

RAQUEL BUENO BARBIERI

**PERFIL GENÉTICO DE SUSCETIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DE
CARCINOMA MEDULAR DE TIREOIDE**

Campinas

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

PERFIL GENÉTICO DE SUSCETIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DE
CARCINOMA MEDULAR DE TIREOIDE

Raquel Bueno Barbieri

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, Área de concentração em Ciências Básicas. Sob orientação da Profa. Dra. Laura Sterian Ward e co-orientação da Profa. Dra. Janete Cerutti

Campinas, 2012

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

B234p Barbieri, Raquel Bueno, 1985 -
Perfil genético de suscetibilidade ao
desenvolvimento de carcinoma medular de tireoide /
Raquel Bueno Barbieri. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Laura Sterian Ward.

Coorientador : Janete Cerutti.

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

1. Tireóide-câncer. 2. Neoplasia endócrina
múltipla. 3. Oncogenes. I. Ward, Laura Sterian. II.
Cerutti, Janete. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. VI. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Profile of genetic susceptibility to the development of medullary thyroid carcinoma.

Palavra-chave em inglês:

Thyroid neoplasms

Multiple endocrine neoplasia

Oncogenes

Área de Concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Laura Sterian Ward [Orientador]

Ana Luiza Maia

Carlos Takahiro Chone

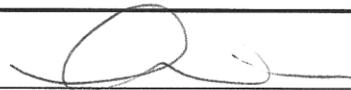
Data da defesa: 05-03-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Raquel Bueno Barbieri

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

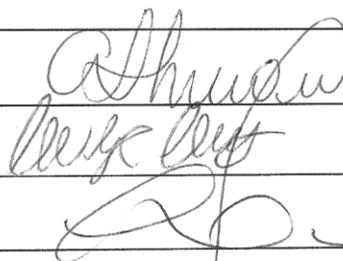


Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Ana Luiza Silva Maia

2. Prof. Dr. Carlos Takahiro Chone

3. 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: 05/03/2012

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Gilmar e Ana Rosa, por sempre terem investido em mim. Pelo apoio, estímulo, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história para que eu me tornasse quem sou hoje.

À minha irmã Laís, por estar ao meu lado sempre, apesar da distância. Por desejar o meu melhor e se orgulhar de mim.

Ao meu marido Paulo César, que me acompanhou e me ajudou em tudo e sempre acreditou em mim.

À Dra. Laura, por ter acreditado em mim e investido na minha vida como futura pesquisadora. Pela oportunidade que me ofereceu e pelo tempo que a mim dedica.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de todas as coisas, pois é a razão de tudo!

À minha orientadora, Profa. Dra. Laura Sterian Ward, agradeço por me permitir fazer parte de seu grupo, por sua disponibilidade, por todos os ensinamentos, apoio, incentivo e compreensão.

Aos colegas do Laboratório GEMOCA: Natássia, Aline Carolina, Angélica, Elaine, Jacqueline, Marjory, Mariana, Fernando, Lucas, Renata, Ulieme e Helvia. Agradeço pelos momentos juntos, pela paciência, ensinamentos e compreensão.

À Dra. Janete Cerutti, minha co-orientadora, por seu apoio, paciência, sabedoria e grande colaboração. Sem sua participação e ajuda esta dissertação não seria possível.

À Dra. Lígia Vera Assumpção, chefe do Ambulatório de Tumores da Tireoide do Hospital das Clínicas da UNICAMP, por permitir meu acesso ao ambulatório, aos pacientes e aos dados, se mostrando disponível para me ajudar e permitindo a realização deste estudo.

A todos do Laboratório de Endocrinologia Molecular da UNIFESP, especialmente ao Dr. Rui Maciel, pelos incentivos, críticas, sugestões e, principalmente, por abrir as portas de seu laboratório para que fizéssemos uma parceria essencial para que este estudo se desenvolvesse. Obrigada pela ajuda e carinho!

A todo o pessoal dos laboratórios vizinhos, pelas inúmeras ajudas, colaborações e paciência, especialmente Viviane, Luísa, Helen e Fábio Conte.

A todos os pacientes e voluntários que, doando um pouco de si, tiveram o desprendimento e a generosidade de, possivelmente, ajudar não a si mesmos, mas a outros.

À Profa. Dra. Adriana Madeira, uma excelente professora e uma das fortes responsáveis e incentivadoras à minha entrada no mundo da pesquisa e também por ter me dado a primeira oportunidade de estar num laboratório de pesquisa. Por me dar exemplos de ética e dedicação ao trabalho. Suas palavras de carinho e incentivo são sempre lembradas!

À FAPESP e a CAPES, pois sem o apoio financeiro e a bolsa, este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

A toda a minha família, tios, tias, primos, primas e avós, que torceram por mim e, como grande família, sempre estiveram presentes quando mais precisei.

À minha mãe, Ana Rosa, por ter se dedicado a vida toda ao meu crescimento, sonhado mais este sonho comigo, e ter participado de todos os momentos. Pelos seus conselhos sempre fundamentais em minha formação como pessoa.

Ao meu pai, Gilmar, por sempre ter me incentivado com os estudos e ter sonhado com minha vida acadêmica, até mesmo antes de mim. Obrigada por ser meu exemplo e porto seguro.

À minha irmã, Laís, por compreender meus momentos de mau humor e ausência, e por tornar a minha vida mais gostosa de ser vivida.

Ao meu marido, Paulo César, por ter dividido este sonho comigo, por seu amor, carinho e paciência. Por sempre me ouvir, tendo me incentivado, encorajado e me mostrado que eu era capaz de superar as dificuldades. Muito obrigada. Amo Você!

Aos meus avós, Zezinho e Nadir, que estiveram comigo em todos os momentos com grandes conselhos que me ajudaram a crescer. Por sempre orarem, torcerem e vibrarem por mim.

Às minhas amigas do CUFSA, Nicole Tavian e Fabíola Mamede, por me aguentarem por cinco anos durante as aulas da faculdade e por terem me incentivado a seguir em frente e me dado tanto apoio, conselhos e carinho quanto podiam. Se hoje cheguei até aqui, vocês também são responsáveis por isso. Obrigada, minhas amigas!

Às minhas irmãs de coração, Natália Pessoa e Thaís Carrascosa, por terem me ensinado a ver a vida de uma forma mais agradável, por terem me proporcionado experiências impagáveis e momentos inesquecíveis, cheios de amizade e muito carinho, e por estarem comigo nos piores e nos melhores momentos. Obrigada. Amo Vocês Amigas!

Às minhas amigas, Simone Sobral e Berenice Miguel, pelas conversas, orações e bons momentos que passamos juntas que sempre me ajudaram a seguir em frente.

À minha querida amiga de infância, Mariana Wood, por me permitir preservar a minha essência e por acreditar em minha capacidade sempre. Que mesmo longe sempre esteve comigo. Amigas para sempre!

