

## ANÁLISE DO PERFIL GENOTÍPICO PARA *CYP* EM PORTADORES DA DOENÇA DE GRAVES

Lucas Leite Cunha, Natássia Elena Búfalo e Laura Sterian Ward

LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER, FCM/UNICAMP

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Palavras-chave: *CYP* - Doença de Graves – tireóide - Marcadores moleculares – Diagnóstico – Prognóstico.

### INTRODUÇÃO

A doença de Graves (DG) é uma síndrome caracterizada por hipertireoidismo, oftalmopatia e mixedema pré-tibial. Decorre de anormalidades imunológicas: interação do anticorpo anti-TSH-R que ativa constitutivamente a célula tiroideana, causando uma situação de hipertireoidismo (DeGROOT, 2007). As causas da DG correspondem a fatores ambos genéticos e ambientais. Xenobióticos são agentes químicos estranhos ao organismo humano. Vários genes que codificam enzimas metabolizadoras foram clonados e caracterizados e, muitos destes, exibem polimorfismos. Estes polimorfismos servem como biomarcadores genéticos para a suscetibilidade a certas patologias e, portanto, podem ajudar a prever risco individual. A enzima *CYP1B1* catalisa, entre outras reações, a formação de 4-hidroxiestradiol a partir de estradiol (CANEVARI & ROGATTO, 2004) e está relacionado à ativação de aflotoxinas B1 a metabolitos mutagênicos, bem como à formação de intermediários mutagênicos de uma série de PAHs, (AUTRUP, 2000) e nesta função, *CYP1B1* aparenta ser mais ativo que *CYP1A1*. O objetivo da nossa pesquisa foi estudar a prevalência dos polimorfismos *CYP1A1m1*, *CYP1B1* \*3 e *CYP1B1* 119Ser em pacientes com DG comparando com indivíduos sadios, pareados para idade, sexo e exposição ambiental.

### METODOLOGIA

O projeto foi aprovado devidamente pelo Comitê de Ética e Pesquisa. Para inferência do perfil genotípico dos indivíduos, usou-se pequenas alíquotas de sangue periférico de pacientes e controles. Seguiu-se a hemólise de hemácias e extração de DNA por método convencional de fenol-clorofórmio. O seguimento gênico correspondente a cada polimorfismo foi amplificado por reação de PCR e análise da presença ou ausência do polimorfismo através da RFLP por enzimas de restrição específica. Em todas as PCRs foram feitos 30 ciclos com temperatura de extensão de 72°C a 1 minuto com uma extensão final a 10 minutos. As particularidades de cada reação constam na tabela 1. As restrições enzimáticas foram feitas todas a 37°C por 16 horas.

Tabela 1: Particularidades das reações de PCR e Restrição enzimática

Gene	Primeres	T° Anel.	Δt Anel.	Ciclos	Fragmentos
<i>CYP1B1</i> codón 432	S: CAGGCAGAATTGGATCAGG AS: TCATCACTCTGCTGGTCAGG	60,5 °C	45s	30	C (polimorfico): 247 e 69 pb G (selvagem): 316 pb
<i>CYP1B1</i> codón 119	S: TAAACCCGCTGTCCATCCA AS: GAGTAGTGGCCGAAAGCCAT	60 °C	45s	30	T (polimorfico): 376 pb G (selvagem): 318 e 58 pb
<i>CYP1A1</i>	S: CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT AS: TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT	60 °C	1min.	35	C (polimorfico): 200 e 140 pb T (selvagem): 340 pb

## RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na genotipagem de *CYP1B1* encontram-se representados na tabela 2, que resume nossos resultados. Quanto aos genótipos de *CYP1B1* códon 432, combinando os resultados dos heterozigotos e homozigotos variantes em uma única classe que reúne as variantes gênicas, chamada “variante”, pode-se observar diferenças significativas entre o genótipo homozigoto selvagem e o variante quanto à incidência de DG ( $p= 0,0047$ ; O.R.= 2,195; 95% IC= 1,273-3,783). A herança de variantes do gene *CYP1B1* aumenta a chance de um indivíduo desenvolver DG em mais de 2 vezes. Não houve relação entre o polimorfismo do códon 119 e a incidência de DG ( $p= 0,1083$ ; O.R.= 1,465; 95% IC= 0,9340-2,296). Da mesma forma, o genótipo heterozigoto para *CYP1A1* aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de DG se comparado ao normal ( $p= 0,0010$ ; O.R.= 2,114; 95%IC= 1,353-3,302). A junção dos genótipos heterozigoto e homozigoto variante em uma mesma classe dita “variante”, se comparada ao genótipo homozigoto selvagem, promove maior suscetibilidade ao desenvolvimento de DG ( $p=0,0033$ ; O.R.=1,971; 95% IC= 1,254-3,098), ajustando-se para sexo, idade e etnia. Nosso estudo comprovou que as variantes *CYP1B1* \*3 e *CYP1A1*m1 estão associadas à DG, sendo bons marcadores de desenvolvimento desta doença. O uso deste e de outros marcadores pode facilitar o diagnóstico para casos confusos além de poder fornecer uma informação prévia ao indivíduo se o mesmo tem maior ou menor suscetibilidade a desenvolver DG. Embora não tenhamos achado relação destes polimorfismos e o sexo, outros estudos indicam que a incidência diferencial de DG e outras doenças da tiróide entre homens e mulheres poderia ser explicado através de mais estudos em outros genes relacionados à síntese e degradação de estrógeno (KURYLOWICZ & BADENHOOP, 2005).

Tabela 2: Perfil genotípico de *CYP1B1* e *CYP1A1*. *CYP1B1* codón 432 e *CYP1A1*, são significativamente associado ao desenvolvimento de DG.

Gene	Genótipo	Frequência (%) de casos	Frequência (%) de controle	P	O.R.
<i>CYP1B1</i> codón 432	Homozigoto Selvagem	25,18	35,91	<b>0,0047</b>	2,195
	Heterozigoto	59,71	40		
	Homozigoto alterado	15,11	24,09		
<i>CYP1B1</i> codón 119	Homozigoto Selvagem	37,74	39,07	0,1083	1,465
	Heterozigoto	49	49		
	Homozigoto alterado	13,26	11,93		
<i>CYP1A1</i>	Homozigoto Selvagem	44,44	62,45	<b>0,0033</b>	1,971
	Heterozigoto	52,14	34,66		
	Homozigoto alterado	3,42	2,89		

## CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo são úteis no cenário da endocrinologia e genética contemporâneas, como afirmado por autores na literatura (WARD & ASSUMPCÃO, 2004), nas quais nota-se que a pesquisa científica voltada para o estudo de doenças da tiróide têm buscado marcadores moleculares que possam melhorar a qualidade do diagnóstico e/ou

indicar o prognóstico do paciente, de forma que se viabilize atenção médica diferencial a pacientes suscetíveis a fatores de melhor ou pior prognósticos.

#### REFRÊNCIAS

DeGroot, L.J. Chapter 10. Graves' Disease and the Manifestations of Thyrotoxicosis. Disponível na Internet. <http://www.thyroidmanager.org/Chapter10/10-frame.htm>. 2 abril 2007.

Brix, T.H.; Kyvik, K.O.; Christensen, K.; Hegedüs, L. Evidence for a Major Role of Heredity in Graves' Disease: A Population-Based Study of Two Danish Twin Cohorts. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* v.86, n. 2, p.930-934. feb 2001.

Canevari R de A, Rogatto SR. Câncer de Cabeça e Pescoço. In: *Oncologia Molecular* Ferreira, C. G.; Rocha, J.C.C. *Oncologia Molecular*. 1.ed. Rio de Janeiro, Editora Atheneu, 2004. Cap.19, p. 189-201.

Astrup, H. Genetic polymorphism in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors intoxic response. *Mutation Research*. v.464, n.1, p.65-76. Jan 2000.

Kurylowicz, A.; Badenhop, K. CYP27B1 gene polymorphism is associated with Graves' disease in a Polish population study. *Thyroid, Polônia*, v. 15, n. 9, p. 1107-8, set. 2005.

Ward, L.S.; Assumpção, L.V. Thyroid cancer: prognostic factors and treatment. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, Campinas, Brasil, v. 48, n. 1, p. 126-36, fev. 2004.