA, M.; KUBOTA, A.; FURUKAWA, M.; KIMURA, H. GSTM1 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to head and neck cancers among Japanese smokers. Cancer Lett. 30;112(2):257-62, 1997.
- KREIGER, N.; PARKES, R. Cigarette smoking and the risk of thyroid cancer. Eur J Cancer. 36(15):1969-73, 2000.
- LANDIS, S.H.; MURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P.A. Cancer statistics. Cancer J Clin. 48(1):6-29, 1998.
- LIN, H.J.; HAN, C.Y.; BERNSTEIN, D.A.; HSIAO, W.; LIN, B.K.; HARDY, S. Ethnic distribution of the glutathione transferase Mu 1-1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. Carcinogenesis. 15(5):1077-81, 1994.
- MANNERVIK, B.; ALIN, P.; GUTHENBERG, C.; JENSSON, H.; TAHIR, M.K.; WARHOLM, M.; JORNVALL, H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. Proc Natl Acad Sci U S A. 82(21): 7202-6, 1985.

- MANNERVIK, B.; DANIELSON, U.H. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. CRC Crit Rev Biochem. 23(3):283-337, 1988.
- MARKS, F.; FURSTENBERGER, G. Proliferative responses of the skin to external stimuli. Environ Health Perspect. 101 Suppl 5:95-101, 1993.
- MAUGARD, C.M.; CHARRIER, J.; PITARD, A.; CAMPION, L.; AKANDE, O.; PLEASANTS, L.; ALI-OSMAN, F. Genetic polymorphism at the glutathione S-transferase (GST) P1 locus is a breast cancer risk modifier. Int J Cancer 1;91(3):334-9, 2001.
- McCLAIN, R. M. Thyroid gland neoplasia: non-genotoxic mechanisms. Toxicol Lett. 64-65 Spec No:397-408, Review, 1992.
- MILLER, M.S.; McCARVER, D.G.; BELL, D.A.; EATON, D.L.; GOLDSTEIN, J.A. Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes. Fundam Appl Toxicol. 40(1):1-14, 1997.
- MUNGAN, N.A.; ABEN, K.K.; BEEKS, E.; KAMPMAN, E.; BUNSCHOTEN, A.; BUSSEMAKERS, M.; WITJES, J.A.; KIEMENEY, L.A. A germline homozygote deletion of the glutathione-S-transferase M1 gene predisposes to bladder cancer. Urol Int. 64(3):134-8, 2000.
- NAMBA, H.; MATSUO, K.; FAGIN, J.A. Clonal composition of benign and malignant thyroid tumors. J Clin Invest. 86(1):120-125, 1990.
- NIELSEN, P.S.; DE PATER, N.; OKKELS, H.; AUTRUP, H. Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers--effect of GSTM1 and NAT2 genotypes on adduct levels. Carcinogenesis. 17(5):1021-7, 1996.
- NIKIFOROVA, M.N.; STRINGER, J.R.; BLOUGH, R.; MEDVEDOVIC, M.; FAGIN, J.A.; NIKIFOROV, Y.E. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. Science. 290(5489):138-41, 2000.

- PALLI, D.; VIENIS, P.; RUSSO, A.; BERRINO, F.; KROGH, V.; MASALA, G.; MUNNIA, A.; PANICO, S.; TAIOLI, E.; TUMINO, R.; GARTE, S.; PELUSO, M. Diet, metabolic polymorphisms and DNA adducts: the epi-Italy cross-sectional study. Int J Cancer. 87:444-451, 2000.
- PELUSO, M.; AMASIO, E.; BONASSI, S.; MUNNIA, A.; ALTRUPA, F.; PARODI, S. Detection of DNA adducts in human nasal mucosa tissue by ³²P-postlabeling analysis. Carcinogenesis. 18(2):339-44, 1997.
- PEMBLE, S.; SCHROEDER, K.R.; SPENCER, S.R.; MEYER, D.J.; HALLIER, E.; BOLT, H.M.; KETTERER, B.; TAYLOR, J.B. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. Biochem J. 300 (Pt1):271-6, 1994.
- PERERA, F.P.; ESTABROOK, A.; HEWER, A.; CHANNING, K.; RUNDLE, A.; MOONEY, L.A.; WHYATT, R.; PHILLIPS, D.H. Carcinogen-DNA adducts in human breast tissue. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 4(3):233-8, 1995.
- PERERA, F.P. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. J Natl Cancer Inst. 88(8):496-509, 1996.
- PICCHI, P.; FALOCI, C.; SALABE, G.B. Hormonal and reproductive factors and cigarette smoking as risk factors for thyroid cancer in women. A case-control study. Minerva Endocrinol. 26(2):53-7, 2001.
- RANEY, K.D.; MEYER, D.J.; KETTERER, B.; HARRIS, T.M.; GUENGERICH, F.P. Glutathione conjugation of aflatoxin B1 exo- and endo-epoxides by rat and human glutathione S-transferases. Chem Res Toxicol. 5(4):470-8, 1992.
- REBBECK, T.R. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 6(9):733-43, 1997.