"Não que sejamos capazes, por nós, de pensar alguma coisa;
mas a nossa capacidade vem de Deus"

II Coríntios 3:5

RESUMO

Polimorfismos de genes baixa penetrância têm sido consistentemente associados com a suscetibilidade a uma série de tumores humanos, incluindo o câncer de tireoide. A fim de determinar seu papel no carcinoma medular de tireoide (CMT), foi utilizado o método *TaqMan® SNP Genotyping* em 138 pacientes com CMTH, 47 pacientes com CMT-s e um grupo controle de 578 indivíduos para genotipagem dos polimorfismos *CYP1A2*F* (rs762551), *CYP1A1m1* (rs4646903), *NAT2 C282T* (rs1041983), *GSTP1 codon 105* (rs1695), *TP53 codon 72* (rs1042522). Este estudo demonstrou uma associação entre a presença de alelos polimórficos de *CYP1A2*F*, *GSTP1* e *NAT2* e o desenvolvimento de CMTH. A herança do alelo C em homozigose do gene *CYP1A2*F* influencia o desenvolvimento de CMTH em mais de 2 vezes. Pacientes que apresentaram o alelo T em homozigose para o gene *NAT2* possuem uma probabilidade 3 vezes maior para o desenvolvimento de CMTH e os indivíduos que herdaram o alelo G do gene *GSTP1* em homozigose apresentam maior probabilidade de desenvolvimento de CMTH. Uma análise estatística de regressão logística, ajustada para sexo, idade, etnia, tabagismo e os genes *CYP1A*F*, *CYP1A1m1*, *NAT*, *GSTP1* e *TP53* para os pacientes com CMTH demonstrou que, quando considerado o tamanho do tumor como estimativa de agressividade, o sexo masculino apresentou-se como fator de proteção ao aumento do tamanho do tumor (OR=0,12; p=0,0072). Considerando a recidiva local como estimativa de agressividade, o genótipo alterado do gene *GSTP1* apresentou-se como fator de risco para presença de recidiva local (OR=1,17; p=0,035). A análise de regressão logística mostrou que a herança do genótipo C/C dos genes *NAT2* (OR=3,87; IC95%=2,11-7,10; p=2,2x10⁻⁵) e *TP53* (OR=3,87 IC95%=1,78-6,10; p=2,8x10⁻⁴) aumentou o risco de CMT-s. Uma análise de regressão indicou que o genótipo C/C do gene *TP53* contribui com 8,07% do risco CMT-s. Não foi possível identificar qualquer relação entre os polimorfismos de *NAT2* e *TP53*, sugerindo que são fatores independentes de risco para o CMT-s. Em conclusão, foi demonstrado que os genes de detoxificação e genes de apoptose e controle do ciclo celular estão envolvidos na suscetibilidade ao desenvolvimento de CMT-s e CMTH e podem modular a suscetibilidade à doença.

ABSTRACT

Polymorphisms in low penetrance genes have been consistently associated with susceptibility to a variety of human tumors, including thyroid cancer. In order to determine its role in medullary thyroid carcinoma (MTC) TaqMan® SNP Genotyping method was used in 138 patients with HMTc, 47 patients with MTC-s and a control group of 578 for genotyping of polymorphisms *CYP1A2*F* (rs762551), *CYP1A1m1* (rs4646903), *NAT2 C282T* (rs1041983), *GSTP1 codon 105* (rs1695) and *TP53 codon 72* (rs1042522). This study demonstrated an association between the presence of polymorphic alleles of *CYP1A2 F*, *GSTP1* and *NAT2* and the development of HMTc. The legacy of the C allele in homozygous *CYP1A2*F* gene influences the development of CMTH in more than two times. Patients who had the T allele in homozygous for the *NAT2* gene have a three times more likely to develop HMTc and individuals who have inherited the G allele of *GSTP1* gene in homozygous are more likely to develop CMTH. A statistical analysis of logistic regression, adjusted for sex, age, ethnicity, smoking and genes *CYP1A*F*, *CYP1A1m1*, *NAT*, *GSTP1*, and *TP53*, in patients with HMTc, showed that, when considering the size of the tumor as an estimate of aggression, sex male presented himself as a protective factor to the increase in tumor size (OR=0.12; p=0.0072). Considering the estimate of local recurrence and aggressiveness, the altered gene *GSTP1* genotype appeared as a risk factor for presence of local recurrence (OR=1.17; p=0.035). The logistic regression analysis showed that the genotypes of the *NAT2* gene C/C (OR=3.87; 95%CI=2.11-7.10, p=2.2x10⁻⁵) and *TP53* C/C (OR=3.87; 95%CI=1.78-6.10; p=2.8x10⁻⁴) inheritance increased the risk of sporadic MTC. A regression analysis showed that genotype C/C *TP53* gene accounts for 8.07% of sporadic MTC risk. In addition, there was no association between the investigated genes and clinical or pathological features of aggressiveness of the tumors or the outcome of MTC patients. In conclusion, we demonstrated that detoxification genes and apoptotic and cell-cycle control genes are involved in the susceptibility of MTC-s and HMTc and may modulate the susceptibility to the disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ah – Do inglês, *Aryl hidrocarbon*

CDKN1B – Do inglês, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)*

CDT – Carcinoma Diferenciado de Tireoide

CMT – Carcinoma Medular de Tireoide

CMTH – Carcinoma Medular de Tireoide Hereditário

CMT-s – Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico

CYP – Do inglês, *Cytochrome P450*

CYP1A1m1 – Do inglês, *Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*

*CYP1A2*F* – Do inglês, *Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2*

GST – Do inglês, *Glutathione S-transferase*

GSTP1 – Do inglês, *Glutathione S-transferase pi 1*

HAPs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

NAT – Do inglês, *N-acetyltransferase*

NAT2 – Do inglês, *N-acetyltransferase 2*

NEM – Neoplasia Endócrina Múltipla

RET – Do inglês, *Rearranged during Transfection*

SNPs – Do inglês, *Single Nucleotide Polimorphysm*

TNM – Tumor, Nódulo e Metástase

TP53 – Do inglês, *Tumor Protein p53*

TSH – Hormônio Estimulante da Tireoide

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da relação entre a mutação do gene *RET* e o fenótipo associado, de acordo com as recomendações da *American Thyroid Association* (ATA). Adaptado de Kloos, et al., 2009 20

Figura 2: Esquema do mecanismo de interação entre os diversos sistemas de detoxificação e de reparo do DNA 27

Gráfico 1: Relação entre o tamanho do tumor e a presença do polimorfismo do gene *GSTP1* comparados com sexo feminino e masculino 42

Gráfico 2: Porcentagem de pacientes que possuem ou não recidiva local com relação à presença de polimorfismo do gene *GSTP1* 43

Figura 3: Análise *Stepwise Regression* em pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico (CMT-s) 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados para o sequenciamento do gene RET	37
Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes com Carcinoma Medular da Tireoide Hereditário (CMTH) em comparação com o grupo controle	38
Tabela 3 – Características da genotipagem dos 138 pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Hereditário (CMTH) em relação ao grupo controle	39
Tabela 4 – Análise de regressão logística da associação entre os diferentes genótipos e <i>Odds Ratio</i> (OR) para o desenvolvimento de Carcinoma Medular da Tireoide Hereditário (CMTH)	41
Tabela 5 – Características clínicas dos pacientes com Carcinoma Medular da Tireoide Esporádico (CMT-s) em comparação com o grupo controle	44
Tabela 6 – Características da genotipagem dos 47 pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico (CMT-s) em relação ao grupo de controles	45
Tabela 7 – Análise de regressão logística da associação entre os diferentes genótipos e <i>Odds Ratio</i> (OR) para risco de desenvolvimento de Carcinoma Medular da Tireoide Esporádico (CMT-s)	46

