

POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS COM O TABAGISMO E O RISCO PARA DOENÇA DE GRAVES

RESUMO

Objetivo: O tabagismo é um fator de risco bem reconhecido para doença de Graves e particularmente para a oftalmopatia de Graves. Desta forma, polimorfismos genéticos dos genes de detoxificação e de genes pertencentes às principais vias de reparo de DNA e apoptose podem desempenhar um importante papel na suscetibilidade à doença. Além disto, como alguns destes genes são regulados pelos hormônios tiroideanos, podem afetar o prognóstico destes pacientes. Pretendemos avaliar a influência dos polimorfismos dos genes *GST*, *CYP* and *TP53* com o risco da doença de graves e seu prognóstico

Modelo de estudo: estudo prospectivo, caso controle.

Pacientes: Os genótipos de *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *CYP1A1* e do códon 72 de *TP53* foram analisados por meio de técnica de PCR, compreendendo um grupo de 400 pacientes com doença de Graves e 574 indivíduos-controles com exposição ambiental semelhante aos pacientes.

Resultados: Os genótipos *GSTM1* and *GSTT* tiveram a mesma distribuição nos casos e nos controles. Entretanto, as variantes *GSTP1* ($p<0.0001$), *CYP1A1* ($p<0.0033$), e *Pro/ProTP53* ($p<0.0007$) apareceram mais frequentemente na doença de Graves do que nos controles. A análise de multivariáveis indicou que o tabagismo e a herança das variantes *CYP1A1* e *Pro/ProTP53* foram importantes fatores de risco para doença de Graves, mas somente o cigarro apareceu como um fator de risco independente para a

Oftalmopatia de Graves. Não houve associação entre as características clínicas, incluindo oftalmopatia, ou prognóstico de tratamento e os genótipos estudados.

Conclusão: Concluimos que os polimorfismos genéticos GSTP1, CYP1A1 e TP53 podem estar associados com susceptibilidade à Doença de Graves relacionada com o tabagismo e que podem consistir um perfil de risco para a doença. Entretanto, tais polimorfismos não influenciam a resposta ao tratamento.

INTRODUÇÃO

Já é bem estabelecido que a Doença de Graves, uma desordem auto-imune, envolve uma complexa interação de múltiplos elementos genéticos e ambientais endógenos e exógenos que combinados desencadeiam a auto-imunidade tiroideana (1, 2). Não se conhece um gene único que cause a doença ou que seja responsável pelo seu desenvolvimento, mas há evidências consistentes de susceptibilidade genética nas doenças auto-imunes tiroideanas. Calcula-se que 79% do risco de desenvolver doença de Graves possa ser atribuído a fatores genéticos (1-5). Fatores ambientais tais como tabagismo, estresse, infecções bacterianas e virais e uma ampla variedade de drogas podem ser responsáveis por 21% da susceptibilidade ao desenvolvimento da doença de Graves (1-5).

A base bioquímica para a susceptibilidade aos danos ambientais ou endógenos produzidos por toxinas está relacionada a polimorfismos genéticos que normalmente ocorrem na população geral e envolve uma série de genes: genes implicados na predisposição a uma doença específica, na ativação ou detoxificação metabólica de genotoxinas e no controle do reparo aos danos de DNA ou celular (6). Genes polimórficos que codificam para enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos tem sido extensivamente investigados, em particular seu papel como um

modificador de fatores de risco para o câncer. Recentemente, uma série de estudos vem focando a importância destes genes nos processos de reações inflamatórias e em várias condições auto-imunes, incluindo esclerose múltipla, LES, Síndrome de Guilláin-Barré e artrite reumatóide (7-11).

O tabagismo é um fator de risco bem reconhecido para o desenvolvimento da doença de Graves e muito mais para a Oftalmopatia de Graves (12). A enzima Citocromo p4501A1 (CYP1A1) desempenha um papel chave no metabolismo de fase I dos hidrocarbonetos aromáticos e outros componentes tóxicos do cigarro que são subsequentemente detoxificados pelas enzimas de fase II tais como Glutathione S-Transferases (GST). Quando estas enzimas não são hábeis para evitar o dano genético, o gene Tp53 desempenha o papel fundamental de reconhecer e reparar tais alterações.

