

ROBERTO BERNARDO DOS SANTOS

**PERFIL GENÉTICO DE RISCO PARA
DOENÇA DE GRAVES E PARA A OFTALMOPATIA DE
GRAVES EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

CAMPINAS

Unicamp

2009

ROBERTO BERNARDO DOS SANTOS

**PERFIL GENÉTICO DE RISCO PARA
DOENÇA DE GRAVES E PARA A OFTALMOPATIA DE
GRAVES EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração Clínica Médica

Orientadora: Prof Dra. Laura Sterian Ward

CAMPINAS

Unicamp

2009

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa59p Santos, Roberto Bernardo dos
Perfil genético de risco para doença de Graves e para a oftalmopatia de Graves em uma população brasileira / Roberto Bernardo dos Santos. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

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

1. Doença de Graves. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Tabagismo. 4. Hipertireoidismo. 5. Bócio. 6. Oftalmopatia de Graves. I. Ward, Laura Sterian. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Genetic profile of risk to Graves' disease and Graves' ophthalmology in a brazilian population

Keywords: • Graves disease
• Polymorphism (Genetic)
• Smoking
• Hyperthyroidism
• Goiter
• Graves ophthalmopathy

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Profa. Dra. Keila Miriam Monteiro De Carvalho

Profa. Dra. Suemi Marui

Profa. Dra. Olga Maria Fernandes De Carvalho

Profa. Dra. Gláucia Maria Ferreira da Siva Mazeto

Data da defesa: 26-02-2009

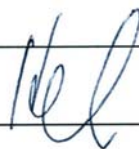
Banca examinadora da tese de Doutorado

Roberto Bernardo dos Santos

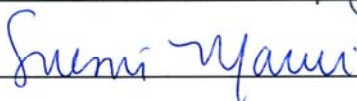
Orientador: Prof^a. Dr^a. Laura Sterian Ward

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Keila Miriam Monteiro De Carvalho



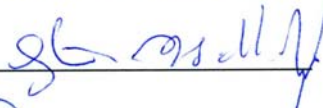
2. Prof^a. Dr^a. Suemi Marui



3. Prof^a. Dr^a. Olga Maria Fernandes De Carvalho



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



5. Prof^a. Dr^a. Laura Sterian Ward



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

Data: 26/02/2009

DEDICATÓRIA

*À minha esposa Mirian
pelo estímulo, carinho e dedicação,
me incentivando a prosseguir sempre.*

*Ao meu filho Lucas,
pelos momentos felizes que nos proporciona.*

*Aos meus pais Ivone e Euclides
que possibilitaram a realização dos meus sonhos.*

*A Deus
que é a Fonte da Infinita Sabedoria.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Laura Sterian Ward, pela dedicação científica, sabedoria e disposição em ajudar sempre.

Ao Prof. Dr. João Hamilton Romaldini, pelo entusiasmo à pesquisa, pelas oportunidades e a quem estimo como amigo.

À Profa. Dra. Fátima Regina Chaves, como mestra e amiga desde os tempos da graduação.

Aos colegas do Serviço de Endocrinologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Danilo, Mila, Ana Carolina, Silvia, Eliana, Valéria e Márcia e residentes Maíra, Juliana, Anabel, Juliana Barella, Francine e Geovana.

Aos colegas do laboratório de Genética Molecular do Câncer, Natássia, Elaine, Janaína, Ana Carolina, Marjorie, Mariele e Lucas por todo apoio recebido.

*Guarda a sabedoria e a reflexão,
não as perca de vista,
elas serão a vida de tua alma e
um adorno para teu pescoço.*

PROVÉRBIOS 3:21-22

A Doença de Graves é um processo imunológico em que a combinação de fatores genéticos e ambientais é fundamental. Vários genes têm sido propostos como envolvidos no desenvolvimento da doença, particularmente os genes do sistema HLA e os polimorfismos do gene CTLA-4. Com relação à Oftalmopatia de Graves, além dos fatores genéticos, o tabagismo é conhecido como um importante fator de seu desenvolvimento. Nós previamente demonstramos que a herança de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo e detoxificação de xenobióticos, além de genes relacionados a apoptose celular, como TP53, tem uma importante ação na suscetibilidade para essas doenças. Nosso objetivo foi determinar as relações entre o polimorfismo do gene CTLA-4 região promotora -318, CYP1A1m1, GSTP1 e 72TP53 e os riscos para Doença de Graves e Oftalmopatia de Graves. Avaliar a relação entre fatores clínicos (idade, sexo, etnia, tabagismo, tamanho do bócio), laboratoriais (TSH, T4livre, T3total, ANTITPO, antiTg, TRAb), de imagem (captação tiroidiana com tecnécio ou iodo131) e de tipo de tratamento (radioiodo, drogas antitiroideas e cirurgia) . Estudamos um total de 193 pacientes com Doença de Graves comparados com 200 indivíduos-controle, pareados por idade e etnia. A análise genética foi realizada através de PCR-RFLP em DNA extraído de sangue periférico. Confirmando nossos dados anteriores, as variantes dos genes GSTP1 ($p = 0,0007$) e CYP1A1m1 ($p < 0,0001$) eram mais frequentes em pacientes com Doença de Graves do que em controles, mas isso não ocorreu com o gene CTLA-4, região promotora -318 ($p = 0,12$) ou nas variantes 72TP53 ($p = 0,27$). Estudando o mesmo polimorfismo na Oftalmopatia de Graves, observamos que o genótipo CT do CTLA-4 região promotora -318 era mais frequente entre pacientes com oftalmopatia do que aqueles sem esse acometimento ($p = 0,005$). Constatamos que o gênero masculino ($p = 0,01$), o tabagismo ($p = 0,001$) e o bócio ($p = 0,01$) eram fatores de risco para o desenvolvimento da Oftalmopatia de Graves. A análise de regressão logística identificou o genótipo CT na região promotora posição -318 do gene CTLA-4 ($p=0,04$; OR=4,13, 95% IC=1,01-16,8) e o sexo masculino ($p=0,01$; OR=7,59, IC=1,55-37,23) como fatores de risco para o desenvolvimento de oftalmopatia.

Concluimos que os polimorfismos dos genes GSTP1 e CYP1A1m1, mas não da região promotora do gene CTLA-4 posição -318, estão relacionados à suscetibilidade a Doença de Graves na população brasileira investigada. Foram fatores importantes no desenvolvimento da Oftalmopatia de Graves: polimorfismo do gene CTLA-4 região promotora posição -318 sexo masculino, tabagismo e tamanho do bócio.

Graves' disease is an immunologic process in which the combination of environmental and genetic factors is fundamental. Various genes have been proposed as involved in the development of the disease, particularly HLA system genes and the polymorphisms of CTLA-4 gene. Concerning Graves' ophthalmopathy, besides the genetic factor, smoking is a well accepted factor of its development. We previously demonstrated that the inheritance of polymorphisms in genes related to the metabolism and detoxification of xenobiotics, such as CYP1A1 and GSTP1 genes, besides the genes related to cellular apoptosis, such as TP53, have an important role in the susceptibility to these diseases. Our objective was to determine the relationship among CTLA-4 gene and CYP1A1m1, GSTM1, GSTP1 and 72TP53 genes in the risk for Graves' disease. We studied a total 193 Graves' disease patients compared to 200 control individuals, matched for age and ethnicity. The genetic analysis was done with the use of PCR-RFLP in DNA extracted from peripheral blood. Reinforcing our previous data, GSTP1 ($p=0.0007$) and CYP1A1m1 ($p<0.0001$) variants were more frequent among Graves' disease patients than in controls, but this did not happen to CTLA-4 position 318 ($p=0.12$) or to TP53 variants ($p=0.27$). Studying the same polymorphisms in Graves' ophthalmopathy, we observed that the CT genotype of CTLA-4 position 318 was more frequent among patients with than in patients without ophthalmopathy ($p=0.005$). We found male gender ($p=0.01$), smoking ($p=0.001$) and goiter ($p=0.01$) to be factors of risk to the development of Graves' ophthalmopathy. The logistic regression analysis identified CTLA-4 position 318 CT genotype ($p=0.04$; OR=4.13, 95% IC=1.01-16.8) and male gender ($p=0.01$; OR=7.59, IC=1.55-37.23) as factors of risk to the development of ophthalmopathy. We concluded that the polymorphisms of GSTP1 and CYP1A1, but not of the promoter region of CTLA4, are related to the susceptibility of Graves' disease in the Brazilian population investigated while CTLA-4, male, smoking and the size of the goiter were important in the development of Graves' ophthalmopathy.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcTg	Anticorpo antitireoglobulina
AcTPO	Anticorpo antitireoperoxidase
Arg	Aminoácido arginina
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte associated factor 4
CYP	Citocromo P450
CYP1A1	Citocromo P4501A1
DG	Doença de Graves
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GEMOCA	Laboratório de genética molecular do câncer
GST	Sistema Glutathione S-transferase
GSTP1	Glutathione S-transferase Pi 1
HAPs	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HAPMAP	Mapa haplótico
HT	Hormônios tireoidianos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
Ile	Aminoácido isoleucina
¹³¹I	Iodo radioativo 131
Ladder	Marcador de peso molecular
MASC.	Masculino

MgCl	Cloreto de magnésio
MHC	Major histocompatibility complex
μCi	MicroCurie
OG	Oftalmopatia de Graves
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pro	Aminoácido prolina
RAI	Radioiodo
RFLP	Restrição do polimorfismo pelo tamanho do fragmento
SNPs	Polimorfismos nucleotídicos individuais
TAB.	Tabagismo
TCR	Receptor do antígeno do linfócito T
^{99m}Tc	Tecnécio
T3	Triiodotironina
T4L	Tiroxina livre
TP53	Gene TP53
TRAb	Anticorpo contra receptor do TSH
TSH	Hormônio tiroestimulante
Va	Aminoácido valina

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Associação entre gene CTLA-4 exon 1 e DG em diferentes estudos tipo caso-controle.....	22
Tabela 2 Associação da DG com o gene CTLA-4 região promotora posição -318 em diferentes estudos.....	23
Tabela 3 Estudos do exon 1 do gene CTLA-4 e sua associação com OG.....	26
Tabela 4 Características demográficas dos pacientes com DG e indivíduos-controles.....	50
Tabela 5 Distribuição dos genótipos da região promotora posição – 318 do gene CTLA-4 em pacientes com DG e indivíduos controle.....	51
Tabela 6 Distribuição dos genótipos de CYP1A1m1 em pacientes com DG e indivíduos-controle.....	51
Tabela 7 Distribuição dos genótipos de GSTP1 em pacientes com DG e indivíduos-controle.....	52
Tabela 8 Distribuição dos genótipos de 72TP53 em pacientes com DG e indivíduos-controle.....	52
Tabela 9 Distribuição dos genótipos da região promotora posição – 318 do gene CTLA-4 em pacientes com OG presente e ausente.....	53
Tabela 10 Distribuição dos genótipos de CYP1A1m1 em pacientes com OG presente e ausente.....	53
Tabela 11 Distribuição dos genótipos de GSTP1 em pacientes com OG presente e ausente.....	54
Tabela 12 Distribuição dos genótipos de 72TP53 em pacientes com OG presente e ausente.....	54

Tabela 13	Comparação entre as características clínicas e laboratoriais dos grupos de pacientes com presença de OG (OG-classes 2 e ≥ 3) e ausência de oftalmopatia.....	55
Tabela 14	Comparação entre as características clínicas e laboratoriais dos grupos de pacientes com presença de OG (OG- classe 2) e ausência de oftalmopatia.....	56
Tabela 15	Comparação entre as características clínicas e laboratoriais dos grupos de pacientes com presença de OG (OG-classes ≥ 3) e ausência de oftalmopatia.....	57
Tabela 16	Regressão logística multivariada analisando os fatores que influenciam no risco para desenvolvimento da OG.....	58

	Pág.
Figura 1 Esquema simplificado dos principais passos envolvidos na reação auto-imune da OG.....	25
Figura 2 Resultado obtido com a restrição enzimática de fragmento amplificado por PCR do gene CTLA-4 região promotora -318 em gel de agarose.....	43
Figura 3 Resultado obtido com a restrição enzimática de fragmento amplificado por PCR do gene CYP1A1m1 em gel de agarose.....	44
Figura 4 Resultado obtido com a restrição enzimática de fragmento amplificado por PCR do gene GSTP1 em gel de agarose.....	46
Figura 5 Resultado obtido com a restrição enzimática de fragmento amplificado por PCR do gene TP53 códon 72 em gel de agarose.....	47

	Pág
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1- INTRODUÇÃO.....	17
1.1- A doença de Graves.....	18
1.2- Genética na doença de Graves.....	18
1.3- Alelos do sistema HLA.....	19
1.4- O conceito de polimorfismo genético.....	19
1.5- O gene CTLA-4 e seus polimorfismos.....	20
1.6- A oftalmopatia de Graves.....	23
1.7- Influências do meio ambiente.....	27
1.8- Metabolização de xenobióticos.....	27
1.9- Citocromo P-450.....	28
1.10- CYP1A1.....	29
1.11- Sistema Glutathione S-Transferase.....	30
1.12- Polimorfismo do gene GSTP1.....	31
1.13- Polimorfismo do gene TP53.....	32
1.14- Polimorfismo do códon 72.....	33
2- OBJETIVOS.....	34
3- METODOLOGIA.....	36
3.1- Pacientes com doença de Graves.....	37
3.2- Avaliação da oftalmopatia.....	37

3.3- Controles.....	40
3.4- Métodos: dosagens hormonais, anticorpos e imagens.....	40
3.5- Extração de DNA.....	41
3.6- Análise do polimorfismo do gene CTLA-4 região promotora -318.....	41
3.7- Análise do polimorfismo do gene CYP1A1m1.....	43
3.8- Análise do polimorfismo do gene GSTP1.....	45
3.9- Identificação dos genótipos do gene TP53 códon 72.....	46
3.10- Análise Estatística.....	47
4- RESULTADOS.....	49
5- DISCUSSÃO.....	59
6- CONCLUSÃO.....	66
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1- INTRODUÇÃO

1.1- A doença de Graves

A doença de Graves (DG) é uma das mais comuns doenças auto-imunes humanas, com prevalência na população dos Estados Unidos de aproximadamente 1% (Hollowell *et al.*, 2002). Caracteriza-se pela presença de bócio difuso, sinais e sintomas de hipertireoidismo, podendo ocorrer manifestações extratiroidianas, como oftalmopatia, mixedema pré-tibial e acropatia. Acomete principalmente o sexo feminino, numa frequência de 3-10 mulheres para cada homem, com maior incidência na faixa etária de 30-50 anos. Sua patogênese envolve uma sequência de eventos baseados na suscetibilidade genética e desencadeados por fatores ambientais. Isto resulta em ativação e infiltração de linfócitos T na glândula tireóide, que estimulam os linfócitos B a secretarem anticorpos contra o receptor de TSH. Estes anticorpos induzem a proliferação das células foliculares tiroidianas e aumento da produção de hormônios, resultando em bócio e hipertireoidismo (Weetman, 2003).