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 O Carcinoma Medular de Tireoide (CMT)	18
1.2 O CMT e sua relação com o gene <i>RET</i>	19
1.3 Outros determinantes de risco em tumores da tireoide	22
1.4 Genes de baixa penetrância no CMT	24
1.4.1. Genes codificadores de enzimas de fase I e de fase II	24
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
3.1 Pacientes	31
3.2 Extração de DNA	32
3.3 Sequenciamento do gene <i>RET</i>	32
3.4 Técnica SNP Taqman® Genotyping	33
3.5 Análise Estatística	34
4. RESULTADOS	36
4.1 Resultados para pacientes com CMTH	37
4.2 Resultados para pacientes com CMT-s	44

5. RESUMO DOS ACHADOS	48
5.1 Investigar a influência dos polimorfismos <i>CYP1A2*F</i> (rs762551), <i>CYP1A1m1</i> (rs 4646903), <i>NAT2 C282T</i> (rs1041983), <i>GSTP1 codon 105</i> (rs 1695), <i>TP53 codon 72</i> (rs 1042522) na suscetibilidade ao Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico e Hereditário	49
5.2 Verificar se os polimorfismos estudados se relacionam com fatores clínicos reconhecidamente envolvidos na evolução dos pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico e Hereditário	49
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS	62
9. ANEXOS	68

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Carcinoma Medular da Tireoide (CMT)

Indicadores de incidência de câncer do mundo todo mostram que o número de pacientes com câncer da tireoide tem aumentado (1). Estima-se que 48.020 homens e mulheres norte-americanos (11.740 homens e 36.550 mulheres) serão diagnosticados com Carcinoma Diferenciado de Tireoide (CDT) e 1.740 morrerão desta doença em 2012 (1-2). Embora a melhora dos métodos de detecção e o acesso a sistemas de saúde mais eficientes sejam fatores inegáveis de tal aumento, existem indícios de que outros fatores, incluindo fatores ambientais, também vêm contribuindo (1, 3). Estima-se que tenhamos no Brasil 10.590 novos casos de câncer da tireoide em 2012.

Cerca de 5 a 30% dos pacientes evoluem com recorrência e morrem devido ao câncer num período de 20 anos (4). O Carcinoma Medular de Tireoide (CMT) é um dos cânceres da tireoide que mais contribuem para tal mortalidade (1)

A prevalência do CMT entre os cânceres da tireoide varia de 3% a 8% em diferentes populações, mas representa 13,4% das mortes atribuídas ao câncer de tireoide (5-6).

A identificação de mutações germinativas no gene *RET* (*Rearranged during Transfection*) diferencia o CMT Esporádico (CMT-s) da forma hereditária ou familiar da doença, que é responsável por 20-25% dos casos, ocorrendo em uma proporção de um caso para cada 30.000 indivíduos (5-6). A forma hereditária do

CMT pode ocorrer de forma isolada, como o CMT Familiar (CMTF), ou como parte de neoplasias, como a Neoplasia Endócrina Múltipla (NEM) tipo 2A (NEM2A) e/ou 2B (NEM2B). Atualmente, testes genéticos para identificação de mutações no gene *RET* oferecem a possibilidade de terapia bem sucedida, pois a detecção da mutação permite a extirpação da glândula tireoide antes que a neoplasia sequer se desenvolva. Além disso, o rastreamento genético de pacientes com aparente CMT-s permite a identificação de uma porcentagem relevante de CMT Hereditário (CMTH) e/ou diagnóstico pré-clínico e o tratamento imediato da suspeita de membros familiares afetados (7).

1.2 O CMT e sua relação com o gene *RET*

A heterogeneidade clínica do CMTH está principalmente associada a diferentes mutações no proto-oncogene *RET*, as quais resultam em ativação constitutiva do receptor de membrana tirosina-quinase (7-8). A identificação das mutações no gene *RET* é de extrema relevância clínica, pois elas guardam estreita correlação com o fenótipo que determinam. Devido às diferenças apresentadas entre elas em termos de prognóstico, a conduta cirúrgica, a necessidade de um rastreamento familiar, o aconselhamento genético e o tipo de seguimento das formas hereditárias, dependem da classe de mutação detectada (9).

A Figura 1 resume a relação entre a mutação genética no gene *RET* e a apresentação clínica do paciente.

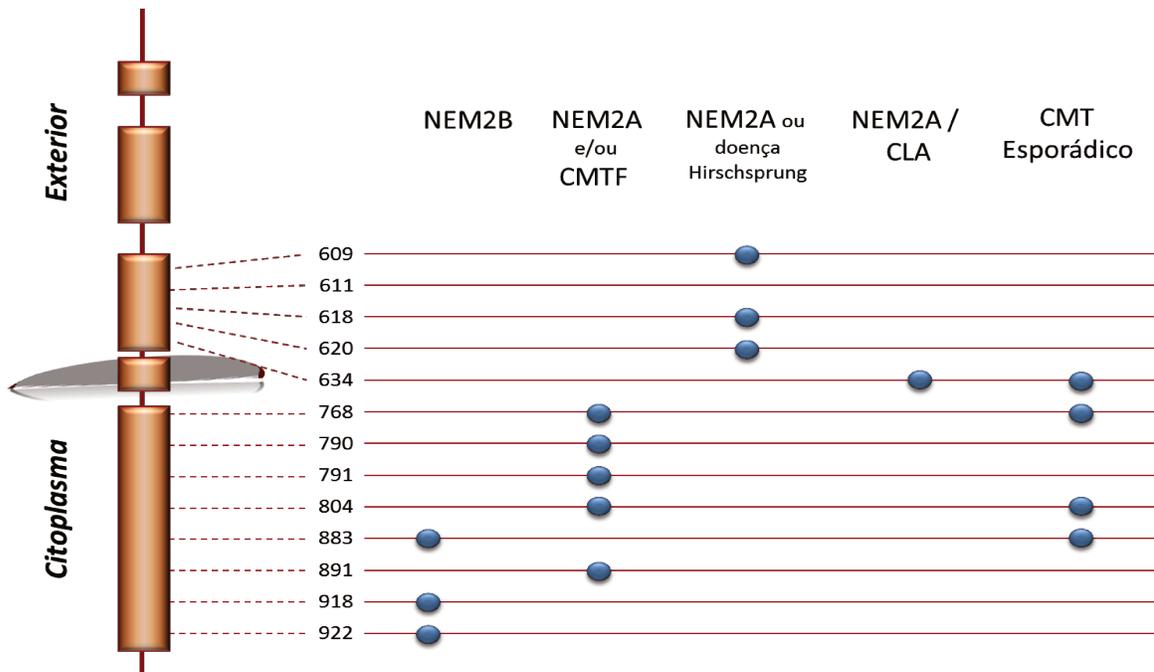


Figura 1: Representação da relação entre a mutação do gene *RET* e o fenótipo associado de acordo com as recomendações da *American Thyroid Association* (ATA) (9). Adaptado de Kloos *et al.*, 2009

Ainda, a variabilidade na apresentação clínica está relacionada não apenas às mutações específicas, acima representadas, mas também tem sido associada à presença de polimorfismos no gene *RET* (10-11). Vários estudos sugerem que polimorfismos no gene *RET* podem atuar como modificadores genéticos e afetar a suscetibilidade à doença e o fenótipo clínico, tanto em pacientes com CMT

esporádico como hereditário (10-11). No entanto, o papel dos polimorfismos de *RET* na predisposição ao CMT permanece controverso.