A família supergene GST codifica para uma série de enzimas diméricas que catalizam a conjugação de glutathione a uma variedade de compostos eletrofílicos, incluindo lípides oxidados e produtos de catecol gerados pelos danos a moléculas intracelulares induzidos por espécies oxigênio-reativas e outros compostos potencialmente deletérios. A importância deste gene é sugerida por sua provável expressão em todas as formas de vida (13, 14).

Polimorfismos genéticos tem sido demonstrados para os genes *GSTM1*, *GSTT1*, e *GSTP1*, localizados nos cromossomos 1p13.3, 22q11.2, e 11q13, respectivamente. Indivíduos com deleção homozigótica, que são classificados como “*GSTM1 null*” ou *GSTT1 null*, exibem ausência de atividade enzimática e são atribuídos com risco aumentado para os efeitos tóxicos de uma ampla variedade de exposição endógena ou ambiental (15). O gene *GSTP1* está localizado no cromossomo 11 e apresenta uma transição A a G resultando numa substituição de aminoácidos do códon Ile105Val, que modifica a estabilidade ao calor e a atividade específica das isoformas que contém Val.

(16). Estas variantes genéticas produzem enzimas com baixa atividade e, como os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* null, possuem menor capacidade efetiva de detoxificação do que o tipo selvagem GSTP1 (17). As enzimas GST estão sujeitas a regulação por diversos hormônios, incluindo os hormônios tiroideanos (18). Tanto T3 como T4 mostraram reduzir a atividade das GSTs, aumentando a possibilidade de que o estado de hipertireoidismo pudesse exercer uma influência na resposta às drogas anti-tiroideanas ou mesmo ao tratamento com radioiodoterapia (18).

Citocromos P450 compreendem uma superfamília de enzimas fundamentais no metabolismo de inúmeros substratos de origem endo ou exógena. O gene Citocromo P450 1A1 (*CYP1A1*), localizado no cromossomo 15q22 codifica para uma enzima hidroxilase que desempenha um papel chave no metabolismo de fase I dos hidrocarbonetos policíclicos, transformando-os em carcinógenos (19).

Uma mutação pontual timina/citosina no sítio de restrição da *MspI* do *CYP1A1* tem mostrado estar associada com uma forma mais induzível de *CYP1A1*. Os níveis elevados das enzimas correspondentes resultariam numa capacidade aumentada de ativar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, produzindo intermediários eletrofílicos altamente reativos que poderiam levar ao dano no DNA (21).

O gene TP53, localizado no cromossomo 17p13.1, é reconhecido como um gene supressor tumoral porque sua proteína codificada participa no processo de interrupção do ciclo celular e apoptose em resposta a danos no material genético pela transcrição diferencial de alvos genéticos e por meio de funções apoptóticas independentes (22, 23). A apoptose não somente previne a geração de tumores, mas também normalmente regula a maturação e controle de respostas imunes T e B, os componentes básicos das doenças auto-imunes da tireóide, pela remoção de elementos imunes auto-reativos ou não reativos(24). Um polimorfismo genético comum de um único nucleotídeo, no domínio

rico em prolina do exon 4 de TP53 produz uma troca de arginina por prolina na posição do aminoácido 72. As variantes resultantes do códon 72 reduzem a habilidade de p53 de ativar apoptose e têm sido relacionadas com algumas doenças auto-imunes, incluindo LES e artrite reumatóide (25, 26).

Embora o papel de muitos polimorfismos de genes relacionados com o metabolismo de toxinas sejam extensivamente investigados, considerando a susceptibilidade ao câncer de tiróide, as influências no risco de doenças auto-imunes é ainda pouco conhecida (27-29). Neste estudo propusemos avaliar a influência da herança dos polimorfismos de *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *CYP1A1* e *72TP53GS* na susceptibilidade à Doença de Graves e resposta ao tratamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo prospectivo, caso controle foi aprovado pelo Comitê da Faculdade e dos centros de saúdes que colaboraram com a casuística (Dados omitidos, de acordo com regulamento do evento COMAU). Um termo de consentimento foi aplicado a cada um dos 974 indivíduos envolvidos no estudo).