1.2- Genética na doença de Graves

Apesar de a exata etiologia da auto-imunidade tiroideana não ser completamente conhecida, existem sólidas evidências de influência genética, associada à suscetibilidade a fatores ambientais no desenvolvimento da DG. Destacam-se entre eles: fatores biológicos, como infecções por vírus ou bactérias; uso de determinadas drogas como interferon e amiodarona; estresse, aumento na ingestão de iodo e tabagismo (Wick *et al.*, 1993; Rekha *et al.*, 2006; Piga *et al.*, 2008; Matos-Santos *et al.*, 2001; Roti e Uberti, 2001; Bufalo *et al.*, 2008).

Diversos genes são candidatos diretamente no desenvolvimento desta doença. Entre eles destacam-se: sistema HLA, CTLA-4, CD40, proteína tirosina fosfatase-22 (PTPN 22), do receptor do TSH (TSH-R) e do gene da tiroglobulina (Jacobson e Tomer, 2007).

Os genes do sistema HLA e CTLA-4 são os mais estudados na suscetibilidade genética à DG.

1.3- Alelos do Sistema HLA

O Complexo de Histocompatibilidade Principal ou Major Histocompatibility Complex (MHC) que contém os genes Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) está localizado no cromossomo 6p21. Bech *et al.* (1977) foram os primeiros autores a mostrar a associação entre DG e os alelos MHC classe I identificando maior frequência do HLA-B8 em pacientes com DG. Contudo, essa associação foi significativamente mais encontrada no alelo HLA-DR3, pertencente ao MHC classe II, sobretudo em caucasianos, mostrando um risco relativo entre 1,5 e 3,5 (Farid *et al.*, 1988). Um estudo da população brasileira mostrou que os alelos HLA-DRB1*0301 e HLA-DQA1*0501 estavam significativamente aumentados em pacientes quando comparados com controles, conferindo um risco relativo de 2,8 e 3,74 respectivamente. Entretanto, o alelo HLA-DQB1*0602 foi significativamente menor nos pacientes em relação aos controles, conferindo um risco relativo de 0,18, ou seja, proteção contra o desenvolvimento de doença (Maciel *et al.*, 2001). O locus HLA-DRB1 foi recentemente sequenciado em população de pacientes com DG e controles. Observou-se que a arginina na posição 74 da cadeia HLA-DRBeta1 confere ação central e específica na apresentação do auto-antígeno pelo HLA-DR aos linfócitos T (Hodge *et al.*, 2006).

1.4- O conceito de polimorfismo genético

A sequência de DNA na mesma região de um cromossomo é extraordinariamente semelhante entre os cromossomos de diferentes indivíduos ao redor do mundo. Um segmento de DNA humano escolhido ao acaso, com cerca de 1.000 pares de base de comprimento, contém, em média, apenas um par de bases que varia entre os dois cromossomos homólogos herdados dos pais. Quando uma variante é tão comum a ponto de ser encontrada em mais de 1% dos cromossomos na população geral, esta variante constitui o que é conhecido como polimorfismo genético. Muitas variantes raras parecem não ter efeitos deletérios, enquanto algumas variantes bastante comuns são conhecidas por predispor a sérias doenças (Wang *et al.*, 1998; Nussbaum *et al.*, 2008).

Os polimorfismos são elementos-chave na pesquisa e na prática de genética humana. Eles são a base para esforços contínuos a fim de fornecer cuidados médicos personalizados. O diagnóstico e o tratamento de acordo com as variantes polimórficas, que aumentam ou diminuem o risco para doenças comuns na fase adulta, podem servir de base para diagnóstico, prevenção ou mesmo terapêutica, influenciando na eficácia ou segurança de medicações específicas (Jones *et al.*, 2007).

Os mais simples e mais comuns de todos os polimorfismos são os polimorfismos nucleotídicos individuais (SNPs). Os SNPs normalmente têm apenas dois alelos, correspondendo a duas diferentes bases que ocupam uma mesma localização em particular do genoma. Os SNPs são comuns e ocorrem em média uma vez a cada 1.000 pares de bases, o que significa que há uma média de 3.000.000 de alelos diferentes entre dois genomas humanos. O fato de que os SNPs são comuns não significa que eles devam ser neutros e sem efeitos sobre a saúde ou longevidade. O significado para a saúde da grande maioria de SNPs é objeto de pesquisa ativa.

Um subgrupo de aproximadamente 10% dos mais frequentes SNPs foi escolhido para servir como marcador para um mapa de alta densidade do genoma humano, conhecido como mapa haplótico (HapMap) (The International HapMap Consortium, 2005).

1.5- O gene CTLA-4 e seus polimorfismos

O gene CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte associated factor 4) está localizado no cromossomo 2q33, que é composto por 4 exons e 3 íntrons (Dariavach *et al.*, 1988). As moléculas CTLA-4 e CD28 (outra molécula co-estimulatória expressa na superfície dos linfócitos T ativados e não-ativados) possuem importante papel na resposta do linfócito T durante apresentação do antígeno. A ativação dos linfócitos T é iniciada quando o receptor de antígeno do linfócito T (TCR-Complexo CD3) se acopla ao antígeno, que está ligado a uma molécula MHC classe II na superfície da célula apresentadora de antígeno. Contudo, para que haja uma completa ativação, levando a uma proliferação do linfócito T e produção de interleucinas, um segundo sinal é necessário. Na ausência de um sinal co-estimulatório

positivo, a ligação do antígeno com o receptor no linfócito T é inefetiva, levando-o a ser refratário (anergia) ou induzindo a apoptose celular. Esse sinal co-estimulatório positivo é fornecido principalmente pela interação de CD28 com seus ligantes, B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) na célula apresentadora de antígeno. O CTLA-4 também se une aos mesmos B7 ligantes (CD80 e CD86), porém, em contraste com CD28, ele emite sinais inibitórios para a ativação do linfócito T e possui afinidade muito maior por moléculas B7 do que o CD28. No estado quiescente, a maioria do CTLA-4 é estocada em vesículas intracelulares. Quando há ativação do linfócito T, essas vesículas são rapidamente mobilizadas para a superfície celular, permitindo a expressão do CTLA-4 e levando à competição com o CD28 pelos sítios de ligação B7 (Vaidya *et al.*, 2004).

Várias doenças auto-imunes estão relacionadas com esse gene. Entre elas destacam-se: tireoidite crônica auto-imune, Diabetes Mellitus tipo 1, doença de Addison, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistêmico e *miastenia gravis* (Jacobson e Tommer, 2007).

Em seus estudos, Yanagawa *et al.* (1995) investigaram associação de DG com um alelo de polimorfismo microssatélite, CTLA-4(AT)n dentro do gene CTLA-4, resultando num Odds Ratio (OR), isto é, numa chance de 2-2,5 vezes maior de ocorrer DG nos portadores do CTLA-4 (AT). Entre os principais polimorfismos estudados nessa doença, destacam-se: polimorfismo C/T na posição -318 da região promotora (C/T318); um dimorfismo A/G na posição 49 do exon 1, levando uma substituição alanina/treonina no códon 17 do peptídeo principal (rs231775), região microssatélite (AT)n 3UTR na posição 642 do exon 4; polimorfismo CT60 A>G na posição +6230 (rs3087243) e JO 27-1, JO30 e JO31 (Braun *et al.*, 1998; Kouki *et al.*, 2002; Vaidya *et al.*, 2003; Ueda *et al.*, 2003).

A forma como o CTLA-4 inibe a ativação do linfócito T não é completamente conhecida, entretanto alguns mecanismos têm sido propostos. O polimorfismo do exon 1 A/G 49 parece causar uma perda do processamento do CTLA-4 no retículo endoplasmático, resultando em uma glicosilação menos eficiente e diminuição da expressão dessa molécula na superfície celular (Anjos *et al.*, 2002).

Estudos do tipo caso-controle de diferentes populações têm mostrado uma associação entre o gene CTLA-4 exon 1 e a DG, com um risco relativo próximo de 2,0 na tabela abaixo.

Tabela 1- Associação entre o gene CTLA-4 exon 1 e doença de Graves em diferentes estudos tipo caso-controle

Autor	População	Casos-Controle (N)	OR	P
Donner <i>et al.</i> (1997)	Branços (Canadá)	305/325	1,6	0,002
Yanagawa <i>et al.</i> (1997)	Japoneses	153/200	1,6	0,01
Heward <i>et al.</i> (1999)	Branços (UK)	379/363	1,6	0,0002
Buzzetti <i>et al.</i> (1999)	Branços (Itália)	92/244	1,8	0,049
Park <i>et al.</i> (2000)	Coreanos	97/199	1,6	0,034
Chistiakov <i>et al.</i> (2000)	Russos	78/93	3,2	0,001
Villanueva <i>et al.</i> (2000)	Branços	137/121	1,6	0,007
Allahabadia <i>et al.</i> (2001)	Branços (UK)	484/424	1,8	0,0001
Cury <i>et al.</i> (2008)	Branços (Brasil)	44 (crianças) 72 (adultos)	----	0,1

Já a associação da DG com o polimorfismo do gene CTLA-4 região promotora -318 tem sido menos evidente, como mostra a tabela a seguir.

Tabela 2- Associação da DG com o gene CTLA-4 região promotora -318 em diferentes estudos

Autor	População	Casos-Controle (N)	OR	P
Braun <i>et al.</i> (1998)	Branços	125/123	2,2	0,006
Heward <i>et al.</i> (1999)	Branços	188/355	NS	NS
	Chineses	98/82	NS	NS
Park <i>et al.</i> (2000)	Coreanos	97/199	2,1	0,015
Kouki <i>et al.</i> (2002)	Branços	120/180	NS	NS
Vaidya <i>et al.</i> (2003)	Branços	292/290	NS	NS

1.6- A oftalmopatia de Graves

A oftalmopatia de Graves (OG), a mais frequente manifestação extratiroideiana da DG, ocorre de uma forma clinicamente evidente em aproximadamente 50% dos pacientes com tirotoxicose, e em 5% desses casos há uma manifestação severa (Wiersinga *et al.*, 2002). Quando algum método de imagem, como tomografia computadorizada, é utilizado nessa avaliação, aproximadamente 70% dos pacientes estudados apresentam um aumento da musculatura extraocular, do tecido conectivo retrobulbar ou de ambos (Forbes G., et al 1986).

Entre os pacientes com OG, a grande maioria apresenta DG (90%); 5% apresentam-se em eutiroidismo e os restantes 5%, com tiroidite de Hashimoto (Marcocci *et al.*, 1989).

Apesar de o sexo feminino ser mais acometido pela doença oftálmica, por haver maior prevalência da DG entre as mulheres, os homens, sobretudo aqueles com idade superior a 50 anos, têm maior risco de serem acometidos (Burch *et al.*, 1993). Uma questão ainda controversa é se a terapêutica com radioiodo para tratamento do hipertireoidismo da DG possa ser um fator de risco no desenvolvimento ou piora da OG (Cawood *et al.*, 2004).

As manifestações clínicas da OG originam-se de uma combinação de aumento do volume da musculatura extraocular e/ou da gordura dentro do espaço orbitário. Histologicamente, a musculatura retro-ocular mostra-se com edema, infiltração linfocítica, deposição de glicosaminoglicans e fibrose (Khoo *et al.*, 2007).

Um modelo corrente de explicação para a OG pode ser demonstrado pela ativação dos fibroblastos orbitais por auto-anticorpos. Eles podem ser específicos para antígenos como o receptor do TSH ou receptor de IGF-1. Os fibroblastos orbitais ativados liberam interleucinas, incluindo IL-16 e RANTES, que atraem os linfócitos T para a órbita. Esses linfócitos, que interagem com fibroblastos, ativam-se reciprocamente, promovendo a produção de interleucinas (IFN γ , PGD2 e 15d-PGJ2) e secreção de fatores ativadores de linfócitos T pelos fibroblastos (IL-1 α , IL-8 e produtos de atividade COX-2). Os fibroblastos são também estimulados a secretar IL-6, o que leva a diferenciação do linfócito B. A interação dos fibroblastos com os linfócitos T resulta na deposição de moléculas de matriz extracelular, proliferação de fibroblastos e diferenciação (Lehmann *et al.*, 2007).

Estudos clínicos têm demonstrado uma maior prevalência da OG em pacientes com valores elevados do TRAb (anticorpo contra o receptor do TSH). Dessa forma, tecidos orbitários de pacientes com OG ativa têm valores significativamente maiores de expressão do TSH-R comparados com pacientes que apresentam a doença inativa (Wakelkamp *et al.*, 2003).

Na população brasileira, Akaishi *et al.* (2007) estudaram a frequência de alelos HLA-DRB1 e DQB1 em pacientes com OG (divididos em oftalmopatia na forma miogênica e não-miogênica) comparados com controles (indivíduos normais, sem DG). Os resultados encontrados foram o aumento da frequência dos alelos HLA-DRB1*16 ($p=0,008$) na forma miogênica e HLA-DRB1*03 ($p=0,02$) na forma não-miogênica, quando comparados com o grupo controle.

Os principais polimorfismos do gene CTLA-4 estudados na OG são do exon 1 (A49G) e da região promotora na posição -318. Os resultados têm sido controversos. Embora um dos primeiros estudos avaliando o exon 1, realizado em população da Grã-Bretanha e confirmado mais recentemente em um novo estudo, tenha mostrado um risco aumentado para OG (independentemente de sexo, tabagismo ou tratamento com radioiodoterapia), isso não foi evidenciado em populações de japoneses e poloneses (Vaidya *et al.*, 2003; Bednarczuk *et al.*, 2003). A Tabela 3 a seguir demonstra os estudos do exon 1 do gene CTLA-4 e sua associação com OG.