Em um estudo com uma grande família de brasileiros portadores da mutação G533C no éxon 8 do gene *RET*, Tamanaha *et al* (11) mostraram que indivíduos que possuíam a variante IVS1-126 G>T do gene *RET* apresentavam uma média de idade ao diagnóstico de 39 anos, enquanto pacientes sem este SNP recebiam o diagnóstico com idade média de 49 anos. Outro polimorfismo, o L769L, também foi associado ao aparecimento de CMT em idade precoce (12). O haplótipo G691S/S904S na forma homozigótica também foi observado como mais prevalente entre os pacientes com CMT-s do que em um grupo controle e os mesmos autores observaram que homozigotos para este polimorfismo apresentavam a doença mais precocemente que os pacientes heterozigotos (13). Elisei *et al* (14) também demonstraram uma associação entre o polimorfismo G691S e o CMT-s.

Diferenças na etnia também podem ser uma das causas para os diferentes resultados de apresentação clínica descritos, pois diferentes atributos genéticos podem conferir proteção ou risco para o desenvolvimento do câncer (15). Uma maior frequência dos polimorfismos localizados nos éxons 11, 13, 14 e 15 é descrita em pacientes com CMT provenientes de países americanos e europeus (15). Estudos indicam que a variante S836S do gene *RET* está associada com risco aumentado para a doença metastática em indivíduos com idade jovem que tenham MEN2A ou CMT-s. E sugerem que, se confirmados estes resultados em

amostras de outras populações, estas descobertas podem ter implicações significativas na gestão do CMT, especialmente sobre a definição do momento ideal para intervenção profilática em portadores de alteração neste gene (16).

O papel dos polimorfismos de *RET* na predisposição ao CMT permanece controverso. Ao contrário, outro estudo analisou a presença dos polimorfismos L769L e S836S em pacientes franceses com CMT-s e verificou que não houve variação na distribuição dos polimorfismos entre os grupos casos-controle (13).

Outras mutações, como deleção e inserção, também foram identificadas em alguns pacientes com CMT-s, porém em uma frequência menor, e nenhuma delas foi consistentemente associada à apresentação clínica dos pacientes (17).

Diretrizes modernas tentam determinar o momento e a extensão da cirurgia de acordo com a agressividade e a idade de início do CMTH, o que difere de acordo com a mutação genética específica. No entanto, mesmo em pacientes com a mesma mutação no gene *RET*, há considerável variabilidade fenotípica, sugerindo que outros fatores determinantes de risco sejam importantes (11-12, 14).

1.3 Outros determinantes de risco em cânceres

O câncer é, reconhecidamente, um processo evolutivo causado pela interação entre gene e ambiente (18). Somos constantemente expostos a uma crescente lista de compostos químicos carcinogênicos, raios UV e radiação

ionizante, entre outros agentes tóxicos encontrados no ambiente (19). Além disso, compostos eletrofílicos, radicais livres e uma série de produtos de nosso próprio metabolismo podem causar danos a nossas células quando inapropriadamente metabolizados, inadequadamente eliminados ou produzidos em excesso (20-21). A probabilidade de desenvolvimento do câncer depende da resposta natural de cada organismo às diferentes exposições a agentes agressores diversos (20, 22).

Muitos polimorfismos de genes que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de carcinógenos vêm sendo estudados em busca de uma possível associação com o risco para o desenvolvimento de câncer (23-26).

Os seres humanos possuem diferentes suscetibilidades a diferentes carcinógenos (22, 27). A base bioquímica para tal variação de suscetibilidade aos diversos agressores ambientais está relacionada a polimorfismos genéticos que normalmente ocorrem na população, em especial nos genes envolvidos na predisposição específica para câncer, ativação metabólica ou detoxificação de agentes tóxicos ambientais, controle do reparo de DNA ou dano celular (22, 27-30). Destaca-se neste último grupo o gene *TP53*, cuja função é controlar o ciclo celular e um importante indutor de apoptose. Este gene tem um importante papel na regulação da célula em resposta a estresse, exerce sua ação antiproliferativa por indução reversível ou irreversível (senescência) parando o ciclo celular, além de poder reparar o DNA e inibir angiogênese (31).

1.4 Genes de Baixa Penetrância no CMT

Alguns estudos sugerem que os polimorfismos do gene *RET*, talvez combinado com outros genes de baixa penetrância, poderiam explicar a variabilidade fenotípica (7, 32). Mais recentemente, o polimorfismo V109G do gene *CDKN1B* foi associado com uma progressão mais favorável do CMT-s que o alelo do tipo selvagem, sugerindo um papel adicional para genes de baixa penetrância no prognóstico de pacientes com CMT (32). Na verdade, os genes polimórficos de baixa penetrância têm sido consistentemente associados com o fenótipo de uma série de tumores humanos, incluindo carcinoma diferenciado da tireoide (23-26).

Um número crescente de genes que codificam enzimas envolvidas na biotransformação de substâncias tóxicas foi identificado e clonado, levando a um maior conhecimento das variantes alélicas de genes e defeitos genéticos que podem resultar em uma suscetibilidade diferencial em relação a elementos ambientais. Além disso, polimorfismos em genes de baixa penetrância tendem a ser muito mais comuns na população do que variantes alélicas de genes de alta penetrância relacionados ao câncer. Por essa razão, esses genes são de considerável importância do ponto de vista de saúde pública (27).

1.4.1. Genes codificadores de enzimas de fase I e de fase II

A maioria dos agentes tóxicos requer ativação metabólica antes de se ligar ao DNA, ao RNA e às proteínas. Por isso, as variações nos processos de ativação

e detoxificação de compostos químicos e drogas desempenham um importante papel na resposta orgânica (33). Distúrbios no equilíbrio desses processos podem explicar a variabilidade na resposta individual à exposição a tais compostos (34).

Existem duas formas de metabolização de compostos tóxicos no organismo humano: a metabolização mediada pelas oxidases de função mista – ou de Fase I – e aquela mediada pelas enzimas de conjugação – ou de Fase II. Muitos compostos, tais como os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs), as nitrosaminas e várias drogas medicamentosas, são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas da Fase I, que são principalmente enzimas da família do citocromo P450 (CYPs) (35). Assim, com a introdução de um ou mais grupamentos hidroxila ao substrato, um pró-carcinógeno pode tornar-se carcinogênico, como ocorre quando o benzopireno é convertido em epóxido de benzopireno, composto altamente reativo (35).