Pacientes

Quatrocentos pacientes ambulatoriais Brasileiros, diagnosticados com doença de Graves (300 mulheres e 100 homens; media de idade 35.5 ± 13.7 anos (1 a 79 anos) foram sujeitos deste estudo. Todos pacientes que se apresentaram com evidência clínica de tireotoxicose com supressão sérica de TSH, elevados níveis de T4 livre ou T3, elevada captação em 24 horas de iodo radioativo (24hr-RAIU) ou pertechnetato (Tc), com

distribuição homogênea e aumento difuso da glândula. Os pacientes foram cuidadosamente examinados e ou tratados com drogas anti-tiroideanas (102 casos com metimazol e 56 com propiltiouracil) ou designados para a terapia com radioiodo (232 casos), ou cirurgia (10 casos). A terapia com drogas anti-tiroideanas foi mantida por pelo menos 12 meses. Os níveis de TSH e T4L séricos eram avaliados a cada 30-60 dias durante a terapia com drogas anti-tiroideanas, e pelo menos três vezes durante os 12 meses seguintes à Radioidoterapia, tratamento cirúrgico ou uma droga anti-tireoideana.

A função tiroideana era avaliada pelo menos uma vez ao ano, durante o seguimento subsequente. 169 pacientes apresentaram evidência clínica de envolvimento ocular. Os exames oftalmológicos eram realizados a cada 2-3 semanas por um único examinador, cuja avaliação incluía as alterações em tecidos moles e medida da proptose. A atividade da oftalmopatia era graduada usando um escore clínico, o qual levava em conta sete manifestações da doença (dor espontânea retrobulbar, dor com a movimentação ocular, eritema de pálpebra, edema de pálpebra, injeção conjuntival, quimose e inchaço da carúncula). Cada uma das manifestações recebia um ponto e o escore variava de 0-7.

A cura do hipertiroidismo foi definida como evidência clínica e laboratorial de eutiroidismo ou hipotiroidismo na ausência de drogas antitiroideanas, por pelo menos 12 meses após a terapia com ^{131}I , cirurgia ou uma ou mais terapêuticas com drogas anti-tiroideanas.

Controles

Incluimos um grupo controle de 574 indivíduos saudáveis, selecionados da população geral de nossa região, com ingestão de iodo normal. Indivíduos com história de exposição ambiental ou ocupacional prévia específica a fatores de risco e antecedentes

de doença auto-imune foram excluídos. Considerando que a doença de Graves é mais frequente em mulheres, selecionamos três mulheres para cada homem. Infelizmente, não pudemos coletar sangue de crianças nem parear controles e pacientes por grupos étnicos, uma vez que a maioria dos indivíduos que concordaram em colaborar com o grupo controle eram caucasianos.

Tanto pacientes como os indivíduos controles foram submetidos a exame físico e interrogados com um questionário que incluía questões demográficas, étnicas, história ocupacional, tabagismo, hábitos alimentares, exercício físico, drogas e uso de fármacos e doenças prévias. Dado a dificuldade de quantificar o tabagismo, resgatar da história os hábitos atuais e no passado, os pacientes foram agrupados em não-fumantes e fumantes.

Avaliação da função tiroideana:

Os níveis séricos de TSH, T4 total e T4 livre, e T3, foram aferidos no equipamento IMMULITE autoanalyzer (DPC, Los Angeles, CA) utilizando ensaio imunométrico quimioluminescente. A avaliação do TSH mostrou uma sensibilidade de 0,002mU/L, valores normais de 0.4-4.0mU/L. Para a concentração de T4L, os valores normais variavam de 0,8 a 1,9 ng/dL. Os níveis normais séricos de T3 e T4 em nosso laboratório foram 82 a 200 ng/dL e 4,5 e 12,5 ug/ml, respectivamente. Os anticorpos tireoglobulina séricos (AcTg) e anticorpos tiroperoxidase (TPOAc) foram medidos usando um ensaio enzimático quimioluminescente (Immulate-DPC, LA, USA). Consideramos positivos todos os valores de TgAb e TPOAb acima de 40IU/mL e 35IU/mL, respectivamente. O RAIU-24hs foi medido 24horas após depois de uma dose traço de 100microCi de ¹³¹I

Identificação dos Genótipos

O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA e os DNA extraídos de espécimes congeladas e de leucócitos separados de todo o sangue usando um protocolo padrão de fenol/clorofórmio.

Os genótipos *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* e *CYP1A1* foram determinados utilizando métodos de PCR-RFLP já previamente descritos, com padronizações (27, 30, 29).