Tabela 3- Estudos do exon 1 do gene CTLA-4 e sua associação com OG

Autor	País	Doença (anos)	Masc. (%)	Tab. (%)	RAI (%)	OFT./D.G (n)	OR	P	P.C.
Han <i>et al.</i> (2006)	China	3,1±4	29,6	22	63	142/119	0,9	NS	0,5
Bednarczuk <i>et al.</i> (2003)	Japão	4,9±5,6	22	30	5	99/220	0,6	NS	0,2
Bednarczuk <i>et al.</i> (2003)	Polônia	4,9±5,6	24	54	31	95/169	1,0	NS	0,7
Vaidya <i>et al.</i> (1999)	UK	9,4±1,2	29,8	72	43	94/94	2,4	0,01	0,7
Allahabadia <i>et al.</i> (2001)	UK	-	14,2	52	-	161/323	0,7	NS	0,9
Villanueva <i>et al.</i> (2000)	USA	-	23	59	67	85/52	1,0	NS	0,5

Com relação à região promotora posição -318 do gene CTLA-4, não foi encontrada associação com OG em população de ingleses (Vaidya *et al.*, 2003), mas sim em chineses e coreanos (Zhang *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2000).

1.7- Influências do meio ambiente

A base bioquímica da suscetibilidade genética a riscos ambientais ou toxinas endogenamente produzidas está relacionada a polimorfismos genéticos que normalmente ocorrem na população geral. Envolve uma série de genes: genes implicados na predisposição a uma doença específica, na ativação metabólica ou detoxificação de genotoxinas ambientais, e em controle de reparo do DNA ou dano celular (Miller *et al.*, 2001).

Entre os marcadores de suscetibilidade mais comuns, estão as diferenças genéticas na capacidade de as células repararem lesões no DNA causadas por agentes ambientais (Spitz *et al.*, 1993; Kaderlik e Kadlubar, 1995). Outro tipo de biomarcador de suscetibilidade baseia-se no fato de que muitos compostos não são capazes de provocar, por si, efeitos prejudiciais, mas podem fazê-lo quando alterados por enzimas cujas modificações aumentam ou diminuem a habilidade de essas substâncias interagirem com as biomoléculas informacionais (Guengerich, 2000).

1.8- Metabolização de xenobióticos

A maioria dos agentes xenobióticos, isto é, substâncias diferentes daquelas existentes em nosso próprio organismo, modificadores de estruturas orgânicas, requerem ativação metabólica antes de se ligarem ao DNA, ao RNA e às proteínas. Por isso, as variações nos processos de ativação e detoxificação de compostos químicos e drogas desempenham um importante papel na toxicidade ambiental (Bartsch, 1996). Assim, distúrbios no equilíbrio desses processos podem explicar a variabilidade na resposta individual à exposição a tais compostos (Anwar *et al.*, 1996).

A metabolização dos xenobióticos ocorre graças a dois principais tipos de enzimas: as de metabolização mediadas pelas oxidases de função mista ou de fase I, e as enzimas de conjugação – ou de fase II. Muitos compostos, tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), as nitrosaminas e várias drogas medicamentosas, são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas

da fase I, que são principalmente enzimas da família do citocromo P-450 (CYPs) (Bois *et al.*, 1995). Assim, com a introdução de um ou mais grupamentos hidroxila ao substrato, um pró-carcinógeno ou uma substância pró-tóxica pode tornar-se tóxica, como o benzo[a]pireno que é convertido em epóxido de benzo[a]pireno, composto altamente reativo (Bois *et al.*, 1995).

Já as reações da fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) por meio das glutathiona-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos mais hidrofílicos e, portanto, passíveis de excreção (Kroemer *et al.*, 1995).

Dessa forma, a regulação e a expressão das enzimas de fases I e II e seu equilíbrio metabólico na célula podem ser importantes fatores na determinação da suscetibilidade relacionada à exposição a agentes tóxicos (Vineis, 2002).

1.9- Citocromo P-450

A família dos genes do citocromo P-450 representa uma das principais classes de enzimas de biotransformação da fase I, através de suas mais de 500 isoenzimas (Lange e Pelkonen, 1999). Elas participam tanto da biossíntese quanto da degradação de esteróides, vitaminas, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, ferormônios e metabólitos vegetais (Wolf, 1986). Metabolizam, ainda, inúmeras drogas e carcinógenos químicos entre outros poluentes ambientais (Guengerich, 2000).

Os xenobióticos, que incluem cerca de 250.000 compostos, são todos substratos potenciais para as enzimas P-450, induzindo-as ou inibindo-as (Guengerich, 2000).

Tais reações ocorrem principalmente no fígado, podendo ocorrer também por todo o organismo incluindo intestino, pulmão e rim (Rogers, 1994).

As CYPs podem também catalisar diferentes reações oxidativas, como metabolizar xenobióticos lipofílicos (Lin e Lu, 1998).

Essas enzimas são encontradas em animais, plantas, leveduras, bactérias e mamíferos. Todos esses genes evoluíram a partir de um ancestral comum, em torno de 2,5 bilhões de anos atrás, e o mecanismo que contribuiu para tal divergência foi, provavelmente, a interação entre plantas e animais (Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999).

Estima-se que no genoma humano existam em torno de 60 a 100 genes decodificadores de enzimas P-450, e cerca de 20 deles estão envolvidos na codificação de enzimas que metabolizam compostos exógenos (Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999).

Os polimorfismos de P-450 e a suscetibilidade ao câncer podem estar associados, ainda, ao fato de essas isoenzimas participarem também da transformação de compostos endógenos relevantes durante os processos de diferenciação da célula transformada até o estágio maligno (Rannug *et al.*, 1995).

1.10- CYP1A1

O gene CYP1A1, localizado no cromossomo 15, na região 15q22-q24, codifica a enzima P4501A1, uma isoenzima de P450 que catalisa a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) em produtos fenólicos e epóxidos (Gonzales, 1990).

A indução de CYP1A1 ocorre via ligação do composto indutor ao receptor de “aryl hidrocarbon” (Ah), que ativa a transcrição na metabolização de xenobióticos (Kawajiri *et al.*, 1993). A bioativação de vários HAPs é iniciada com estimulação do receptor Ah e este, por sua vez, ativa a transcrição da CYP1A1, epóxido hidrolase e outras enzimas (Hirvonen, 1995). Além dos HAPs, a CYP1A1 é também induzida por xenobióticos encontrados em plantas da família das crucíferas (repolho e brócolis), tais como flavonas (McDonnell *et al.*, 1992).

A atividade catalítica e o modo de indução de CYP1A1 parecem ser altamente conservados em animais superiores, confirmando sua importante função fisiológica. O padrão de atividade e capacidade indutora desta enzima em humanos, relacionado à formação de metabólitos de HAPs capazes de reagir com a molécula de DNA, é de grande

importância para a estimativa do risco de desenvolvimento do câncer e também de várias doenças relacionadas ao metabolismo e à ação de toxinas existentes no fumo e na poluição ambiental. A enzima CYP1A1 é considerada primariamente uma enzima extra-hepática em humanos, sendo induzida no pulmão, linfócitos e placenta após exposição aos HAPs, incluindo aqueles presentes na fumaça do cigarro (Anttilla *et al.*, 1991).

Pelo uso da enzima de restrição MspI, detectou-se um polimorfismo originado pela mutação T6235→C, resultando no alelo polimórfico denominado CYP1A1 m1. As frequências desse polimorfismo mostraram extensa variação étnica, observaram-se valores de 31% a 12% entre japoneses e populações caucasoides, respectivamente (Nebert *et al.*, 1996).

Uma segunda mutação de ponto (A4889→G) é responsável por outro polimorfismo no éxon 7 de CYP1A1, originando o alelo polimórfico CYP1A1 m2 (Hayashi *et al.*, 1991).

Os alelos CYP1A1 m1 e CYP1A1 m2 foram correlacionados a um aumento na suscetibilidade ao câncer de pulmão em populações japonesas (Nakachi *et al.*, 1995), porém tal associação não foi verificada em populações caucasoides ou afro-americanas (Shields *et al.*, 1994). Em trabalhos anteriores, nosso grupo relacionou os polimorfismos de CYP1A1 m1 e de CYP1A1 m2 com o risco para câncer da tireóide e também com o risco para desenvolvimento da DG na população brasileira (Bufalo *et al.*, 2006 e 2008).

1.11- Sistema Glutathione S-transferase

Glutathione S-transferase (GSTs) é uma família de genes importantes na detoxificação de diferentes xenobióticos e compostos endógenos. Esses genes possuem um papel importante no metabolismo celular e na modificação de compostos eletrofílicos reativos. Codificam enzimas de fase II envolvidas na biotransformação, que é caracterizada pela conjugação de compostos insolúveis em água ou de substratos lipofílicos. As GSTs catalisam reações que eliminam uma série de pré-carcinógenos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na fumaça do cigarro; drogas farmacológicas, incluindo

paracetamol; agentes quimioterápicos e radicais livres gerados durante estresse oxidativo (Strange *et al.*, 2001; Thier *et al.*, 2003).

Estima-se que existam, pelo menos, 20 GSTs na espécie humana, estando presentes na maioria dos organismos vivos como bactérias, leveduras, plantas e fungos (Buetler e Eaton, 1992). Sua ação baseia-se na conjugação com a glutathione, que, além de diminuir a reatividade, aumenta a solubilidade dos xenobióticos hidrofóbicos, reduzindo, portanto, a meia-vida desses compostos no organismo. Desse modo, o conjugado é transportado para fora da célula por uma bomba de fluxo de glutathione S- transferase ATP- dependente e, a seguir, é eliminado pela urina e bile (Hayes e Pulford, 1995).

Encontramos as GSTs em maior quantidade no fígado e em menores concentrações nos pulmões e intestino delgado (Shields *et al.*, 1994).

As GSTs são bem caracterizadas, por serem polimórficas e sua frequência depender da etnia (Bailey *et al.*, 1998).

1.12- Polimorfismo do gene GSTP1

Os polimorfismos do gene GSTP1 são bastante estudados por estarem associados com diferentes tipos de câncer, particularmente os causados por cigarro (Strange e Fryer, 2001). O gene GSTP1 possui um polimorfismo envolvendo a troca do aminoácido isoleucina por valina no éxon 5 (I105V). Essa troca produz as variantes em homozigose Ile/Ile e Val/Val e a variante em heterozigose Ile/Val. As variantes Ile/Val e Val/Val possuem estabilidade e atividade específica menor do que as enzimas que contêm a isoforma Ile/Ile (Ali - Osmam *et al.*, 1997). Assim, essa variante enzimática possui menor capacidade de detoxificação dos carcinógenos e de substâncias tóxicas quando comparados com a enzima codificada pelo gene de tipo selvagem, denominado Ile/Ile (Johansson *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1997). Ao contrário, a hiperexpressão de GSTP1 causa resistência a diversas drogas antineoplásicas e a presença do polimorfismo do locus desse gene pode diminuir a eficácia terapêutica de quimioterápicos como clorambucil e ciclofosfamida (Henderson *et al.*, 1998).

A expressão do gene GSTP1 também se associa ao desenvolvimento de uma série extensa de neoplasias, particularmente relacionadas ao tabagismo, incluindo tumores de cabeça e pescoço, mama, pulmão e próstata (Stucker *et al.*, 2002; Oude *et al.*, 2003). Nosso grupo demonstrou sua associação com o câncer de tiróide e também estudou sua relação com a DG (Bufalo *et al.*, 2006 e 2008).

1.13- Polimorfismo do gene TP53

O gene TP53 está localizado no cromossomo 17, na posição p13.1, e codifica a proteína p53 que é uma fosfoproteína nuclear com papel fundamental na regulação do ciclo celular, principalmente na transição de G0 para G1. Essa proteína é encontrada em níveis muito baixos nas células normais, porém em células modificadas é expresso em grandes quantidades e acredita-se que contribua para a malignização (Fridman e Lowe, 2003).

A proteína p53 foi descoberta em 1979, e inicialmente pensou-se que era codificada por um oncogene, mas na verdade tratava-se da proteína produzida pelo gene TP53 mutado (Linzer e Levine, 1979).

O TP53 passou a ser considerado um gene supressor de tumores a partir de 1989, quando se demonstrou que o tipo selvagem de TP53 era capaz de inibir a transformação maligna de células e o crescimento de linhagens defeituosas através de sua proteína normal (Finlay *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1990). É considerado o mais importante gene supressor de tumores nos seres humanos. Cerca de metade das neoplasias malignas apresenta mutações no TP53 (Hollstein *et al.*, 1994). Além de controlar a parada do ciclo celular, a p53 evita a passagem de características que são responsáveis pelas vantagens de crescimento e proliferação de células filhas: a via apoptótica (Attardi *et al.*, 2005). A apoptose previne a geração do tumor e regula a maturação e o controle da resposta auto-imune dos linfócitos T e B que são os componentes básicos de doenças auto-imunes da glândula tiróide (Lowe *et al.*, 1993).

O gene TP53 é composto de 11 exons que combinados produzem 2,2 a 2,5 kb de RNA mensageiro. As alterações mais frequentes são as mutações por alteração na sequência das bases, resultando numa proteína defeituosa (DeWolf, 1995). A proteína

normal do TP53 contém 393 aminoácidos. Sua concentração celular é baixa, pois ela possui meia-vida de 20 minutos. Boa parte da proteína está sob forma latente, necessitando de mecanismos para sua ativação, como hipóxia, dano ao DNA e baixas concentrações de trifosfato de ribonuclease (Levine, 1997; Guidos *et al.*, 1996).

1.14- Polimorfismo do códon 72

As características estruturais do gene TP53 (códon 61-94) têm sido bem preservadas por toda evolução. No códon 72, no entanto, foi reconhecido um polimorfismo de substituição do aminoácido arginina (Arg) pelo de prolina (Pro). Uma simples troca de base (de CGC para CCC) é responsável por tal mudança (Ara *et al.*, 1990).

Tem-se atribuído ao polimorfismo do códon 72 um papel de vulnerabilidade a diferentes carcinógenos. O genótipo Pro/Pro possui até 15 vezes menos chance de provocar apoptose quando comparado ao Arg/Arg (Dumont *et al.*, 2003).