Já as reações da Fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) através das glutathiona S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como inativadores dos produtos da Fase I, tornando-os metabólitos mais hidrofílicos e, portanto, passíveis de excreção (36).

A maioria dos carcinógenos aos quais estamos expostos durante a nossa vida é metabolizada pela família de enzimas do citocromo P450, incluindo os genes *CYP1A2*F* e *CYP1A1m1*, entre outros (37).

Os produtos das enzimas de fase II se rendem à ação de enzimas que podem promover a detoxificação e excreção destes compostos na bile ou na urina (18, 21, 26). Se essa detoxificação não acontece ou é incompleta, essas substâncias tóxicas podem causar danos genéticos por diferentes processos de interação com o DNA, desencadeando um processo de carcinogênese. Diferentes perfis genéticos herdados podem fornecer proteção específica ou determinar um risco para o desenvolvimento de um tipo de câncer em particular. Junto com fatores ambientais, o que provavelmente serve como gatilho de doença, este perfil herdado de detoxificação e reparo de sistemas pode modular o fenótipo específico de cada paciente (37) (Figura 2).

Portanto, a regulação e a expressão das enzimas de fase I e II, assim como seu equilíbrio metabólico na célula, podem ser importantes na determinação da suscetibilidade a doenças relacionadas à exposição a agentes tóxicos (18).

Além disso, polimorfismos de enzimas metabolizadoras de xenobióticos podem ser utilizados como marcadores de suscetibilidade toxicológica, como o nosso grupo e outros têm demonstrado em carcinomas de tireoide e muitos outros tumores humanos (37).

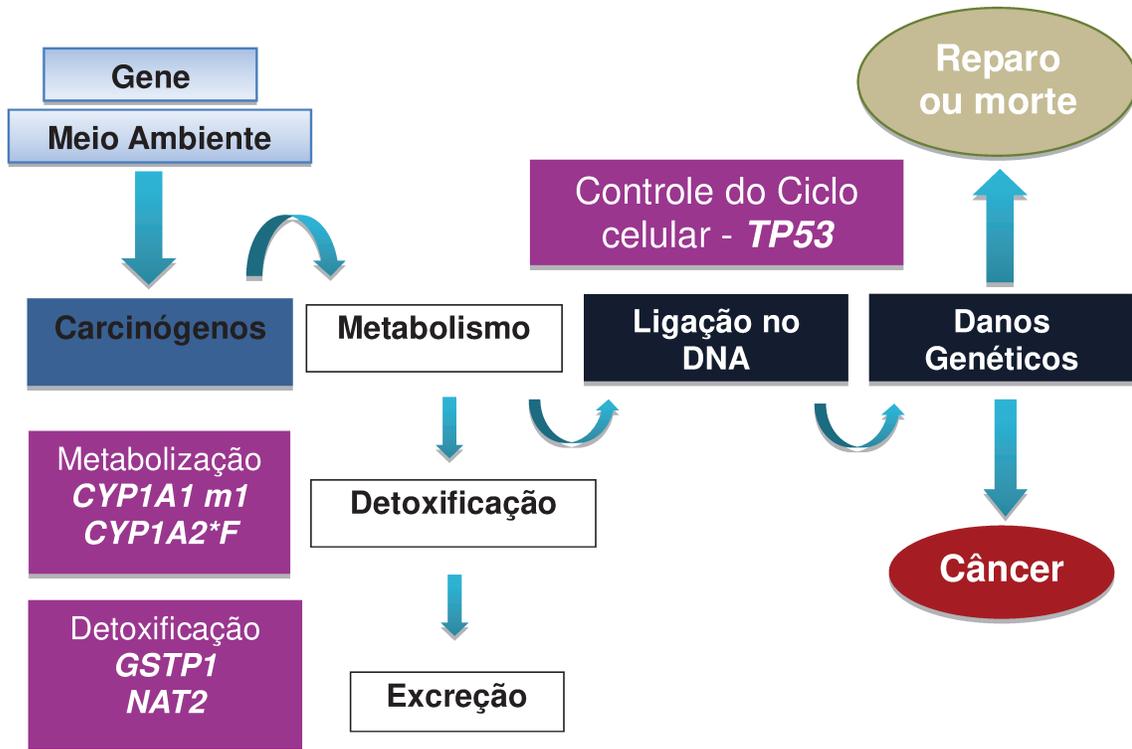


Figura 2: Esquema do mecanismo de interação entre os diversos sistemas de detoxificação e de reparo do DNA

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a presença de sequências polimórficas de genes de baixa penetrância que poderiam estar associados à suscetibilidade para o desenvolvimento ou modificar a evolução do Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico e Hereditário.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a influência dos polimorfismos *CYP1A2*F* (rs762551), *CYP1A1m1* (rs4646903), *NAT2 C282T* (rs1041983), *GSTP1 codon 105* (rs1695), *TP53 codon 72* (rs1042522) na suscetibilidade ao Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico e Hereditário.
- Verificar se os polimorfismos estudados se relacionam com fatores clínicos (Níveis de Calcitonina, Tamanho de Tumor, TNM, Recidiva Local e Metástase à Distância) reconhecidamente envolvidos na evolução dos pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico e Hereditário.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Câncer (GEMOCA) da Universidade Federal de Campinas, sob a coordenação da Prof. Dra. Laura S. Ward em colaboração com a equipe do Laboratório de Endocrinologia Molecular e da Disciplina de Endocrinologia da UNIFESP, coordenada pelo Prof. Dr. Rui Monteiro de Barros Maciel e com o Laboratório de Bases Genéticas dos Tumores da Tireoide, coordenado pela Profa Dra Janete Cerutti. O projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP tendo recebido parecer favorável nº 957/2009. Também recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP nº 1749/06.

3.1 Pacientes

Foram estudados 138 pacientes com CMTH, 47 pacientes com CMT-s e um grupo de 578 controles. O grupo de pacientes com CMTH e CMT-s foi previamente genotipado para o gene *RET*. Todos os participantes deste estudo retrospectivo do tipo caso-controle foram devidamente informados dos objetivos da investigação e assinaram o Termo de Consentimento Informado, conforme as determinações do Comitê de Ética em Pesquisa – FCM/UNICAMP e UNIFESP – e também responderam a um questionário para coletas de informações pertinentes ao estudo (ANEXOS 1 a 5).

Critérios de Inclusão: indivíduos que possuam dados de identificação, idade no diagnóstico, sexo, etnia, dados clínicos pré-cirúrgicos, uso de medicamentos e drogas, dados referentes à cirurgia e do exame anatomopatológico (Níveis de Calcitonina, Tamanho de Tumor, TNM, Recidiva Local e Metástase à Distância).

Critérios de Exclusão: foram excluídos os indivíduos que não apresentaram dados de identificação e informações sobre Níveis de Calcitonina, Tamanho de Tumor, TNM, Recidiva Local e Metástase à Distância.