- RON, E.; KLEINERMAN, R.A.; BOICE, J.D.JR.; LIVOLSI, V.A.; FLANNERY, J.T.; FRAUMENI, J.F.JR. A population-based case-control study of thyroid cancer. J Natl Cancer Inst. 79(1):1-12, 1987.
- SALAGOVIC, J.; KALINA, I.; STUBNA, J.; HABALOVA, V.; HRIVNAK, M.; VALANSKY, L.; KOHUT, A.; BIROS, E. Genetic polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1 as a risk factor in lung and bladder cancers. Neoplasma. 45(5):312-7, 1998.
- SALAGOVIC, J.; KALINA, I.; HABALOVA, V.; HRIVNAK, M.; VALANSKY, L.; BIROS, E. The role of human glutathione S-transferases M1 and T1 in individual susceptibility to bladder cancer. Physiol Res. 48(6):465-71, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab., Plainview, N.Y. 1989.
- SCHLUMBERGER, M.J. Medical progress: papillary and follicular thyroid carcinoma. N Engl J Med. 29:338(5):297-306, 1998.
- SCHLUMBERGER, M.; PACINI, F. Nodular thyroid diseases. In SCHLUMBERGER, M. and PACINI, F. (eds.), Thyroid tumors pp. 13-30 Paris, Edition Nucléon, 1999.
- SCHLUMBERGER, M.J. Diagnostic follow-up of well-differentiated thyroid carcinoma: historical perspective and current status. J Endocrinol Invest. 22(11 Suppl):3-7, 1999.
- SCHLUMBERGER, M.J. Papillary and follicular thyroid carcinoma. Baillieres Best Pract Res Clin Endo Metab. 14: 601-613, 2000.
- SEIDEGARD, J.; EKSTROM, G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. Environ Health Perspect. 105 Suppl 4:791-9, 1997.
- SEIDEGARD, J.; VORACHEK, W.R.; PERO, R.W.; PEARSON, W.R. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. Proc Natl Acad Sci USA. 85(19): 7293-7, 1998.

- SETIAWAN, V.W.; ZHANG, Z.F.; YU, G.P.; LI, Y.L.; LU, M.L.; TSAI, C.J.; CORDOVA, D.; WANG, M.R.; GUO, C.H.; YU, S.Z.; KURTZ, R.C. GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a Chinese population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 9(1):73-80, 2000.
- SHAHA, A.R.; SHAH, J.P.; LOREE, T.R. Patterns of failure in differentiated carcinoma of the thyroid based on risk groups. Head Neck . 20(1):26-30, 1998.
- TANG, D.; SANTELLA, R.M.; BLACKWOOD, A.M.; YOUNG, T.L.; MAYER, J.; JARETZKI, A.; GRANTHAM, S.; TSAI, W.Y.; PERERA, F.P. A molecular epidemiological case-control study of lung cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 4(4):341-6, 1995.
- TOMIMORI, E.; PEDRINOLA, F.; CAVALIERE, H.; KNOBEL, M.; MEDEIROS-NETO, G. Prevalence of incidental thyroid disease in a relatively low iodine intake area. Thyroid. 5(4):273-6, 1995.
- TRIZNA, Z.; CLAYMAN, G.L.; SPITZ, M.R.; BRIGGS, K.L.; GOEPFERT, H. Glutathione s-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. Am J Surg. 170(5):499-501, 1995.
- WARD, L.S. Genética Molecular do câncer: implicações no câncer da tireóide humana. Rev Bras Clin Terap. 23(6):212-218, 1997.
- WARD, L.S.; FAGIN, J.A. Molecular genetics of thyroid cancer: evidence that inactivation of tumor supressor genes occurs at late stages of tumor progression. Molecular and cellular pediatric endocrinology. S. Handwerger. Humana Press Inc, Totowa, NJ, chapter 12, 201-211, 1998.
- WARD, L.S. Molecular basis for the diagnosis and therapy of the thyroid cancer. Rev Bras Clin Terap. 26(3):103-107, 2000.
- WILLIS, R.A. The spread tumors in the human body. London, Butterword & Co, 1952.