Wang *et al.* (1999) mostraram que pacientes com câncer de pulmão e genótipo Pro/Pro tendem a ter pior prognóstico do que indivíduos Arg/Pro. Estudos realizados no nosso laboratório mostraram que indivíduos com genótipo Pro/Pro têm uma maior chance de desenvolver câncer de tiróide (Granja *et al.*, 2004).

Estudos mostram também a associação do gene 72TP53 a algumas doenças auto-imunes inclusive lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide (Lee *et al.*, 2001 e 2005).

Os fatores étnico e geográfico têm uma forte influência na modulação de risco a certos tipos de doenças auto-imunes, independentemente do marcador molecular a ser estudado.

Considerando-se a alta miscigenação da população brasileira, que diminui o impacto da etnia no estudo dos polimorfismos genéticos, supõe-se que a população brasileira poderia representar melhor do que outras populações a influência de polimorfismos em genes diretamente relacionados à DG e à OG. Isso ocorreria também com outros genes envolvidos na detoxificação de substâncias que poderiam desencadear auto-imunidade e, portanto, estarem envolvidas no risco de aparecimento dessas doenças.

2-OBJETIVOS

Avaliar se há relação dos fatores genéticos (polimorfismos dos genes CTLA-4 na região promotora -318, CYP1A1m1, GSTP1 e 72TP53) na suscetibilidade à doença de Graves.

Avaliar a influência dos fatores clínicos (idade, sexo, etnia, tabagismo, tamanho do bócio), laboratoriais (TSH, T4livre, T3total, antiTPO, antiTg, TRAb), de imagem (captação tiroideana com tecnécio ou iodo131), tipo de tratamento (radioiodo, drogas antitiroideas e cirurgia) e genéticos (polimorfismos dos genes CTLA-4 na região promotora 318, CYP1A1m1, GSTP1 e 72TP53) no risco de desenvolvimento da oftalmopatia de Graves.

3- METODOLOGIA

3.1- Pacientes com doença de Graves

Trata-se de um estudo prospectivo do tipo caso-controle onde foram avaliados 193 pacientes com DG (160 mulheres, 33 homens, 144 brancos, 49 não brancos), com idades variando entre 14 e 68 anos, $39 \pm 10,8$ anos provenientes do Ambulatório de Tiróide do Hospital Universitário da PUC de Campinas, Brasil, no período de 1995 a 2008.

O diagnóstico da DG baseou-se nas evidências clínicas e laboratoriais de tirotoxicose, isto é, TSH suprimido com valores elevados de triiodotironina (T3) e T4 livre (T4l), bócio difuso, presença de anticorpo anti-receptor de TSH (TRAb) positivo e/ou captação tireoidiana aumentada de ^{131}I ou tecnécio.

Os pacientes foram tratados inicialmente com drogas antitiroidianas (metimazol ou propiltiouracil). Foram encaminhados à radioiodoterapia ou cirurgia (tiroidectomia) quando em presença de efeitos colaterais, ausência de adesão, ou falha na remissão (após tratamento de, no mínimo, 24 meses). O seguimento foi de 112 ± 46 meses. Ao término deste estudo, 114 pacientes haviam sido submetidos a radioiodoterapia, 4 a tiroidectomia total e 75 permaneciam em uso de drogas antitiroidianas. Todos os pacientes submeteram-se a ultrassonografia, e aqueles com nódulos tireoidianos foram puncionados para avaliação citológica e excluídos do estudo quando presente neoplasia tireoidiana.

3.2- Avaliação da oftalmopatia

Todos os pacientes foram avaliados pelo mesmo examinador (Roberto B. dos Santos), buscando a identificação de presença ou ausência de oftalmopatia. Essa avaliação incluiu:

- a) Avaliação da oftalmopatia por meio de um escore de atividade clínica (clinical activity score) que leva em consideração sete manifestações da doença: dor retrobulbar espontânea, dor com o movimento ocular, eritema palpebral, edema palpebral, hiperemia conjuntival, quemose (edema de conjuntiva) e edema de carúncula. Um ponto é dado por cada manifestação e o somatório varia de zero (sem atividade) a 7 (atividade muito alta) (Pinchera *et al.*, 1992).

- b) Medidas de proptose através de exoftalmômetro de Hertel, sendo considerados os valores de normalidade de 18 mm para asiáticos, 20 mm para caucasianos e 22 mm para negros.
- c) Medidas de fenda palpebral, acuidade visual, pressão intra ocular e tipo de diplopia (constante, inconstante e intermitente).

A análise desses dados permitiu-nos identificar e graduar a oftalmopatia de Graves baseada na classificação NOSPECS, proposta por Werner (1977), descrita abaixo:

- **Classe 0:** sem sinais ou sintomas.
- **Classe 1:** somente sinais, sem sintomas (retração palpebral superior, com ou sem lid lag e sem proptose).
- **Classe 2:** envolvimento de tecidos moles com sintomas e sinais:

0: ausente;

A: mínimo (quadro conjuntivo edematoso pálpbro conjuntival, bolsas palpebrais, glândulas lacrimais ou músculos extrínsecos palpáveis);

B: moderado (quadro acima mais quemose e lagoftalmo);

C: intenso.

- **Classe 3:** proptose com ou sem sintomas:

0: ausente;

A: 21-23 mm;

B: 24-27mm;

C $\geq$ 28 mm.

- **Classe 4:** envolvimento da musculatura extraocular (usualmente com diplopia e outros sintomas ou sinais):
 - 0:** ausente;
 - A:** limitação das duções evidenciadas em uma ou mais posições extremas do olhar;
 - B:** evidente restrição do movimento, sem fixação de posição;
 - C:** intensa (fixação de um ou de ambos os globos oculares).
- **Classe 5:** envolvimento da córnea (principalmente devido a lagofalmo):
 - 0:** ausente;
 - A:** mínimo (deseptalização);
 - B:** moderado (ulceração);
 - C:** intenso (embaçamento, necrose, perfuração).
- **Classe 6:** perda visual leve (devido a envolvimento do nervo óptico):
 - 0:** ausente;
 - A:** mínimo (palidez ou edema de papila ou defeito do campo visual AV 20/20 e 20/60);
 - B:** moderada (palidez ou edema de papila ou defeito de campo visual; AV 20/70 - 20/200);
 - C:** cegueira, falha de perceber a luz, visão menor que 20/200.

Considerou-se OG ausente quando NOSPECS igual a zero e presente quando maior ou igual a 2. Os pacientes com NOSPECS maior ou igual a 3 foram considerados com oftalmopatia de maior gravidade.

3.3- Controles

O grupo constituiu-se de voluntários do ambulatório de endocrinologia geral (patologias hipofisárias e obesidade) da PUC Campinas e do Banco de Sangue da UNICAMP. Compunha-se de 200 indivíduos, 125 mulheres e 75 homens, 153 brancos e 47 não brancos, com idades variando entre 14 e 73 anos, $40,39 \pm 14,99$ anos, originários da região de Campinas. Apresentavam-se clínica e laboratorialmente em eutiroidismo, com pesquisa de anticorpos antitiroidianos negativos e sem evidência clínica ou história familiar de doenças auto-imunes.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário da PUC Campinas (Doença de Graves e controles) e Hospital Universitário da UNICAMP (controles) (FCM/ UNICAMP, CEP/FCM/UNICAMP #06/06/03 – 072/98; PUC-Campinas, CEP #19/08/2005 – 332/04).

Todos os indivíduos foram devidamente esclarecidos dos objetivos deste trabalho e assinaram o Termo de Consentimento Informado.

Tanto os indivíduos do grupo controle quanto os pacientes foram submetidos a exames físicos e responderam a um questionário que incluía ocupação, tabagismo, uso de drogas ilícitas e médicas, condições gerais da saúde e informações sobre doenças prévias.

A etnia foi classificada em brancos e não-brancos de acordo com a autoclassificação do paciente e pelo IBGE.

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

3.4- Dosagens hormonais, anticorpos e imagens

Os valores de TSH (normal: 0,4-4,0 mU/L), T3 (normal: 82-200 ng/dL) e T4 livre (normal: 0,8-1,9 ng/dL) foram avaliados em um autoanalisador IMMULITE (DPC, Los Angeles, CA), usando um método imunométrico de quimioluminescência. Os anticorpos antitreoperoxidase (AntiTPO) e antitreoglobulina (AntiTg) também foram

dosados por método imunométrico de quimioluminescência (IMMULITE). Foram considerados positivos todos os AntiTPO e AntiTg com valores acima de 35UI/mL e 40UI/mL, respectivamente. O anticorpo anti-receptor de tirofina (TRAb) foi detectado por meio de kit com ensaio radio-receptor (RSR Limited, UK) e considerado positivo se maior que 10U/L. A captação com radioiodo foi avaliada 24 horas após dose traçadora de 100 µCi de ^{131}I (valor normal: 15-31%) ou 20 minutos após dose traçadora de pertecnetato $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (valor normal: 0,35-1,7%). O tamanho tiroidiano foi determinado pela ultrassonografia (valor normal: 6-15cm³).

3.5- Extração de DNA

O DNA foi extraído de todas as amostras por meio de protocolo adaptado pelo nosso laboratório utilizando o método do fenolclorofórmio, em que as hemácias são desprezadas, os leucócitos lisados e o DNA separado dos restos celulares. Após a extração, o DNA foi quantificado por meio de espectrofotometria e armazenado em “freezer” a -20 °C.

3.6- Análise do polimorfismo do gene CTLA-4 região promotora posição 318

Para determinação do polimorfismo da região promotora na posição 318 do gene CTLA-4, usou-se o método PCR-RFLP, isto é, amplificação da sequência pretendida por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática do fragmento pretendido (RFLP).

Os primers utilizados foram:

Primers		Sequências
CTLA-4-318	Sense	5'-AAATGAATTGGACTGGATGGT-3
	Antissense	5'-TTACGAGAAAGGAAGCCGTG-3'

O volume utilizado na PCR foi de 25 µl, contendo 50 ng de DNA da amostra, 10 µM de cada primer, 10X PCR Buffer (de acordo com o protocolo do fabricante), 10 mM de cada dinucleotídeo trifosfato, 25 mM MgCl₂ e 1 U de Taq DNA polimerase.

Foram realizados 35 ciclos na PCR de 94 °C por 50 s, 51.7 °C por 45 s (anelamento) e 72 °C por 1 min., com temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 5 min e temperatura final de extensão foi de 72 °C por 10 min. Utilizou-se MJ PTC-200 PCR system (Fermentas, Lituânia).

Os fragmentos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

A enzima de restrição MseI foi usada para identificar o polimorfismo de acordo com o protocolo do fabricante (Fermentas, Lituânia).

Esta enzima corta o fragmento de DNA se uma timina está presente na posição -318, resultando em fragmentos de 132/115 pb se a citosina está presente na posição -318, não ocorre a digestão do 274pb.

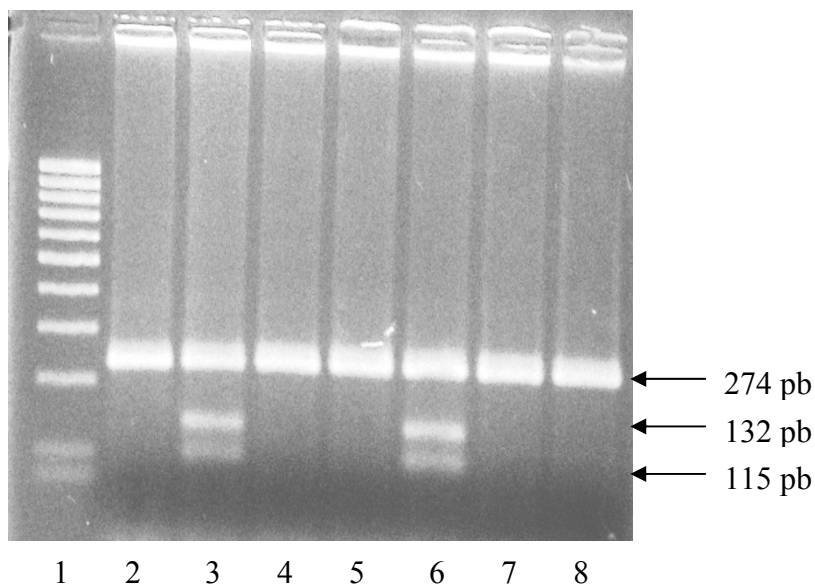


Figura 2- Exemplo de resultado obtido com a restrição enzimática de fragmento amplificado por PCR do gene CTLA-4 região promotora -318, em gel de agarose corado com brometo de etídeo. 1: Ladder; 2,4,5,7 e 8: homozigoto selvagem; 3 e 6 : heterozigoto

3.7- Análise do polimorfismo do gene CYP1A1 m1

No caso do gene CYP1A1 m1, foram utilizados os primers descritos abaixo, para a realização PCR-RFLP:

Primers		Sequências
CYP1A1 m1	Sense	5' - CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT - 3'
	Antissense	5' - TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT - 3'

Os fragmentos gerados pela PCR de CYP1A1 m1 foram de 340 pb. Esses fragmentos foram amplificados usando-se um volume total na PCR de 25 µl, contendo 100 ng de DNA da amostra, 10 µM de cada primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM de MgCl₂ , 0.1 mM de dNTP e 0.5U Taq DNA polimerase. Foram utilizados

35 ciclos na PCR de 94 °C por 50 segundos, 60 °C por 45 segundos e 72 °C por um minuto, com a fase inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C e a fase final de extensão por 10 minutos a 72 °C, usando o termociclador MJ PTC-200 PCR system. Os fragmentos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, em um transiluminador de luz UV.

Para a análise dos alelos do gene CYP1A1 m1 utilizou-se a enzima de restrição MspI de acordo com o protocolo do fabricante (Fermentas UAB, Lituânia). O alelo homozigoto selvagem apresentou um fragmento de 340 pb, o heterozigoto de 340 bp, 200 bp e 140 bp e o homozigoto apresentou apenas as bandas de 200 bp e 140 bp. Os produtos da restrição foram analisados em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídeo e visualizado no transiluminador de luz UV.