O estudo dos polimorfismos do codon 72 foi realizado nesta segunda etapa através de um ensaio de RFLP. Inicialmente, um fragmento de 296 pares de base é amplificado por meio de PCR, com os primers sense: (5'-ATCTACAGTCCCCCTTGCCG-3) e anti-sense (5'-GCAACTGACCGTGCAAGTCA-3). Cada 50 µl de solução da PCR continha 0.1 µg de DNA genômico, 0.6 U Taq DNA polimerase, 10 pmol de cada primer, 200 µM de cada dNTP e 1.5 mM de cloreto de MgCl₂ (2 µL do estoque). As reações de amplificação consistiram de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de annealing de 65 °C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma etapa inicial de desnaturação com 94°C por 5 minutos e uma etapa para a extensão final da fita de 72°C por 10 minutos. As oscilações de temperatura foram desenvolvidas com o auxílio de um termociclador MJ PTC-200 PCR system.

Cinco microlitros de cada PCR foram incubados a 37°C, por 19 horas com 10 u da enzima de restrição Bsh1236I (Fermentas, Brasil) em um meio tamponado contendo 10 mM tris, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA pH 8.5.

O produto desta restrição foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 3% e o padrão das bandas avaliado sob luz UV.

A presença do alelo selvagem, Arginina, foi indicada pela presença das bandas de 169 e 127 bp, enquanto que a ausência de digestão (296 bp) foi observada no alelo

polimórfico Prolina. O alelo heterozigoto é indicado pela presença das três variantes de peso 296, 169 e 127 bp.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software SAS (Analysis System, version 8.1, Cary, NC, USA, 1999-2000). As associações foram avaliadas com análises em tabelas 2X2 or 2Xn; Testes de Qui-quadrado ou Fisher foram usados para verificar a homogeneidade entre os casos e os controles no que tange ao gênero, etnia, uso de medicação, tabagismo e genótipos. O teste Kruskal-Wallis (KW) foi usado para comparar as idades entre os grupos. Os testes Mann-Whitney ou Wilcoxon compararam a idade e o tamanho do bócio entre os diferentes grupos genótipos.

As frequências genotípicas encontradas foram comparadas às calculadas usando a teoria de Hardy-Weinberg. Calculamos o poder de cálculo para todos os genes estudados. Odds Ratio (OR) e intervalo de confiança de 95% foram as medidas de força de associação utilizadas. Aquelas variáveis que mostraram associação significativa com a incidência e prognóstico de doença de Graves pela análise univariada foram submetidas a um modelo de regressão logística múltipla, a fim de avaliar o efeito de todos os genótipos e fatores de risco clínico, incluindo sexo, idade e fumo, como fatores independentes. Semelhante análise foi realizada com os fatores de risco para Oftalmopatia de Graves.

RESULTADOS

Não houve diferenças entre os indivíduos controles e os pacientes com Graves com relação aos hábitos alimentares, exercícios físicos ou sexo (175 homens e 399 mulheres vs 100 homens e 300 mulheres – X; $p=0.0612$); Entretanto, houve diferença considerando a idade (43.3 ± 15.7 vs 35.5 ± 13.7 anos; $p<0.0001$) e etnia (89 não Caucasianos e 485 Caucasianos vs 125 não Caucasianos e 275 Caucasianos; $p<0.0001$). O hábito de fumar cigarros também foi diferente entre os controles e os pacientes (29.26% fumantes ; 70.74% não fumantes vs 36.82% fumantes; 63.18% não fumantes) ($p= 0.0397$; **OR=1.409**; 95%CI=1.023-1.940).

Ao final do período mínimo de 12 meses de seguimento, 39 pacientes ainda estavam em tratamento, 274 indivíduos foram considerados curados e 87 pacientes ainda estavam em hipertireoidismo.

Na Tabela 1 estão dispostos os dados relativos aos genótipos estudados entre os pacientes e os controles. O gene *GSTM1* estava ausente em 40.25% dos pacientes e 43.65% dos indivíduos controles ($p=0.4390$). O gene *GSTT1* estava ausente em 20% dos pacientes e em 21.11% dos indivíduos controles ($p=0.7951$). Infelizmente, o poder de cálculo para estes genes foi muito baixo (16% e 0.5%, respectivamente).