3.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de sangue periférico utilizando-se um protocolo padrão de fenol-clorofórmio, adaptado pelo Laboratório de Genética Molecular do Câncer. Para verificar a pureza do DNA e a qualidade da extração feita, as amostras foram quantificadas pelo espectrofotômetro UV-Visível modelo PICODROP, marca *Picodrop Limited* (Cambridgeshire, UK). As amostras foram armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso.

3.3 Sequenciamento do gene *RET*

Anteriormente à análise de TaqMan® SNP Genotyping, o grupo de pacientes com CMT foi submetido a sequenciamento direto para os éxons 8, 10, 11, 13, 14, 15 e 16 do gene *RET*, usando Big Dye Terminator Cycle Sequencing™

Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City), conforme descrito por Nakabashi *et al.* (38). Cada amostra foi sequenciada pelo menos duas vezes e em ambas as direções.

3.4 Técnica TaqMan® SNP Genotyping

A genotipagem dos cinco polimorfismos propostos – *CYP1A2*F* (rs762551), *CYP1A1m1* (rs 4646903), *NAT2 C282T* (rs1041983), *GSTP1 codon 105* (rs 1695), *TP53 codon 72* (rs 1042522) – foi realizada através de ensaios TaqMan® SNP Genotyping (7500 Real Time PCR Systems). Tal técnica tem como base a estabilidade térmica do DNA de dupla fita. Em condições de alta estringência, essa estabilidade é suficiente para distinguir o DNA-alvo entre pares de sonda. A hibridação só acontece se ocorrer pareamento perfeito entre sonda e DNA-alvo. Assim, podem ser construídas sondas específicas para cada alelo. O ensaio para genotipagem TaqMan® SNP Genotyping (Applied Biosystems, CA) constitui uma combinação da hibridação e da atividade exonucleásica 5' da DNA-polimerase, acoplada à detecção de fluorescência (39).

Os primers foram obtidos pela TaqMan® SNP Genotyping. As sequências específicas das sondas foram: *CYP1A2*F* (C__8881221_40), *NAT2 C282T* (C__8684085_20), *GSTP1 codon 105* (C__3237198_20), *TP53 codon 72* (C__2403545_10). O primer do gene *CYP1A1m1* foi desenhado de acordo com as especificações abaixo. As sequências correspondentes de sinais fluorescentes foram VIC-CACCTCCTGGGCTCA e FAM-ACCTCCCGGGCTCA.

Primer	Sequência
<i>Forward</i>	5'-GCACTGGTACCATTTTGTTCCTCACT-3'
<i>Reverse</i>	5'-GCTGAGGTGGGAGAATCGT-3'

Os ensaios foram realizados em placa para 96 casos incluindo amostras em branco como controles negativos, de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de amplificação foram utilizados: 2 μ l de DNA genômico (10ng/ μ l); 2,5 μ l de TaqMan® Genotyping Master Mix (concentração final 1x); 0,25 μ l do ensaio (sonda e primers) para concentração de 20x ou 0,125 μ l para concentração de 40x; e 0,25 μ l de H₂O milli-q para concentração de 20x ou 0,375 μ l para concentração de 40x, em um volume final de 5 μ l. Os seguintes ciclos foram utilizados na PCR: 2 minutos a 60°C, uma fase inicial de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O software utilizado para análise foi “Sequence Detection Software”, versão 1.3 (Applied Biosystems, CA).

3.5 Análise Estatística

Para avaliar os grupos quanto a idade, gênero e tabagismo foram utilizados os testes T e teste exato de Fischer em ambiente R (40). Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi analisado a partir de genótipos por ARLEQUIN software (41). Estas análises foram realizadas utilizando software estatístico SAS

(Statistical Analysis System, versão 9.1.3, 2002-2003). Regressões logísticas e *Stepwise Regression* foram utilizados para analisar a associação entre os polimorfismos dos genes e CMT em ambiente R (40). O poder estatístico da amostra foi avaliado por meio do software GPower (42), com um nível de significância estatística de 0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Resultados para pacientes com CMTH

Na Tabela 1 estão descritas as mutações encontradas no gene *RET* para os 138 pacientes com CMTH.

Tabela 1 – Resultados para o sequenciamento do gene *RET*

Éxons	Códons	Mutação	Nº de Casos	
			Nº	(%)
Éxon 8	533	G533C	81	58,7
Éxon 10	618	C618R	3	2,2
	609	C609R	1	0,7
Éxon 11	634	C634G	21	15,2
		C634Y	3	2,2
		C634R	3	2,2
Éxon 13	791	791	24	17,4
Éxon 14	804	V804M	2	1,4
Total			138	100,0

Como mostrado na Tabela 2, pacientes e controles foram diferentes em relação à idade ($p=0,005$) e sexo ($p=0,0001$). Esta diferença na população se deve, possivelmente, ao fato da doença em estudo ser rara e de origem hereditária, o que resulta em pouca disponibilidade de amostra. Para as análises de regressão logística foram feitas correções para esta diferença populacional.

Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes com Carcinoma Medular da Tireoide Hereditário (CMTH) em comparação com o grupo controle

Fatores Clínicos	CMT-s	Controles	p
Idade (anos_±DP)	34,61 ± 18,37	39,87 ± 16,31	0.005
Gênero	Masculino	71 (53,8%)	0.0001
	Feminino	61 (46,2%)	

Entre os polimorfismos estudados, os genes *GSTP1* e *TP53* não se encontraram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme Tabela 3. Este fato pode ser devido ao tamanho relativamente pequeno dos grupos estudados e/ou heterogeneidade genética da população brasileira. O gene *GSTP1* foi associado ao desenvolvimento do CMTH, como mostrado na Tabela 4, e, devido a isso, para posterior análise estatística relacionada à agressividade dos genes foi feita uma correção, tanto para o gene *GSTP1* quanto para o gene *TP53*.

Tabela 3 – Características da genotipagem dos 138 pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Hereditário (CMTH) em relação ao grupo controle

	CMTH; N (%)	Controles; N (%)	EHW - Valor p
<i>CYP1A2*F</i>	123 (100)	339 (100)	
A/A	54 (43,9)	162 (47,8)	
C/A	48 (39,0)	147 (43,3)	0,485
C/C	21 (17,1)	30 (8,9)	
<i>CYP1A1m1</i>	119 (100)	552 (100)	
C/C	3 (2,5)	15 (2,7)	
T/C	24 (20,2)	160 (28,9)	0,992
T/T	92 (77,3)	377 (68,4)	
<i>NAT2 C282T</i>	131 (100)	181 (100)	
C/C	50 (38,2)	87 (48,1)	
C/T	62 (47,3)	81 (44,7)	0,551
T/T	19 (14,5)	13 (7,1)	
<i>GSTP1</i>	136 (100)	347 (100)	
A/A	44 (32,4)	200 (57,6)	
A/G	59 (43,4)	113 (32,5)	0,0001
G/G	33 (24,3)	34 (9,9)	
<i>TP53 códon 72</i>	133 (100)	278 (100)	
C/C	9 (6,8)	31 (11,2)	
G/C	68 (51,1)	149 (53,6)	0,003
G/G	56 (42,1)	98 (35,2)	

Na Tabela 4, temos uma análise de regressão logística ajustada para sexo, idade e etnia de pacientes com CMTH, demonstrando que variantes de *CYP1A2*F*, *GSTP1* e *NAT2* foram associadas ao desenvolvimento de CMTH. A herança polimórfica do gene *CYP1A2*F* foi importante no desenvolvimento do

CMTH (AA=43,9%; AC=39%; CC=17,1%) quando comparada com o grupo controle (AA=47,8%; AC=43,4%; CC=8,8%, $p=0,022$). Desta maneira, a presença do alelo C do gene *CYP1A2*F* influencia o desenvolvimento de CMTH em mais de 2 vezes (OR=2,10; 95%IC=1,11–3,97; $p=0,022$).