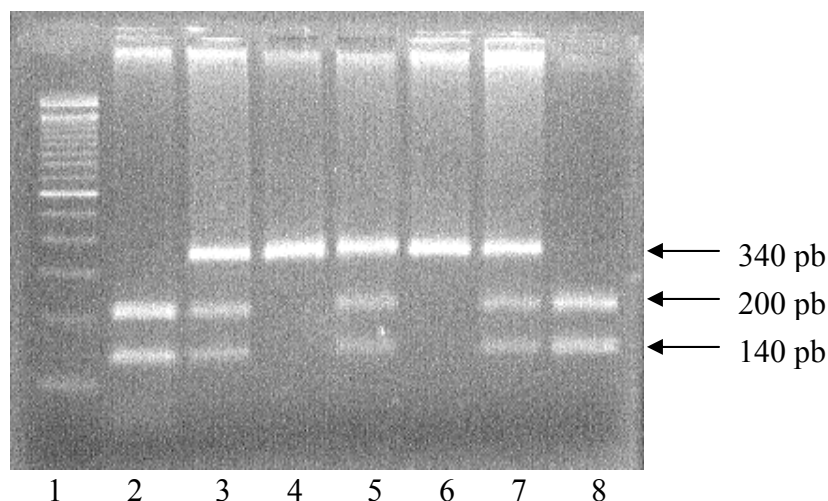


Figura 3- Exemplo de resultado obtido com a restrição enzimática de fragmento amplificado por PCR do gene CYP1A1m1, em gel de agarose corado com brometo de etídeo. 1: Ladder; 2 e 8: homozigoto mutante; 3, 5 e 7: heterozigoto; 4 e 6: homozigoto selvagem.

3.8- Análise do polimorfismo do gene GSTP1

Para a análise dos polimorfismos do gene GSTP1 foi utilizada a PCR-RFLP:

Primer		Sequência
GSTP1	Sense	5' - CCAGGCTGGGGCTCACAGACAGC – 3'
	Antissense	5' - GGTCAGCCCAAGCCACCTGAGG – 3'

Os primers e as condições da PCR-RFLP foram previamente descritas por Morari (2006).

Na reação de PCR utilizaram-se 100 ng de DNA, 50 nM de cada primer, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 µM de dNTP, 20 mM de MgCl₂ e 0.5 U Taq DNA polimerase, com um volume final de 20 µl. A amplificação foi feita no termociclador MJ PTC-200 PCR system programado para realizar a desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 65.6 °C por 45 segundos e 72 °C por um minuto e a extensão final foi de 72 °C por sete minutos.

Os produtos obtidos na reação de amplificação por PCR para o gene GSTP1 foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídeo (8 mg/ml) e visualizados sob iluminação ultravioleta. Já para a restrição enzimática do gene GSTP1 foi utilizado um volume final de 15.5 µl com a enzima de restrição Alw26I (Fermentas UAB, Lituânia), com processo de desnaturação a 37 °C durante 16 horas, seguindo o protocolo do fabricante. Os resultados finais foram analisados em géis de agarose 3%, corados com brometo de etídeo (8 mg/ml) e visualizados sob luz ultravioleta. Para o alelo homozigoto selvagem, encontrou-se um fragmento de 306 pb; o heterozigoto apresentou três bandas de 306 pb, 190 pb e 116 pb e o homozigoto mutante, apenas duas bandas de 190 pb e 116 pb.

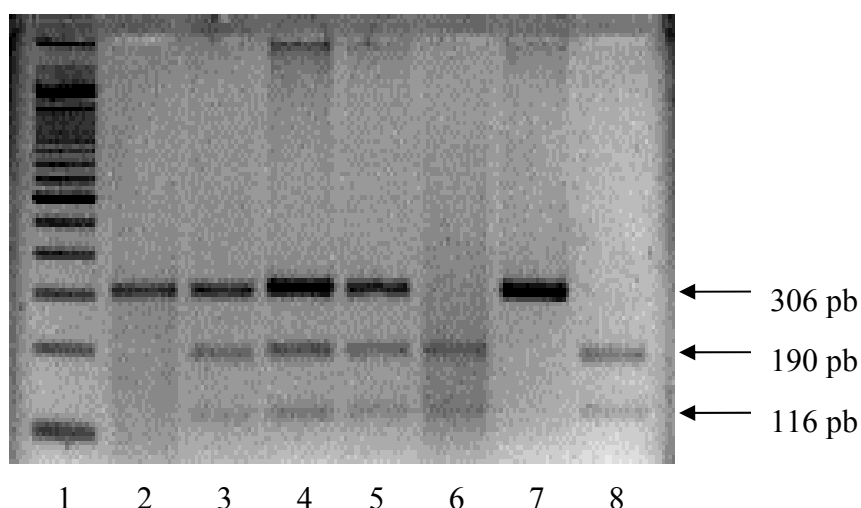


Figura 4- Exemplo de resultado obtido com a restrição enzimática de fragmento amplificado por PCR do gene GSTP1, em gel de agarose corado com brometo de etídeo. 1: Ladder; 6 e 8: homozigoto mutante; 3, 4 e 5: heterozigoto; 2 e 7: homozigoto selvagem.

3.9- Identificação dos genótipos do gene TP53 códon 72

Para a determinação dos polimorfismos do gene TP53 códon 72, utilizou-se método de PCR-RFLP. Os primers utilizados foram:

Primer		Sequência
TP53 códon 72	Sense	5' - ATCTACAGTCCCCCTTGCCG - 3'
	Antissense	5' - GCAACTGACCGTGACAGTCA - 3'

O volume utilizado na PCR foi de 25 µl, contendo 100 ng de DNA, 50 µM de cada primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.0 mM de MgCl₂, 100 µM de dNTP e 0.5 U Taq DNA polimerase. Utilizamos 35 ciclos na PCR de 94 °C por 50 segundos, 65 °C por 50 segundos e 72 °C por 1 minuto, com a fase inicial de desnaturação de 2 minutos a 94 °C e a fase final extensão por 10 minutos a 72 °C, usando o termociclador MJ PTC-200 PCR system. Os fragmentos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2%, corados com

brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. A enzima de restrição utilizada foi a Bsh1236I, para a análise dos alelos do gene TP53 códon 72 de acordo com o protocolo do fabricante (Fermentas UAB, Lituânia). O alelo homozigoto selvagem apresentou dois fragmentos de 169 e 127 pb. A variante homozigota apresentou apenas um fragmento de 296 pb e o heterozigoto apresentou três bandas de 296, 169 e 127 pb. O produto da restrição foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 3% e corado com brometo de etídeo. Os resultados da RFLP foram confirmados através do sequenciamento direto em sequenciador automático (ABI 377 Prism DNA Sequencer - Perkin Elmer).

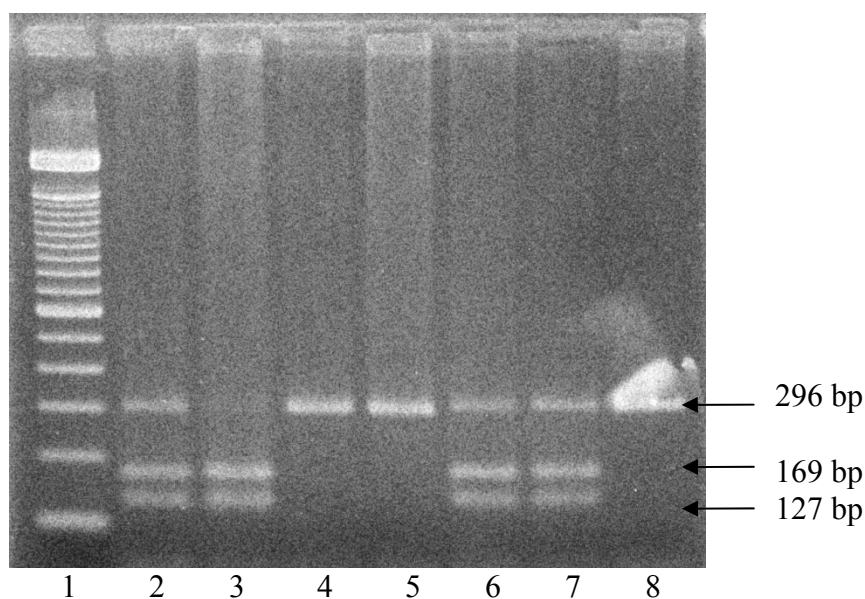


Figura 5- Resultado da PCR-RFLP do gene TP53 códon 72. Gel de agarose corado com brometo de etídeo mostrando o resultado da PCR-RFLP do gene TP53 códon 72. 1: Ladder; 3: homozigoto selvagem (Arg/Arg); 2, 6 e 7: heterozigoto (Arg/Pro); 4, 5 e 8: homozigoto mutante (Pro/Pro).

3.10- Análise Estatística

O teste exato de Qui-quadrado foi utilizado para comparar as variáveis demográficas sexo, etnia e idade entre os pacientes com DG e indivíduos controle.

Na comparação dos polimorfismos do gene CTLA-4 região promotora -318, CYP1A1, GSTP1 e 72TP53, entre pacientes com oftalmopatia presente e ausente também foi utilizado o teste de Qui-quadrado ou o de Fisher, quando necessário.

Na comparação entre os pacientes com OG presente e ausente foi utilizado o teste exato de Fisher para as variáveis sexo, etnia, tabagismo, idade maior ou menor que 50 anos, anticorpos antiTPO, antiTg e o tipo de tratamento utilizado. O teste T de Student comparou idade, TSH, T4livre, T3, e captação de 24h com ^{131}I . O teste de Mann-Whitney foi usado na avaliação da captação para Tecnécio e TRAb. Realizou-se uma regressão logística multivariada para todas as variáveis estudadas procurando detectar fatores de risco para oftalmopatia. Foi realizado o poder de cálculo (PC) para cada dado estatístico. Todos os testes foram realizados com $p < 0,05$ como nível de significância.

4- RESULTADOS

Os indivíduos-controle e pacientes com DG não apresentaram diferenças com relação à etnia (155 brancos e 45 não-brancos vs 144 brancos vs 49 não-brancos, $p = 0,68$), idade (40 ± 10 anos vs $39 \pm 9,9$ anos, $p = 0,1$), respectivamente. Entretanto, houve diferença com relação ao gênero, predominando proporcionalmente as mulheres entre os pacientes com DG (75 homens e 125 mulheres vs 33 homens e 160 mulheres, $p < 0,001$), como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4- Características demográficas dos pacientes com doença de Graves (DG) e indivíduos-controle

Pacientes		DG	Controles	P
Sexo	feminino	160	125	< 0,001
	masculino	33	75	
Etnia	brancos	144	155	0,68
	Não-brancos	49	45	
Idade (anos)		$39 \pm 9,99$	40 ± 10	0,1

Comparando a distribuição genotípica do gene CTLA-4 região promotora -318, não se encontrou diferença entre indivíduos-controle e pacientes com DG ($p = 0,12$), como mostra a Tabela 5.

Tabela 5- Distribuição dos genótipos da região promotora posição -318 do gene CTLA - 4 em pacientes com doença de Graves (DG) e indivíduos-controle

	N	CC (%)	CT (%)	TT (%)	P	OR	IC	PC
DG	193	146 (75,6)	46 (23,8)	1 (0,6)	0,186	1,47	0,85-2,56	24%
Controles	200	163 (81,5)	35(17,5)	2 (1)	-	-	-	-

Encontrou-se diferença significativa com relação ao genótipo CYP1A1m1 nos pacientes com DG comparados com controles ($p < 0,0001$, OR = 2,33, 95% IC = 1,46-3,73). As variantes CYP1A1m1 eram mais frequentes em pacientes com DG (normal = 52,7%, heterozigoto = 44,7% e homozigoto = 2,6%), do que nos controles (normal = 71,8%, heterozigoto = 26% e homozigoto = 2,2%), como mostra a Tabela 6, de forma que a herança de variantes de CYP1A1m1 aumentou o risco de um indivíduo apresentar DG em 2,3 vezes.

Tabela 6- Distribuição dos genótipos de CYP1A1m1 em pacientes com doença de Graves (DG) e indivíduos-controle

	N	Homoz. Selvagem (%)	Heteroz. (%)	Homoz. Mutante (%)	P	OR	IC	PC
DG	188	99 (52,7)	84 (44,7)	5 (2,6)	0,0001	2,33	1,46-3,73	96%
Controles	192	138 (71,8)	50 (26)	4 (2,2)	-	-	-	-

Pacientes com DG mostraram uma significativa apresentação em excesso de variantes do genótipo GSTP1 (GSTP1 tipo selvagem = 38,3%, heterozigoto = 50,3% e homozigoto = 11,4%), comparados com a população controle (GSTP1 tipo selvagem = 58,9%, heterozigoto = 32,2% e homozigoto = 8,9%), com $p = 0,007$). A chance de desenvolvimento de DG também se elevou mais de duas vezes em portadores de variantes de GSTP1 ($p = 0,0007$, OR = 2,57, 95%IC = 1,58-4,17), como mostra a Tabela 7.

Tabela 7- Distribuição dos genótipos de GSTP1 em pacientes com doença de Graves (DG) e indivíduos-controle

	N	Homoz. Selvagem (%)	Heteroz. (%)	Homoz. Mutante (%)	P	OR	IC	PC
DG	175	67 (38,3)	88 (50,3)	20 (11,4)	0,0007	2,57	1,58-4,17	96%
Controles	180	106 (58,9)	58 (32,2)	16 (8,9)	-	-	-	-

Observou-se uma distribuição similar da variante selvagem do códon 72 do TP53 em pacientes com DG (TP53 tipo selvagem = 49,3%, heterozigoto = 40,4% e homozigoto = 10,3%), e a população controle (72TP53 tipo selvagem = 50%, heterozigoto = 44,4% e homozigoto = 5,6%), com $p = 0,27$ (Tabela 8).