Os pacientes com doença de Graves mostraram um significativo aumento da expressão das variantes dos genótipos *GSTP1* (*GSTP1* tipo selvagem = 42.25%, heterozigoto = 46.50%, homozigoto = 11.25%) comparados com a população controle (*GSTP1* tipo selvagem = 59.43%, heterozigoto = 31.35%, homozigoto = 9.22%; $p<0.0001$).

A análise de regressão logística corrigida para o sexo, idade e etnia mostrou que a herança de uma variante do alelo *GSTP1* aumenta o risco para Doença de Graves mais de duas vezes (OR= 2.074, 95%CI= 1.559-2.760), com um poder de cálculo de 99%. Quando os dados foram corrigidos para o fator tabagismo, a chance (Odds) de

desenvolver a doença de Graves era aumentada OR=2.125, 95%CI= 1.521-2.969 (p<0.0001).

Os pacientes com doença de Graves mostraram uma significativa super-expressão das variantes do genótipo *CYP11A1m1* comparados com a população controle (p<0.0033). As variantes *CYP11A1m1* eram mais frequentes nos pacientes com doença de Graves (normal=44.44%, heterozigoto =55.14%, homozigoto =3.42%) do que nos controles (normal=62.45%, heterozigoto =34.66%, homozigoto =2.89%). A análise de regressão logística multivariada ajustada para sexo, idade e etnia mostrou que a herança de uma variante do gene *CYP11A1* aumenta a susceptibilidade à doença de Graves (OR= 1.971, IC95%= 1.254-3.098), com poder de cálculo de 87%. A correção para o tabagismo reduziu discretamente a associação (OR= 1.884; 95% CI= 1.187-2.990; p= 0.0072)

Observamos uma distribuição similar dos tipos selvagens e as variantes do códon 72 de *TP53* nos pacientes e controles. Entretanto, o alelo *Pro/Pro* apareceu mais frequentemente nos pacientes do que nos controles (p<0.0007). A herança do alelo *Pro/Pro* aumentou o risco em quase 3 vezes (OR=2.984; IC95%= 1.433-6.217), poder de cálculo de 97%, e ainda maior na análise de regressão de multivariadas, ajustada para o tabagismo: OR= 4.685; IC 95%=1.707-12.861; p= 0.0027.

Considerando que a doença de Graves é tipicamente mais frequente em adultos jovens, comparamos os genótipos de pacientes abaixo e acima de 25 anos de idade. A análise de regressão logística múltipla ajustada para a idade, sexo e etnia identificou o genótipo *GSTP1* como um fator de risco em indivíduos abaixo de 25 anos. (OR=17.798; 95% CI=6.125 a 51.719; p<0.0001); enquanto em indivíduos acima de 25 anos, *GSTP1*

(OR=1.684; 95%CI=1.244 a 2.279; p= 0.0007), *CYP11A1* (OR=2.096; 95%CI=1.283 a 3.424; p= 0.0031) e *Pro/Pro 72TP53* (OR=2.609; 95%CI= 1.207 a 5.638; p= 0.0147) apareceram como um fator de susceptibilidade à doença.

A Análise de regressão logística multivariada corrigida para o sexo identificou o hábito de fumar como um risco independente que aumenta a susceptibilidade à Oftalmopatia de Graves, em mais de 2 vezes. (OR=2.243; 95% CI=1.325 to 3.797; p= 0.0026). Nenhum dos genótipos estudados esteve relacionado com o risco, intensidade ou prognóstico de desenvolvimento da oftalmopatia de Graves.

Não encontramos associação entre os genótipos estudados e as características clínicas – incluindo tamanho do bócio, níveis de hormônios tiroideanos e a presença de anticorpos anti-tiroideanos – e a taxa de cura.

Tabela 1: Distribuição da herança dos genótipos de *GSTM1* e *GSTT1* (presente=positivo; ausente =negativo); *Genótipos GSTP1* e *CYP1A1* (variants selvagem, homo and heterozigoto) e *p53codon72* (Arg ou Pro homo e heterozigoto) entre 400 casos de doença de Graves e 574 indivíduos controles.