O perfil do gene *NAT2* também diferencia em CMTH (CC=38,2%; CT=47,3%; TT=14,5%) e controles (CC=48,0%; CT=44,8%; TT=7,2%). Pacientes que apresentaram o alelo T em homozigose para o gene *NAT2* possuem uma probabilidade três vezes maior para o desenvolvimento de CMTH (OR=2,54; 95%IC=1.16–5,58; $p=0,020$).

O perfil genético de *GSTP1* foi diferente em CMTH (GG=24,4%; GA=43,4%; AA=32,4%) e na população controle (GG=9,8%; GA=32,6%; AA=57,6%, $p<0,001$). Os indivíduos que herdaram o alelo G do gene *GSTP1* em homozigose apresentam maior probabilidade de desenvolvimento CMTH.

Para os genes *CYP1A1m1* e *TP53* não encontramos significância estatística quando comparamos os pacientes com CMTH e o grupo controle.

Tabela 4 – Análise de regressão logística da associação entre os diferentes genótipos e *Odds Ratio* (OR) para o desenvolvimento de Carcinoma Medular da Tireoide Hereditário (CMTH)

Genes	CMTH; N (%)	Controles; N (%)	Valor p	OR	IC 95%
<i>CYP1A2*F</i>	123 (100)	339 (100)			
A/A	54 (43,9)	162 (47,8)	0,022	2,10	1,11-3,97
C/A	48 (39,0)	147 (43,4)			
C/C	21 (17,1)	30 (8,8)			
<i>CYP1A1m1</i>	119 (100)	552 (100)			
C/C	3 (2,5)	15 (2,7)	N.S.	-----	-----
T/C	24 (20,2)	160 (28,9)			
T/T	92 (77,3)	377 (68,4)			
<i>NAT2 C282T</i>	131 (100)	181 (100)			
C/C	50 (38,2)	87 (48,1)	0,020	2,54	1,16-5,58
C/T	62 (47,3)	81 (44,7)			
T/T	19 (14,5)	13 (7,1)			
<i>GSTP1</i>	136 (100)	347 (100)			
A/A	44 (32,5)	200 (57,6)	< 0,001	5,57	2,13-14,57
A/G	59 (43,3)	113 (32,5)			
G/G	33 (24,2)	34 (9,9)			
<i>TP53 códon 72</i>	133 (100)	278 (100)			
C/C	9 (6,7)	31 (11,2)	N.S.	-----	-----
G/C	68 (51,2)	149 (53,6)			
G/G	56 (42,1)	98 (35,2)			

Uma análise estatística de regressão logística, ajustada para sexo, idade, etnia, tabagismo e os genes *CYP1A*F*, *CYP1A1m1*, *NAT*, *GSTP1* e *TP53* para os

pacientes com CMTH demonstrou que, quando considerado o tamanho do tumor como estimativa de agressividade, o sexo masculino apresentou-se como fator de proteção (OR=0,12; p=0,0072) ao aumento do tamanho do tumor, conforme Gráfico 1.

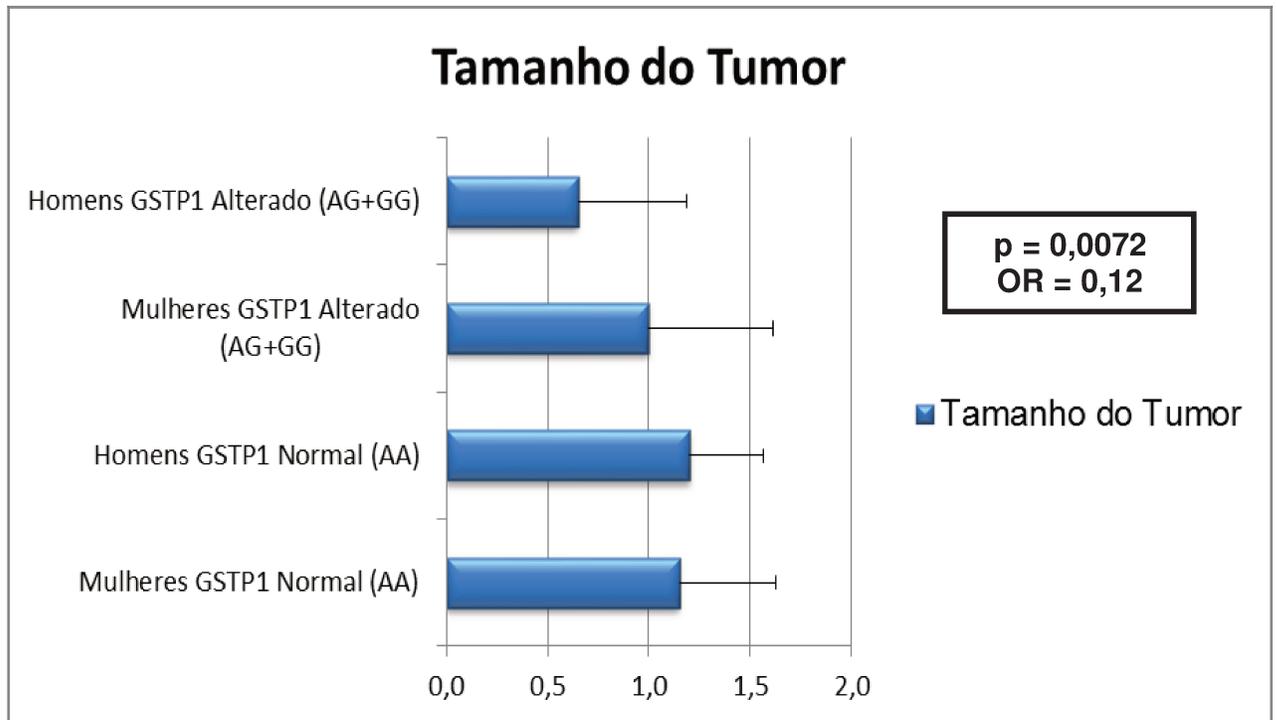


Gráfico 1: Relação entre o tamanho do tumor e a presença do polimorfismo do gene *GSTP1* comparados com sexo feminino e masculino

Considerando a recidiva local como estimativa de agressividade, o genótipo alterado do gene *GSTP1* apresentou-se como fator de risco (OR=1,17; p=0,035) para presença de recidiva local, conforme Gráfico 2.