Tabela 8- Distribuição dos genótipos de 72TP53 em pacientes com doença de Graves (DG) e indivíduos-controle

	N	Arg/Arg (%)	Arg/Pro (%)	Pro/Pro (%)	P	OR	IC	PC
DG	146	72 (49)	59 (40,4)	15 (10,3)	0,278	1,02	0,64-1,62	-
Controles	178	89 (50)	79 (44,4)	10 (5,6)	-	-	-	-

A distribuição dos genótipos CYP1A1m1, GSTP1 e 72TP53 em pacientes com OG presente e ausente se mostrou similar, com $p = 0,46$, $p = 0,22$ e $0,27$ respectivamente (Tabelas 10, 11 e 12). Entretanto, quando foi analisada a distribuição do genótipo CTLA-4 região promotora -318, detectou-se em pacientes com OG presente o genótipo CT muito mais frequentemente do que nos pacientes sem OG ($p = 0,005$, $OR = 2,65$, $95\%IC = 1,35-5,32$), conforme Tabela 9.

Tabela 9- Distribuição dos genótipos da região promotora posição -318 do gene CTLA - 4 em pacientes com oftalmopatia de Graves (OG) presente e ausente

	N	CC (%)	CT (%)	TT (%)	P	OR	IC	PC
OG Presente	96	64 (66,6)	31 (32,2)	1 (1,2)	0,005	2,65	1,35-5,32	77%
OG Ausente	97	82 (84,5)	15 (15,5)	0 (0)	-	-	-	-

Tabela 10- Distribuição dos genótipos de CYP1A1m1 em pacientes com oftalmopatia de Graves (OG) presente e ausente

	N	Homoz. Selvagem (%)	Heteroz. (%)	Homoz. Mutante (%)	P	OR	IC	PC
OG Presente	93	53(56,2)	37(39,7)	3 (3,1)	0,46	0,7	0,39-1,25	14%
OG Ausente	97	47 (48,4)	47 (48,4)	2(0,2)	-	-	-	-

Tabela 11- Distribuição dos genótipos de GSTP1 em pacientes com oftalmopatia de Graves (OG) presente e ausente

	N	Homoz. Selvagem (%)	Heteroz. (%)	Homoz. Mutante (%)	P	OR	IC	PC
OG Presente	88	39(44,3)	39(44,3)	10 (11,4)	0,22	0,6	0,32-1,12	33%
OG Ausente	92	52 (56,6)	31 (33,7)	9(9,7)	-	-	-	-

Tabela 12- Distribuição dos genótipos de 72TP53 em pacientes com oftalmopatia de Graves (OG) presente e ausente

	N	Arg/Arg (%)	Arg/Pro (%)	Pro/Pro (%)	P	OR	IC	PC
OG Presente	68	37(54,4)	23(33,8)	8(11,8)	0,27	0,61	0,32-1,12	15%
OG Ausente	82	37(45,1)	38(46,3)	7(8,6)	-	-	-	-

Quando comparadas as características clínicas e laboratoriais entre os grupos de pacientes com ausência *versus* presença de OG (NOSPECS classes 2 e maior ou igual a 3), observou-se que o sexo masculino, o tabagismo e o tamanho do bócio eram fatores de risco para oftalmopatia (Tabela 13).

Tabela 13- Comparação entre as características clínicas e laboratoriais dos grupos de pacientes com presença de oftalmopatia de Graves (OG-classes 2 e ≥ 3) e com ausência de oftalmopatia

	OG Presente	OG Ausente	P	OR	IC
	(N = 96)	(N = 97)			
Homens/ Mulheres	23/73	10/87	0,0108	2,77	1,24-6,2
Branco/ Não-branco	72/24	72/25	0,93	-	-
Tabagistas sim/não (n)	43/53	23/74	0,0017	2,65	1,43-4,9
Idade (anos)	39 $\pm$ 10,48	38,89 $\pm$ 11	0,54	-	-
Idade $\geq$ 50 (anos) (n)	21	19	0,66	-	-
Bócio (US)	28,8 $\pm$ 17,8	22,48 $\pm$ 14,5	0,001	1,75	1,18-2,58
TSH (μU/ml)	0,008 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	0,25	-	-
T4 livre (ng/dl)	4,54 $\pm$ 1,79	4,66 $\pm$ 1,86	0,63	-	-
T3 (ng/dl)	421 $\pm$ 209	447 $\pm$ 159,9	0,34	-	-
AntiTPO (Positivo/Negativo)	76/20	85/12	0,16	-	-
AntiTg (Positivo/Negativo)	48/48	46/51	0,66	-	-
TRAb (U/L)	136,9 $\pm$ 217	109,49 $\pm$ 238	0,07	-	-
Tecnécio (%)	14,4 $\pm$ 14	12,2 $\pm$ 12,7	0,58	-	-
I131 24h (%)	50,3 $\pm$ 19,4	56,8 $\pm$ 23	0,5	-	-

Avaliando os pacientes com a presença de OG (OG-classe 2) e comparando-os com aqueles sem OG, encontramos apenas o bócio como sendo fator de risco para a OG (Tabela 14).

Tabela 14- Comparação entre as características clínicas e laboratoriais dos grupos de pacientes com presença de Oftalmopatia de Graves (OG-classe 2) e ausência de oftalmopatia

	OG Presente Classe 2 (N = 32)	OG Ausente (N = 97)	P	OR	IC
Homens/ Mulheres	4/28	10/87	0,74	-	-
Branços /Não-brancos	23/9	72/25	0,81	-	-
Tabagistas sim/não (n)	10/22	23/74	0,48	-	-
Idade (anos)	42 ±11,1	38,89±11	0,14	-	-
Idade ≥ 50 (anos) (n)	10	19	0,22	-	-
Bócio (US)	29,81±15,23	22,48±14,5	0,03	1,60	1- 2,3
TSH (μU/ml)	0,007±0,01	0,01±0,01	0,21	-	-
T4 livre (ng/dl)	4,7±1,75	4,66±1,86	0,93	-	-
T3 (ng/dl)	540±260	447±159,9	0,32	-	-
AntiTPO (Positivo/Negativo)	23/9	85/12	0,06	-	-
AntiTg (Positivo/Negativo)	13/19	46/51	0,06	-	-

Quando comparamos a presença de OG (classe ≥ 3) com ausência de OG, os fatores sexo masculino, tabagismo e bócio foram fatores de risco para OG (Tabela 15).

Tabela 15- Comparação entre as características clínicas e laboratoriais dos grupos e pacientes com presença de oftalmopatia de Graves (OG-classe ≥ 3) e ausência de oftalmopatia

	OG Presente (N = 64)	OG Ausente (N = 97)	P	OR	IC
Homens /Mulheres	19/45	10/87	0,0016	3,72	1,59-8,66
Branco/Não Branco	49/15	72/20	0,76	-	-
Tabagistas sim/não (n)	33/31	23/74	0,0002	3,47	1,76-6,83
Idade (anos)	38,55 $\pm$ 9,99	38,89 $\pm$ 11	0,88	-	-
Idade ≥ 50 (anos) (n)	11	19	0,72	-	-
Bócio (US)	28,29 $\pm$ 19,32	22,48 $\pm$ 14,5	0,03	1,67	1,09-2,56
TSH (μU/ml)	0,008 $\pm$ 0,009	0,01 $\pm$ 0,01	0,45	-	-
T4 livre (ng/dl)	4,46 $\pm$ 1,82	4,66 $\pm$ 1,86	0,47	-	-
T3 (ng/dl)	373,44 $\pm$ 166,16	447 $\pm$ 159,9	0,08	-	-
AntiTPO (Positivo/Negativo)	53/11	85/12	0,49	-	-
AntiTg (Positivo/Negativo)	35/29	46/51	0,33	-	-
TRAb (U/L)	96,28 $\pm$ 131,18	109,49 $\pm$ 238	0,16	-	-
Tecnécio (%)	17,41 $\pm$ 16,53	12,2 $\pm$ 12,7	0,37	-	-
I131 24h (%)	50,31 $\pm$ 19,45	56,8 $\pm$ 23	0,5	-	-
Radioiodo	27	60	0,02	-	-
Drogas	33	37		-	-
Tiroidectomia	4	0		-	-

Já a regressão logística multivariada, analisando as variáveis que influenciam na OG, mostrou que o genótipo CT do gene CTLA-4 região promotora -318 ($p = 0,04$), $OR = 4,13$, $95\%IC = 1,01-16,8$ e o sexo masculino $p = 0,01$, $OR = 7,59$, $95\%IC = 1,55-37,23$ foram fatores de risco para esse acometimento (tabela 16).

Tabela 16- Regressão logística multivariada analisando os fatores que influenciam no risco para desenvolvimento da oftalmopatia de Graves

Variável	P	OR	IC
CTLA-4 -318 CT/CC	0,04	4,13	1,01-16,8
CYP1A1	0,18	0,44	0,13-1,48
GSTP1	0,9	0,63	0,08-5,7
TP53	0,2	0,16	0,02-1,22
Sexo masculino	0,01	7,59	1,55-37,23
Etnia	0,44	1,62	0,47-5,6
Tabagismo	0,08	3,21	0,87-4,18
Idade	0,87	0,9	0,26-3,08
Bócio	0,32	1,47	0,69-3,14
TSH	0,06	0,01	0,01-11,7
T4livre	0,85	1,03	0,76-1,4
AntiTPO	0,99	1,0	0,17-6,07
AntiTg	0,19	2,2	0,66-7,37
TRAb	0,08	1,007	0,99-1,01
Drogas/Radioiodo	0,75	1,32	0,23-7,48
Tecnécio	0,47	1,02	0,98-1,06

5- DISCUSSÃO

A DG é uma doença auto-imune de etiologia multifatorial e de herança poligênica. Entre os pacientes com DG, apenas um subgrupo de 3-5% desenvolvem uma OG severa, de forma que já se aventou a possibilidade de que DG e OG sejam duas doenças distintas com diferentes bases genéticas (Zhang *et al.*, 2006).

A presente análise do polimorfismo CTLA-4 região promotora -318 não encontrou diferenças entre pacientes com DG e indivíduos controles ($p=0,186$). Os mesmos resultados foram obtidos por Heward *et al.*, 1999; Kacem *et al.*, 2001; Kouki *et al.*, 2002. Diferente da população estudada, a análise deste polimorfismo do gene CTLA-4 em populações do Canadá e da Alemanha mostrou um excesso do genótipo CC em DG e constatou-se que esta associação estava em *linkage*, isto é, associada com o exon 1 (Braun *et al.*, 1998). Embora nossa população, pela sua elevada heterogeneidade, tenha maior chance de representar a real influência desse polimorfismo no desencadeamento da DG, estudos com maior número de pacientes e em diferentes populações são necessários para que, em uma meta-análise, se possa avaliar melhor o seu papel.

Quando compara-se a frequência genotípica do polimorfismo do gene CTLA-4 região promotora -318 em pacientes com e sem OG, observa-se uma maior frequência do genótipo CT em pacientes com OG ($p=0,005$, OR =2,65, 95% IC=1,35-5,32). Na população coreana, Park *et al.*, 2000 analisaram uma associação desse mesmo polimorfismo com OG, entretanto a associação foi com o genótipo CC em vez do CT, encontrado no presente estudo. Diferenças alélicas podem representar ações totalmente diferentes das proteínas resultantes em substratos diferentes. Assim, novamente é possível que a população coreana seja diferente da brasileira quanto ao perfil de risco relacionado com a exposição a diferentes substâncias desencadeadoras da OG.

A análise dos fatores de risco para OG revelou que o tabagismo foi um fator significativo para o desenvolvimento da OG, mais do que duplicando seu risco ($p = 0,001$, OR:2,65, 95% IC = 1,43-4,9). Após a descrição inicial de Hägg e Asplund (1987), diversos relatos documentaram uma forte associação entre tabagismo e DG. Vestergaard *et al.* 2002 mostraram em uma meta-análise que o risco para DG foi significativamente maior em fumantes. Além disso, pacientes com DG que fumam têm um risco aumentado para desenvolver OG (Vestergaard *et al.*, 2002).

Os mecanismos pelos quais o tabagismo afeta a OG não são totalmente conhecidos. Propõe-se que a formação de radicais superóxido (o cigarro contém ou gera uma variedade de oxidantes e de radicais livres) induz a proliferação de fibroblastos orbitais (Burch *et al.*, 1997; Pryor e Stone, 1993). A hipóxia tecidual também agiria da mesma forma, além de aumentar a produção de glicosaminoglicans por esses mesmos fibroblastos (Metcalf *et al.*, 1994).

A cultura de fibroblastos orbitais mostra o aumento da expressão do HLA-DR em resposta a nicotina e alcatrão, mas somente quando na presença de interferon-gama, sugerindo que o fumo altera a resposta imune orbital na OG (Mack *et al.*, 1999).

Mais recentemente, Cawood *et al.* (2007), observaram que após estímulo de fibroblastos orbitais com extrato de tabaco houve um aumento da produção de glicosaminoglicans e da adipogênese, explicando a ação desse agente no desenvolvimento da OG. Contudo, demonstraram que esse efeito aditivo ou sinérgico ocorria em combinação com outras influências auto-imunes, como interleucinas inflamatórias ou linfócitos ativados. Essa hipótese é baseada no encontro nesse estudo, do efeito sinérgico do extrato de tabaco e Interleucina-1.

Além disso, entre pacientes com OG, aqueles que fumam apresentam um acometimento ocular mais severo comparado com os não-fumantes (Prummel e Wiersinga., 1993). O período de seguimento dos pacientes com DG é um fator importante na detecção da OG. Em uma significativa proporção de pacientes, o início da DG precede o da OG por um período de aproximadamente dois anos (Jacobson e Gorman., 1984). Os pacientes têm um período mínimo de seguimento de quatro 4 anos, o que permitiu identificar o surgimento ou piora da oftalmopatia dentro de um tempo satisfatório.

Os critérios utilizados para definir a presença de oftalmopatia e sua intensidade são pontos importantes na realização desse tipo de trabalho. Existem diversos tipos de classificações de oftalmopatia, entre elas: a proposta por Bartley e Gorman., 1995; e Bartalena *et al.*, 2000.

Usou-se no presente estudo a classificação NOSPECS, proposta por Werner., 1977, que é utilizada na maioria dos trabalhos mais recentes. Além disso, separamos nossos pacientes em dois grupos: aqueles com NOSPECS = 2 que apresentavam uma doença menos intensa e o NOSPECS $\geq$ 3 com doença mais grave. Isso permitiu definir melhor a relação entre OG e os fatores de risco estudados.

Apesar de utilizarmos um método de imagem como ressonância ou tomografia de órbita para todos os pacientes, a falta de uma padronização específica não permitiu separarmos OG como forma miogênica ou não-miogênica, o que poderia trazer resultados interessantes a respeito desses acometimentos.