All Cases								
		Control		Cases		OR*	(95%CI)	P
		N	(%)	N	(%)			
GSTM1	Positive	275	56.35	239	59.75	0.895	0.675-1.186	0.4390
	Negative	213	43.65	161	40.25			
GSTT1	Positive	385	78.89	320	80.00	0.955	0.677-1.349	0.7951
	Negative	103	21.11	80	20.00			
GSTP1	Wild-Type	290	59.43	169	42.25	2.074	1.559-2.760	<0.0001
	Heterozygous	153	31.35	186	46.50			
	Homozygous	45	9.22	45	11.25			
CYP1A1 ml	Wild-Type	173	62.45	52	44.44	1.971	1.254-3.0987	0.0033
	Heterozygous	96	34.66	61	52.14			
	Homozygous	8	2.89	4	3.42			
P53 codon 72	Arg/Arg	139	44.98	121	44.65	4.685	1.707-12.861	0.0010
	Arg/Pro	158	51.13	115	42.44			
	Pro/Pro	12	3.88	35	12.92			

DISCUSSÃO

A Doença de Graves é considerada uma condição multifatorial no qual o desenvolvimento da resposta auto-imune contra antígenos tiroideanos é facilitado por uma potencial poligênico, ainda pouco conhecido. Alguns fatores ambientais possivelmente desencadeariam o desenvolvimento da doença em indivíduos geneticamente susceptíveis (1-5).

Alguns agentes químicos ambientais demonstraram ser importantes em alterar o sistema imune em diferentes espécies (31, 32). Em humanos, a exposição a xenobióticos ambientais, incluindo fumo, foi proposto como um dos fatores iniciantes que levaria a perda de tolerância a proteínas próprias, em indivíduos susceptíveis (1, 7-11, 25, 26, 33-36). Nossos dados confirmam esta hipótese atual e estende para a oftalmopatia de Graves.

As enzimas GST são substratos específicas, mas seus mecanismos de ação são ainda não muito bem elucidados (14, 37). Nossos dados sugerem que indivíduos com as variantes GSTP1 podem ser mais susceptíveis aos efeitos dos agentes ambientais ou produtos endógenos que dependam de *GSTP1* mas não de *GSTM1* ou *GSTT1* como substrato de detoxificação. O fato de que o tabagismo aumenta o Odds de GSTP1 associados com o risco para doença de Graves sugere que alguns dos mais de 4000 compostos tóxicos aspirados ou ingeridos através do tabagismo possa estar envolvido com o desenvolvimento da doença.

As variants de *CYP1A1m1* também estiveram relacionadas com a susceptibilidade à doença de Graves. Durante os metabolismos oxidativos, estas enzimas também são responsáveis pela detoxificação de inúmeros compostos tóxicos. Nos contextos oxidativos, estas enzimas podem agir também de forma ambivalente,

gerando intermediários tóxicos. Nossos resultados sugerem que a herança das variantes de *CYP1A1* eleva a susceptibilidade à doença de Graves, mas que o Odds ratio é diminuído entre fumantes, reforçando nossa observação prévia no câncer de tiróide (29). As enzimas CYP, juntamente com Pro/Pro *TP53* podem participar no metabolismo de algumas toxinas de efeito cumulativo, mais importantes em indivíduos com mais de 25 anos.

O papel da variante Pro *TP53* em homozigose na susceptibilidade à doença de Graves é mais difícil de interpretar. As doenças auto-imunes tiroideanas podem estar associadas com elevado dano ao DNA e apoptose, bem como ao fato de que anticorpos anti-p53 podem ser detectados no soro de aproximadamente 4% dos pacientes suspeitos de doença auto-imune tiroideanas (38). O papel da morte celular programada nas doenças tiroideanas auto-imunes é ainda pouco entendido, mas conhece-se que a apoptose contribui, pelo menos parcialmente com a regulação das respostas imunes mediadas por células linfocitárias (24). Prolina é um aminoácido hidrofóbico que reduz a habilidade de p53 em ativar a apoptose e também aumentar a susceptibilidade aos cânceres tiroideanos (39). O papel de *TP53* nos tumores relacionados ao fumo tem sido amplamente investigado (40). Nossos dados indicam que a herança da homozigose de Pro*TP53* também desempenha um importante papel no risco à doença de Graves, especialmente entre fumantes.