Alguns trabalhos mostram que a idade avançada seria um fator de risco no desenvolvimento da OG. Entretanto, não existe uma definição de consenso de qual seria essa idade. Bednarczuk *et al.*, 2003 demonstraram que pacientes com mais de 42 anos apresentavam esse risco, enquanto Kendler *et al.*, 1993 encontraram essa alteração mais frequentemente com idade superior a 50 anos e Perros *et al.*, 1993 com mais de 60 anos. Não encontrou-se esse fator como sendo de risco em nossos grupos de pacientes, nem mesmo quando separamos para comparação entre aqueles com idade inferior e superior a 50 anos.

Existem evidências de que o sexo masculino esteja associado com a presença e severidade da OG (Perros *et al.*, 1993; Kendler *et al.*, 1993). Confirmamos este dado em nossa população onde o risco para o sexo masculino era quase três vezes maior de desenvolver OG: $p = 0,01$ OR: 2,77 95%IC = 1,24-6,2.

A explicação de o sexo masculino ser um fator de risco na OG não está definida. A DG ocorre com uma maior frequência em mulheres, possivelmente por influência dos estrógenos no sistema auto-imune, particularmente nos linfócitos B. Uma possível explicação seria que homens com DG seriam menos aderentes à terapia com drogas antitiroideas, manteriam-se por mais tempo em descontrole do hipertireoidismo, o que aumentaria o risco de desenvolvimento de oftalmopatia (Allahabadia *et al.*, 2000).

Uma observação interessante encontrada na presente casuística foi a presença de bócio como fator de risco para oftalmopatia. Esse dado não foi previamente descrito, de nosso conhecimento, em outras populações estudadas para fatores de risco para oftalmopatia. Poderíamos considerar lógico que, à medida que a glândula tiróide aumenta de tamanho, a produção de antígenos também aumenta, de forma que mais anticorpos poderiam se formar. Essa também é uma das explicações entre a relação encontrada por alguns autores entre tamanho de bócio e gravidade da DG (Manji *et al.*, 2006).

Existem controvérsias se o uso do radioiodo para tratamento da DG pode levar ao desenvolvimento ou a uma piora da OG (Bartalena *et al.*, 1998; Acharya *et al.*, 2008). Em nossa análise, não encontramos esse tipo de associação. No entanto precisamos apontar para um viés de nossa casuística. Quando separamos nossos pacientes em grupos com NOSPECS 2 e NOSPECS ≥ 3 , observamos maior número de pacientes utilizando o tratamento com drogas antitiroídicas (principalmente metimazol) neste último, $p=0,02$. Isso ocorre pelo fato de, nesses pacientes, preferirmos essas medicações pelos seus efeitos imunomoduladores, que levam à diminuição dos valores do TRAb (Carella *et al.*, 2006).

Alguns autores propõem que pacientes com valores de TRAb mais altos são suscetíveis a desenvolver um maior risco para OG (Gerding *et al.*, 2000). Esses achados não foram encontrados em nossos resultados, assim como não encontramos relação entre risco de OG e a presença de anticorpos antiTPO e antiTg.

Agentes químicos ambientais podem alterar o sistema imune em diferentes espécies (Gilbertson *et al.*, 2003; Nichenametla *et al.*, 2004). A exposição a xenobióticos ambientais, como o cigarro, foi proposta como um dos fatores de iniciação que levam à perda da tolerância à auto-proteína em indivíduos geneticamente suscetíveis a um número elevado de doenças, inclusive as doenças auto-imunes tiroídicas (Aune *et al.*, 2004; Kita *et al.*, 2004; Fourneau *et al.*, 2004). Os dados deste trabalho confirmam a literatura, indicando que o tabagismo desempenha um importante papel no risco para OG. As enzimas de GST são substratos específicos, mas o seu mecanismo de atuação é ainda pouco conhecido (Strange *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2003).

O polimorfismo de GSTP1 afeta a resposta celular ao dano de DNA, modifica a sensibilidade individual a genotoxinas, além de uma capacidade reduzida na detoxificação de substâncias danosas capazes de produzir estresse oxidativo (Hayes e Strange, 2000; Cao *et al.*, 2003).

As enzimas de GST são sujeitas à regulação por hormônios tireoidianos, além de GH, insulina e hormônios sexuais (Coecke *et al.*, 2000). Tanto o T3 quanto o T4 reduzem a atividade das GSTs, levantando a possibilidade de o estado de hipertireoidismo poder exercer uma influência na resposta a drogas antitireoidianas ou até ao tratamento com radioiodo (Coecke *et al.*, 2000).

Nossos dados sugerem que os indivíduos com variantes de GSTP1 possam ser mais suscetíveis à indução da auto-imunidade pela ação de produtos ambientais ou endógenos que dependem do gene GSTP1 como substratos de detoxificação.

Verificamos também que os polimorfismos de CYP1A1 m1 estão relacionados à suscetibilidade à DG. Há mais de 3,5 bilhões de anos, as enzimas P450 foram, sem dúvida, os componentes necessários para o caminho de transdução de sinais, e a maior parte das enzimas P450 ficou responsável pela detoxificação de inúmeros compostos tóxicos. Durante o metabolismo oxidativo, essas enzimas são capazes de gerar compostos tóxicos intermediários (Vineis., 2002). As enzimas de CYP, com o alelo Pro/Pro de 72TP53, podem participar no metabolismo de algumas toxinas de efeitos cumulativos, já que parecem ser mais importantes em indivíduos acima de 25 anos. O aumento no dano ao DNA e a apoptose podem estar associados com as doenças auto-imunes tireoidianas, hipótese esta referendada pelo achado de que os anticorpos anti-p53 podem ser detectados no soro de aproximadamente 4% de pacientes com suspeitas de doença auto-imune tireoidiana (Fenton *et al.*, 2000).

O papel da morte celular programada em doenças auto-imunes tireoidianas ainda é muito pouco entendido, mas é razoável assumir que a apoptose contribui, pelo menos parcialmente, regulando a maturação e controle da resposta imune mediada tanto pelos linfócitos T e B (Duke *et al.*, 1996). Ora, as variantes Pro de 72TP53 possuem menor capacidade de induzir apoptose celular (Whibley *et al.*, 2009). Embora dados anteriores de

nosso grupo apontassem uma participação de TP53 na etiopatogenia da DG, a presente investigação não encontrou qualquer relação desse gene com o risco para DG ou para OG (Bufalo *et al.*, 2008).

Acredita-se que os estudos desses polimorfismos em uma população maior poderão ajudar a traçar um perfil genético de risco para o desenvolvimento de determinadas doenças tiroidianas, como a DG e a OG. Considerando a prevalência relativamente elevada da doença tiroidiana auto-imune em nossa população, esse tipo de estudo poderá ajudar a definir grupos de risco aos quais, eventualmente, serão propostas medidas profiláticas específicas, como, por exemplo, evitar o fumo.

6- CONCLUSÃO

Concluimos que as variantes dos genes GSTP1 e CYP1A1m1 são mais frequentes nos pacientes com DG do que nos controles.

Observamos também que o genótipo CT do gene CTLA-4 região promotora -318 era mais frequente em pacientes com OG do que naqueles sem esse acometimento.

O sexo masculino, tabagismo e o bócio foram considerados fatores de risco para a OG.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acharya SH, Avenell A, Philip S, Burr J, Bevan JS, Abraham P. Radioiodine therapy (RAI) for Graves' disease (GD) and the effect on ophthalmopathy: a systematic review. Clin Endocrinol 2008; 69: 943-50.

Akaishi PMS, Cruz AAV, Silva FLM, Rodrigues MLV, Maciel LMZ, Donadi EA. The role of major histocompatibility complex alleles in the susceptibility of Brazilian patients to develop the myogenic type of Graves' orbitopathy. Thyroid 2007; 18: 443-47

Ali – Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization and expression in Escherichia coli of full – length cDNAs of three human glutathione S-transferase pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. J Biol Chem 1997; 272: 10004-12.

Allahabadia A, Daykin J, Holder RL, Sheppard MC, Gough SC, Franklyn JA. Age and gender predict the outcome of treatment for Graves' hyperthyroidism. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 1038-42.

Allahabadia A, Heward JM, Nithiyananthan R, Gibson SM, Reuser TT, Dodson PM *et al.* MHC class II region, CTLA-4 gene, and ophthalmopathy in patients with Graves' disease. Lancet 2001; 358: 984-5.

Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H, Tessier MC, Polychronakos C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. J Bio Chem 2002; 277:46478-86.

Anttila S, Hietanen E, Vainio H, Camus AM, Gelboin HV, Park SS *et al.* Smoking and peripheral type of cancer are related to high levels of pulmonary cytochrome P4501A in lung cancer patients. Int J Cancer 1991; 47: 681-85.

Anwar WA, Abdel-Rahman SZ, El-Zein R, Mostafa HM, Au WW. Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and, CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. Carcinogenesis 1996; 17: 1923-29.

Ara S, Lee PSY, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the p53 gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:4961.

Attardi LD, Donehower LA. Probing p53 biological functions through the use of genetically engineered mouse models. *Mutat Res* 2005; 576: 4-21.

Aune TM, Maas K, Parker J, Moore JH, Olsen NJ. Profiles of gene expression in human autoimmune disease. *Cell Biochem Biophys* 2004; 40: 81-96.

Bailey RL, Roodi N, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF. Breast cancer and CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms: evidence of a lack of association in Caucasian and African Americans. *Cancer Res* 1998; 58: 65-70.

Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249: 912-5.

Bartalena L, Marcocci C, Pinchera A . On the effects of radioiodine therapy on Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 1998; 8: 533-4.

Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C. Management of Graves' ophthalmopathy: reality and perspectives. *Endocr Rev* 2000; 21: 168-99.

Bartley GB, Gorman CA. Diagnostic criteria for Graves' ophthalmopathy. *Am J Ophthalmol* 1995. 119: 792-5.

Bartsch H, Hietanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 569-77.

Bech K, Lumholtz B, Nerup J, Thomsen M, Platz P, Ryder LP *et al.* HLA antigens in Graves' disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1977; 86: 510-6.

Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Fukutani T, Jazdzewski K, Miskiewicz P, Osikowska M, Nauman J. Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and non-genetic factors with Graves' ophthalmopathy in European and Japanese populations. *European Journal of Endocrinology* 2003; 148:13-8.

Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Seki N, Ploski R, Fukutani T, Kurylowicz A, Jazdzewski K *et al.* Association of tumor necrosis factor and human leukocyte antigen DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy. *Hum Immunol* 2004; 65: 632-9.

Bednarczuk T, Gopinath B, Ploski R, Wall JR. Susceptibility genes in Graves' ophthalmopathy: searching for a needle in a haystack? *Clinical Endocrinology* 2007; 67: 3-19.

Bois F, Krowech G, Zeise L. Modeling human interindividual variability in metabolism and risk: the example of 4-aminobiphenyl. *Risk Analysis* 1995; 15: 201-13.

Braun J, Donner H, Siegmund T, Walfish PG, Usadel KH, Badenhop K. CTLA-4 promoter variants in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Tissue Antigens* 1998; 51: 563-6.

Buetler TM, Eaton DL. Complementary DNA cloning, messenger RNA expression, and induction of alpha-class glutathione S-transferases in mouse tissues. *Cancer Res* 1992; 52: 14-8.

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

Bufalo NE, Santos RB, Cury NA, Andrade RA, Morari J, Morari EC *et al.* Genetic polymorphisms associated with cigarette smoking and the risk of Graves' disease. *Clin Endocrinol* 2008; 68: 982-7.

Burch HB, Lahiri S, Bahn RS, Barnes S. Superoxide radical production stimulates retroocular fibroblast proliferation in Graves' ophthalmopathy. *Exp Eye Res* 1997; 65: 311-16.

Buzzetti R, Nistico L, Signore A, Cascino I. CTLA-4 and HLA gene susceptibility to thyroid-associated orbitopathy. *Lancet* 1999; 354: 743-44.

Cao Z, Hardej D, Trombetta LD, Li Y. 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* 2003; 3: 165-77.

Carella C, Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Cioffi M, Pilla P *et al.* Serum thyrotropin receptor antibodies concentrations in patients with Graves' disease before, at the end of methimazole treatment, and after drug withdrawal: evidence that the activity of thyrotropin receptor antibody and/or thyroid response modify during the observation period. *Thyroid* 2006 ; 16:295-302.

Cawood T, Moriarty P, O'Shea D. Recent developments in thyroid eye disease. *BMJ* 2004; 329: 385-90.

Cawood TJ, Moriarty C, O'Farrelly C, O'Shea D. Smoking and Thyroid-Associated Ophthalmopathy: A Novel Explanation of the Biological Link 2007; 92: 59-64.

Chistiakov DA, Savost'anov KV, Turakulov RI, Petunina NA, Trukhina LV, Kudinova AV *et al.* Complex Association Analysis of Graves' disease Using a Set of Polymorphic Markers. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000; 70: 214-8.

Coecke S, Vanhaecke T, Foriers A, Phillips IR, Vercruysse A, Shephard EA *et al.* Hormonal regulation of glutathione S-transferase expression in co-cultured adult rat hepatocytes. *J Endocrinol* 2000; 166: 363-71.

Cury NA, Longui CA, Kochi C, Calliari LE, Scalissi N, Salles JE, *et al.* Graves' disease in Brazilian children and adults: lack of genetic association with CTLA-4 49A>G polymorphism. *Horm Res* 2008; 70: 36-41.

Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmatic domains. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1901-5.

DeWolf WC. p53: an important key to understanding urologic cancer. *AUA Update Series* 1995; XIV: 258.

Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R *et al.* CTLA-4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 143-6.

Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am* 1996; 275: 80-7.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003; 33: 357-65.

Farid NR, Stone E, Johson G. Graves' disease and HLA: clinical and epidemiologic associations. *Clinical Endocrinol* 1988; 13: 535-44.

Farid NR, Balazacs C. The genetics of thyroid associated ophthalmopathy. *Thyroid* 1998; 8: 407-9.

Fenton CL, Patel A, Tuttle RM, Francis GL. Autoantibodies to p53 in sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30: 179-83.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57:1083-93.

Forbes G, Gorman CA, Gehring DG, Baker HL Jr. Computer analysis of orbital fat and muscle volumes in Graves' ophthalmopathy. *Am J Neuroradiol* 1983; 4:737-40.

Fourneau JM, Bach JM, Van Endert PM, Bach JF. The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases. *Molec Immuno* 2004; 40:1095-1102.

Frecker M, Stensky V, Balazs C, Kozma L, Kraszits E, Farid NR. Genetic factors in Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol* 1986; 25: 479-85.

Frecker M, Mercer G, Skanes VM, Farid NR. Major histocompatibility complex (MHC) factors predisposing to and protecting against Graves' eye disease. *Autoimmunity* 1988; 1: 307-15.

Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22: 9030-40.

Gerding MN, Van der Meer JW, Broenink M, Bakker O, Wiersinga WM, Prummel MF. Association of thyrotrophin receptor antibodies with the clinical features of Graves' Ophthalmopathy. Clin Endocrinol 2000; 52:267-71.

Gilbertson MK, Haffner GD, Drouillard KG, Albert A, Dixon B. Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. Environ Toxicol Chem 2003; 22:101-10.

Gonzales FW. Molecular genetics of the P450 superfamily. Pharmacol Ther 1990; 45:1-38.

Granja F, Morari EC, Morari J, Correia LAC, Assumpção LVM, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. Cancer Letters 2004; 210:151-7

Guengerich FP. Metabolism of chemical carcinogens. Carcinogenesis 2000; 21: 345-51.

Guidos CJ, Williams CJ, Grandal I, Knowles G, Huang MT, Danska JS. V (D) J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. Genes Dev 1996; 10: 2038-54.

Hägg E, Asplund K. Is endocrine ophthalmopathy related to smoking? Br Med J 1987; 295: 634-5.

Han SZ, Zhang SH, Li R, Zhang WY, Li Y. The common -318C/T polymorphism in the promoter region of CTLA4 gene is associated with reduced risk of ophthalmopathy in Chinese Graves' patients. Int J Immunogenet 2006; 33: 281-7.

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

Hayes JD, Pulford DJ. 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 1995; 30: 445-600.

Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. Pharmacology 2000; 61: 154-66.

Henderson CJ, McLaren AW, Moffat GJ, Bacon EJ, Wolf CR. Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function. *Chem Biol Interact* 1998; 111-112: 69-82.

Heward JM, Allahabadia A, Armitage M, Hattersley A, Dodson PM, Macleod K *et al.* The development of Graves' disease and the CTLA-4 gene on chromosome 2q33. *J Clin Endocrinol* 1999; 84: 2398-401.

Hirvonen A. Genetic factors in individual response to environmental exposures. *JOEM* 1995; 37:37-43.

Hodge SE, Ban Y, Strug LJ, Greenberg DA, Davies TF, Concepcion ES, Villanueva R, Tommer Y. Possible interection between HLA-DRbeta1 and thyroglobulin variants in Graves' disease. *Thyroid* 2006; 16: 351-55.

Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T4, and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANESIII). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:489-99.

Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, *et al.* Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 3551-5.

Hu X, O'Donnell R, Srivastava SK, Xia H, Zimniak P, Nanduri B, *et al.* Active site architecture of polymorphic forms of human glutathione s-transferase P1 accounts for their enantioselectivity and disparate activity in the glutathione conjugation of 7 beta, 8 alpha-dihydroxy- 9 alpha,10 alpha-oxy-7 ,8 ,9 ,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *B Biophys Res Commun* 1997; 235:424-8.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, Mclellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *TIPS* 1999; 20:342-346.

Jacobson DH, Gorman CA. Endocrine ophthalmopathy: current ideas concerning etiology, pathogenesis, and treatment. *Endocr Rev* 1984; 5: 200-20.

Jacobson EM, Tommer Y. The genetic basis of thyroid autoimmunity. *Thyroid* 2007; 17:949-61.

Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Mannervik B. Struture-activity relationships and thermal stability of glutathione transferase p1-1 governed by the h- site residue 105. *J Mol Biol* 1998; 278:687-98.

Jones TS, Yang W, Evans WE, Relling MV. Using HapMap Tools in Pharmacogenomic Discovery: The Thiopurine Methyltransferase polymorphism. *Clinical pharmacology & Therapeutics* 2007; 81: 729-34.

Kacen HH, Bellassoued M, Bougacha-Elleuch N, Abid M, Ayadi H. CTLA-4 gene polymorphisms in Tunisian patients with Graves' disease. *Clinical Immunology* 2001; 101: 361-65.

Kaderlik KR, Kadlubar FF. Metabolic polymorphism and carcinogen-DNA adduct formation in human populations. *Pharmacogenetics* 1995; 5:108-17.

Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Critical Rev Oncol Hematol* 1993; 14: 77-87.

Kendler DL, Lippa J, Rootman J. The initial clinical characteristics of Graves' orbitopathy vary with age and Sex. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 197:-201.

Khoo TK, Bahn RS. Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the role of autoantibodies. *Thyroid* 2007; 17:1013-8.

Kita H, He XS, Gershwin ME. Autoimmunity and environmental factors in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Ann Méd* 2004; 36: 72-80.

Kouki T, Gardine CA, Yanagawa T, Degroot LJ. Relation of three polymorphisms of the CTLA-4 gene in patients with Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 208-13.

Kromer H, Eichelbaum M. Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. *Life Sciences* 1995; 56: 2285-98.

- Kuwabara S. Guillain-barre syndrome. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007 ; 7(1):57-62.
- Lange M, Pelkonen O. Metabolism of xenobióticos and chemical carcinogenesis. In: *Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer*. Lion: IARC Scientific publications 1999; 148:13-22.
- Lee YH, Kim YR, Ji JD, Sohn J, Song GG. P53 codon 72 polymorphism and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28 :2392-4.
- Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. The functional p53 codon 72 polymorphisms is associated with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2005; 14(10):845-5.
- Lehmann GM, Feldon SE, Smith TJ, Phipps RP. Immune mechanisms in thyroid eye disease. *Thyroid* 2008; 18:959-65.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323.
- Lin JH, Lu Ay. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinetic* 1998; 35: 361-90.
- Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV 40 tumor antigen present in SV-tranformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17:43-52.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T. P53–dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74: 957-67.
- Maciel LMZ, Rodrigues SS, Dibbern RS, Navarro PAA, Donadi EA. Association of the HLA-DRB1*0301 e HLA- DQA1*0501 alleles with Graves’ disease in a population representing the gene contribution from several ethnic backgrounds. *Thyroid* 2001; 11: 31-5.
- Mack WP, Stasior GO, Cao HJ, Stasior OG, Smith TJ. The effect of cigarette smoke constituents on the expression of HLA-DR in orbital fibroblasts derived from patients with Graves’ ophthalmopathy. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1999; 15:260-71.

Manji N, Carr-Smith JD, Boelaert K, Allahabadia A, Armitage M, Chatterjee VK *et al*. Influences of age, gender, smoking and family history on autoimmune thyroid disease phenotype. *Journal of Clin Endocrinol* 2006; 91:4873-80.

Marcocci C, Bartalena L, Bogazzi F, Panicucci M, Pinchera A. Studies on the occurrence of ophthalmopathy in Graves' disease. *Acta Endocrinol* 1989; 120: 473-8.

Matos-Santos A, Nobre EL, Costa JG, Nogueira PJ, Macedo A, Galvão Teles, de Castro JJ. Relationship between the number and impact of stressful life events and the onset of Graves' disease and toxic nodular goitre. *Clinical Endocrinol* 2001; 55: 15-9.

McDonnell WM, Scheiman JM, Traber PG. Induction of cytochrome P4501A genes (CYP1A) by omeprazole in the human alimentary tract. *Gastroenterology* 1992; 103:1509-16.

Metcalf RA, Weetman AP. Stimulation of extraocular muscle fibroblasts by cytokines and hypoxia: possible role in thyroid-associated ophthalmopathy. *Clin Endocrinol* 1994; 40:67-72.

Miller MC, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett* 2001; 120:269-80.

Morari EC, Lima AB, Bufalo NE, Leite JL, Granja F, Ward LS. Role of glutathione-S-transferase and codon 72 of P53 genotypes in epithelial ovarian cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132:521-8.

Nakachi K, Hayashi S, Kawajiri K, Imai K. Association of cigarette smoking and CYP1A1 polymorphisms with adenocarcinoma of lung by grades of differentiation. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2209-13.

Nebert DW, Mckinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 1996; 15:273-80.

Nichenametla S, South E, Exon J. 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* 2004; 67: 469-81.

Nussbaum RL, McInnes RR, Huntigton FW. *Genética Médica* 7^a. 2008.

Oude, Ophuis MB, Roelofs H, Brant PA, Peters WHM, Manni, JJ. Polymorphisms of the glutathione s-transferase P1 gene head and neck cancer susceptibility. *Head Neck* 2003; 25: 37-43.

Park YJ, Chung HK, Park DJ, Kim WB, Kim SW, Koh JJ, Cho By. Polymorphism in the promoter and exon 1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans. *Thyroid* 2000; 10: 453-9.

Perros P, Crombie AL, Matthews JN, Kendall-Taylor P. Age and gender influence the severity of thyroid-associated ophthalmopathy: a study of 101 patients attending a combined throid-eye clinic. *Clin Endocrinol* 1993; 38:367-72.

Piga M, Serra A, Boi F, Tanda ML, Martino E, Mariotti S. Amiodarone-induced thyrotoxicosis. A Review. *Minerva Endocrinologica* 2008; 33: 213-28.

Pinchera A, Wiersinga W, Glinoe D, Kendall-Taylor P, Koorneef L, Marcocci C *et al.*. Classification of eye changes of Graves' disease. *Thyroid* 1992; 2: 235- 6

Prummel MF, Wiersinga WM. Smoking a risk factor for hypothyroidism (correction of hyperthyroidism). *J Endocrinol Invest* 1993; 16: 129-31.

Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke.Radicals, hydrogen peroxide, peroxyhydrate and peroxyhydrate. *Ann NY Acad Sci* 1993; 868:12-27.

Rannug A, Alexandrie AK, Persson I, Ingelman-Sunderberg M. Genetic polymorphism of cytochromes P450 1^A1, 2D6 and 2 E1: regulation and toxicological significance. *J Occup Environ Med* 1995; 37: 25-36.

Rekha PL, Ishaq M, Valluri V. A differential association of interferon-gamma high-producing allele T and low-producing allele A (+874 A/T) with Hashimoto's tiroiditis and Graves' disease. *Scand J Immunol* 2006; 64: 438-43.

Rogers AS. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. *J Adolescent Health* 1994; 15: 635-40.

- Roti E, Uberti ED. Iodine excess and hyperthyroidism. *Thyroid* 2001; 11: 493-500.
- Shields PG, Caporaso NF, Falk RT, Sugimura H, Trivers GE, Trump BF *et al.* Lung cancer, race, and CYP1A1 genetic polymorphism. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 1994; 2: 481-5.
- Shields PG. Pharmacogenetics: detecting sensitive populations. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 81-7.
- Spitz MR, Bondy ML. Genetic susceptibility to cancer. *Cancer* 1993; 72: 991-5.
- Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett* 2000; 112-113:357-363.
- Strange RC, Fryer AA. The Glutathione S- Transferase: Influence Of Polymorphism On Cancer Susceptibility. *Iarc Sci Publ* 2001; 148:231-49.
- Stucker I. Genetic polymorphisms of glutathione s-transferase as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1475-81.
- The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437: 1299-1320.
- Thier R, Bruning T, Roos Ph, Golka K, Ko Y, Bolt HM. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: The role of selected Cyp, Nat and Gst genes. *Int J Hyg Environ Health* 2003; 206:149-71.
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423: 506-11.
- Vaidya B, Oakes EJC, Imrie H, Dickinson AJ, Perros P, Kendall-Taylor, Pearce SHS. CTLA-4 gene and Graves' disease: association of Graves' disease with the CTLA4 exon 1 and intron 1 polymorphisms, but not with the promoter polymorphism. *Clinical Endocrinology* 2003; 58: 732-5.

Vaidya B, Pearce S. The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 619-26.

Vestregard P, Rejnmark L, Weeke J, Hoeck HC, Nielsen HK, Rungby J *et al.* Smoking as a risk factor for Graves' disease, toxic nodular goiter, and autoimmune hypothyroidism. *Thyroid* 2002; 12:69-75

Villanueva R, Inzerillo AM, Tomer Y, Barbesino G, Meltzer M, Concepcion ES. Limited genetic susceptibility to severe Graves' ophthalmopathy: no role for CTLA-4 but evidence for an enviromental etiology. *Thyroid* 2000; 10: 791-8.

Vineis P. The ralationship between polymorphisms of xenobiotic metabolinzing enzymes and susceptibility to cancer. *Toxicology* 2002; 181: 457-62.

Wakelkamp IM, Bakker O, Baldeschi L, Wiersinga WM, Prummel MF. TSH-R expression and cytokine profile in orbital tissue of active vs. inactive Graves' ophthalmopathy patients. *Clin Endocrinol* 2003; 58:280-7.

Wang DG, Fan J, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R *et al.* Large-scale identification, mapping, genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280: 1077-82.

Wang XW, Harrys CC. TP53 tumour supressor gene: clues to molecular carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Surv* 1999; 28:169-96.

Weetman AP. Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur J Endocrinol* 2003; 148:1-9.

Werner SC. Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease: recommendations of the Ad Hoc Committee of the American Thyroid Association. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 44: 203-4.

Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Ver Cancer* 2009; 9:95-107.

Wick G, Trieb K, Aquzzi A, Recheis H, Anderl H. Possible role of human foamy virus in Graves' disease. *Intervirology* 1993; 35:101

Wiersinga WM, Bartalena L. Epidemiology and prevention of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2002; 12: 855-60.

Wolf CR. Cytochrome P450s: polymorphic multigene families involved in carcinogen activation. *TIG* 1986; 209-14.

Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 41-5.

Yanagawa T, Taniyama M, Enomoto S, gomi K, Maruyama H, Ban Y, Saruta T. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. *Thyroid* 1997; 7:843-6.

Zhang Q, Yang YM, LV XY. Association of Graves' disease and Graves' ophthalmopathy with the polymorphisms in promoter and exon 1 of cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene. *Journal of Zhejiang Univ Sci B*.2006; 7: 887-91.