Como não encontramos associação entre as características clínicas, oftalmopatia, taxa de cura com os genótipos estudados, assumimos que tais perfis genotípicos poderiam não ser úteis como um indicador de severidade da doença e nem de prognóstico. Por outro lado, considerando que a doença de Graves é uma das doenças auto-imunes mais prevalentes, nossos dados poderiam contribuir para delinear modelos poligenéticos de susceptibilidade para esta enfermidade, no contexto de prevenção.

Além disso, a herança destas enzimas serviriam de auxílio para explicar a relação observada entre o hábito de fumar e a doença auto-imune.

Conclusão

Concluimos que os polimorfismos genéticos GSTP1, CYP1A1 e TP53 podem estar associados com susceptibilidade à Doença de Graves relacionada com o tabagismo e que podem consistir um perfil de risco para a doença. Entretanto, tais polimorfismos não influenciam a resposta ao tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Weetman, A.P. (2003) Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur J Endocrinol* **148**:1-9.
2. Prummel, M.F., Strieder, T. & Wiersinga, W.M. (2004) The environment and autoimmune thyroid diseases. *Eur J Endocrinol* **150**:605-618.
3. Brix, T.H., Kyvik, K.O., Christensen, K. & Hegedus, L. (2001) Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:930-934.
4. Tait, K.F. & Cough, S.C.L. (2003) The genetics of autoimmune endocrine disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* **59**:1-11.
5. Tomer, Y. & Davies, T.F. (2003) Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocr Rev* **24**:694-717.
6. Miller, M.C. 3rd, Mohrenweiser, H.W. & Bell, D.A. (2001) Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett* **120**:269-280.
7. Kim, J.H., Lee, K.H., Yoo, D.H., Kang, D., Cho, S.H. & Hong, Y.C. (2007) GSTM1 and TNF-alpha gene polymorphisms and relations between blood lead and inflammatory markers in a non-occupational population. *Mutat Res.* **629**(1):32-39.

8. Kim, J.H., Park, S.G., Lee, K.H., Choi, J.H., Ha, E.H., Myung, S.K. & Hong, Y.C. (2006) GSTM1 and GSTP1 polymorphisms as potential factors for modifying the effect of smoking on inflammatory response. *J Korean Med Sci*, **21**(6):1021-1027.
9. Stavropoulou, C., Korakaki, D., Rigana, H., Voutsinas, G., Polyzoi, M., Georgakakos, V.N., Manola, K.N., Karageorgiou, C.E. & Sambani, C. (2007) Glutathione-S-transferase T1 and M1 gene polymorphisms in Greek patients with multiple sclerosis: a pilot study. *Eur J Neurol*. **14**(5): 572-574.
10. Kuwabara, S. (2007) Guillain-barre syndrome. *Curr Neurol Neurosci Rep* **7**(1):57-62.
11. Morinobu, S., Morinobu, A., Kanagawa, S., Hayashi, N., Nishimura, K., Kumagai, S. (2006) Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **24**(3):268-273.
12. Vestergaard, P. (2002) Smoking and thyroid disorders--a meta-analysis. *Eur J Endocrinol* **146**(2):153-161.
13. Strange, R.C., Jones, P.W. & Fryer, A.A. (2000) Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett* **112-113**:357-363.
14. Hayes, J.D. & Strange, R.C. (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* **61**:154-166.
15. Knudsen, L.E., Loft, S.H. & Autrup, H. (2001) Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutation Research* **482**:83-88.
16. Johansson, A.S., Stenberg, G., Widersten, M. & Mannervik, B. (1998) Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. *J Mol Biol* **278**:687-698.
17. Hu, X., Ji, X., Srivastava, S.K., Xia, H., Awasthi, S., Nanduri, B., Awasthi, Y.C., Zimniak, P. & Singh, S.V. (1997) Mechanism of differential catalytic efficiency of two polymorphic forms of human glutathione S-transferase P1-1 in the glutathione conjugation of carcinogenic diol epoxide of chrysene. *Arch Biochem Biophys* **345**:32-38.
18. Coecke, S., Vanhaecke, T., Foriers, A., Phillips, I.R., Vercruysse, A., Shephard, E.A. & Rogiers, V. (2000) Hormonal regulation of glutathione S-transferase expression in co-cultured adult rat hepatocytes. *J Endocrinol* **166**:363-371.
19. Trell, L., Korsgaard, R., Janzon, L. & Trell, E. (1985) Distribution and reproducibility of aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility in a prospective

- population study of middle-aged male smokers and nonsmokers. *Cancer* **56**(8):1988-1994.
20. Wu, M.T., Lee, J.M., Wu, D.C., Ho, C.K., Wang, Y.T., Lee, Y.C., Hsu, H.K. & Kao, E.L. (2002) Genetic polymorphisms of cytochrome P4501A1 and oesophageal squamous-cell carcinoma in Taiwan. *Br J Cancer* **87**:529-532.
 21. Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Yoshii, A., Shinoda, N. & Watanabe, J. (1990) Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. *FEBS Lett* **263**:131-133.
 22. Rinaldo, C., Prodosmo, A., Mancini, F., Iacovelli, S., Sacchi, A., Moretti, F. & Soddu S (2007) MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Molec Cell* **25**:739-750.
 23. Karp, G. (2002) Cell and molecular biology: concepts and experiments. 3rd ed New York: John Wiley & Sons.
 24. Duke, R.C., Ojcius, D.M. & Young, J.D. (1996) Cell suicide in health and disease. *Sci Am* **275**:80-87.
 25. Lee, Y.H., Rho, Y.H., Choi, S.J., Ji, J.D. & Song, G.G. (2005) The functional p53 codon 72 polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *Lupus* **14**(10):842-845.
 26. Lee, Y.H., Kim, Y.R., Ji, J.D., Sohn, J. & Song, G.G. (2001) p53 codon 72 polymorphism and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **28**(11):2392-2394.
 27. Morari, E.C., Leite, J.L., Granja, F., Assumpcao, L.V.M. & Ward, L.S. (2002) The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**:1485-1488.
 28. Granja, F., Morari, J., Morari, E.C., Correa, L.A., Assumpção, L.A. & Ward, L.S. (2004) GST profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy. *Cancer Lett* **209**(2):129-137.
 29. Bufalo, N.E., Leite, J.L., Guilhen, A.C., Morari, E.C., Granja, F., Assumpção, L.V.M. & Ward, L.S. (2006) Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. *Endocr Relat Cancer*. **13**(4):1185-1193.
 30. Morari, E.C., Lima, A.B., Bufalo, N.E., Leite, J.L., Granja, F. & Ward, L.S. (2006) Role of glutathione-S-transferase and codon 72 of P53 genotypes in epithelial ovarian cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**(8):521-528.

31. Gilbertson, M.K., Haffner, G.D., Drouillard, K.G., Albert, A. & Dixon, B. (2003) Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. *Environ Toxicol Chem* **22**:101-110.
32. Nichenametla, S., South, E. & Exon, J. (2004) Interaction of conjugated linoleic acid, sphingomyelin, and butyrate on formation of colonic aberrant crypt foci and immune functions in rats. *J Toxicol Environ Health A* **67**:469-481.
33. Aune, T.M., Maas, K., Parker, J., Moore, J.H. & Olsen, N.J. (2004) Profiles of gene expression in human autoimmune disease. *Cell Biochem Biophys* **40**:81-96.
34. Kita, H., He, X.S. & Gershwin, M.E. (2004) Autoimmunity and environmental factors in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Ann Med* **36**:72-80.
35. Fourneau, J.M., Bach, J.M., van Endert, P.M. & Bach, J.F. (2004) The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases. *Molec Immuno* **40**:1095-1102.
36. Vestergaard, P. (2002) Smoking and thyroid disorders—a meta-analysis. *Eur J Endocrinol* **146**:153–161.
37. Cao, Z., Hardej, D., Trombetta, L.D. & Li, Y. (2003) The role of chemically induced glutathione and glutathione S-transferase in protecting against 4-hydroxy-2-nonenal-mediated cytotoxicity in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Toxicol* **3**:165-177.
38. Fenton, C.L., Patel, A., Tuttle, R.M. & Francis, G.L. (2000) Autoantibodies to p53 in sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Ann Clin Lab Sci* **30**(2):179-183.
39. Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra, A.C. 3rd, George, D.L. & Murphy, M. (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* **33**:357-365.
40. Wang, X.L. & Wang, J. (2005) Smoking-gene interaction and disease development: relevance to pancreatic cancer and atherosclerosis. *World J Surg* **29**(3):344-353