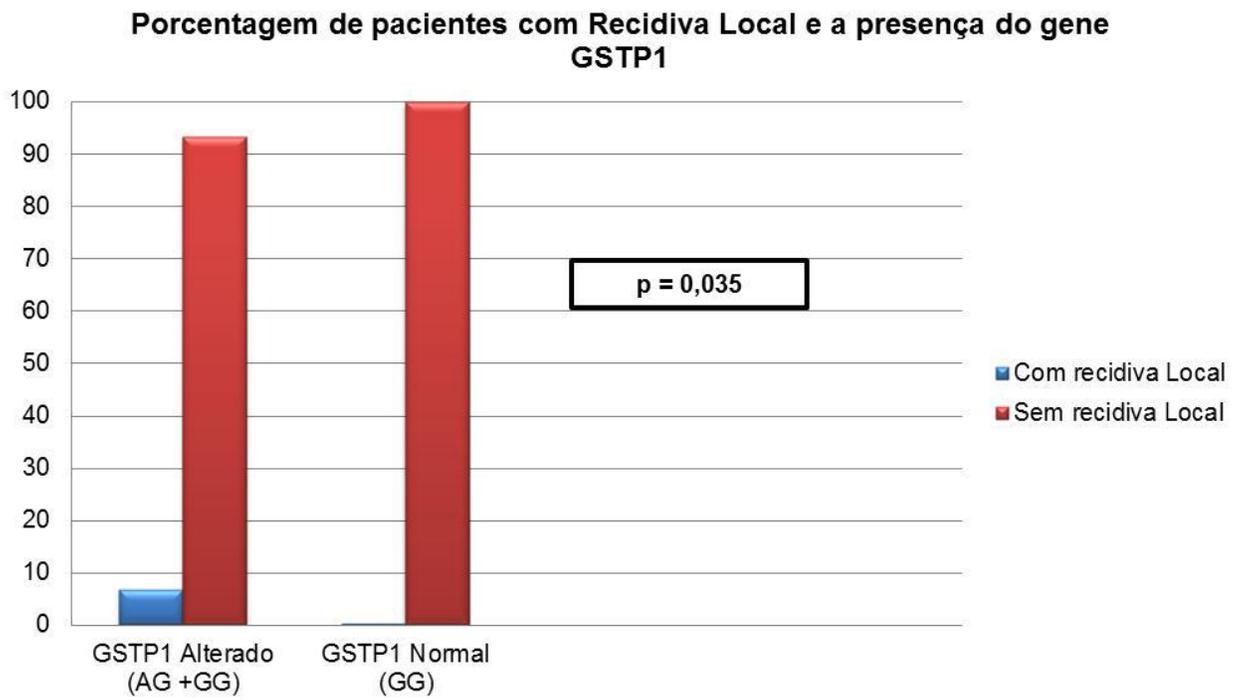


Gráfico 2: Porcentagem de pacientes que possuem ou não recidiva local com relação à presença de polimorfismo do gene *GSTP1*

4.2 Resultados para pacientes com CMT-s

Como mostrado na Tabela 5, pacientes e controles foram similares em relação a idade ($p=0,8576$), sexo ($p=0,7869$) e tabagismo ($p=0,3546$). A amostra do estudo apresentou 97,05% de poder estatístico para detectar associação genética entre polimorfismos e CMT-s por meio de análise de regressão logística.

Tabela 5 – Características clínicas dos pacientes com Carcinoma Medular da Tireoide Esporádico (CMT-s) em comparação com o grupo controle

Fatores Clínicos	CMT-s	Controles	<i>p</i>
Idade (anos\pmDP)	41,01 \pm 15,94	39,87 \pm 16,31	0,8576
Gênero	Masculino	32 (68,1%)	0,7869
	Feminino	15 (31,9%)	
Tabagismo	Sim	7 (14,9%)	0,3546
	Não	40 (85,1%)	

Entre os polimorfismos estudados, *GSTP1* não se encontrou em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, conforme mostrado na Tabela 6. Este fato pode ser devido ao tamanho relativamente pequeno dos grupos estudados e/ou heterogeneidade genética da população brasileira, composta por grupos de imigrantes de Europa, África e Ásia, associados com populações indígenas. O gene *GSTP1* não foi incluído na análise de regressão estatística.

Tabela 6 – Características da genotipagem dos 47 pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico (CMT-s) em relação ao grupo controle

	CMT-s; N (%)	Controles; N (%)	EHW - Valor p
<i>CYP1A2*F</i>	47 (100)	339 (100)	
A/A	22 (46,1)	162 (47,8)	0,869
C/A	19 (40,4)	147 (43,3)	
C/C	6 (12,6)	30 (8,9)	
<i>CYP1A1m1</i>	46 (100)	552 (100)	
C/C	2 (4,3)	15 (2,7)	0,583
T/C	19 (41,3)	160 (28,9)	
T/T	25 (54,4)	377 (68,4)	
<i>NAT2 C282T</i>	46 (100)	181 (100)	
C/C	21 (45,6)	87 (48,1)	0,400
C/T	20 (43,4)	81 (44,7)	
T/T	5 (11,0)	13 (7,1)	
<i>GSTP1</i>	46 (100)	347 (100)	
A/A	20 (43,4)	200 (57,6)	0,002
A/G	19 (41,3)	113 (32,5)	
G/G	7 (15,3)	34 (9,9)	
<i>TP53 códon 72</i>	45 (100)	278 (100)	
C/C	18 (40,0)	31 (11,2)	0,131
G/C	21 (46,6)	149 (53,6)	
G/G	6 (13,4)	98 (35,2)	

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados da análise de regressão logística que demonstram uma associação entre CMT-s e o genótipo C/C do gene *NAT2* ($p=2,2 \times 10^{-5}$; OR= 3,87; IC 95%=2,11-7,10); e também o genótipo C/C do gene *TP53* ($p=2,8 \times 10^{-4}$; OR=3,87; IC 95%=1,78-6,10).

Tabela 7 – Análise de regressão logística da associação entre os diferentes genótipos e *Odds Ratio* (OR) para risco de desenvolvimento de Carcinoma Medular da Tireoide Esporádico (CMT-s)

SNP	Genotipagem	Beta	p	OR	IC 95%
<i>CYP1A2*F</i>	AA	-0,03687	0,9049780	0,96	0,53-1,77
	CA	-0,11322	0,7173899	0,89	0,48-1,65
	CC	0,46334	0,3352942	1,59	0,63-3,98
<i>CYP1A1m1</i>	CC	0,52213	0,4042537	1,69	0,52-5,47
	CT	0,51064	0,1029917	1,67	0,91-3,05
	TT	-0,56144	0,0660261	0,57	0,31-1,03
<i>NAT2 C282T</i>	CC				
	CT	-1,92965	0,0000003	0,15	0,06-0,36
	TT				
<i>TP53 códon 72</i>	CC				
	GC	-1,27589	0,0004093	0,28	0,13-0,62
	GG				

Após a análise de regressão *Stepwise Regression*, ficou demonstrado que o genótipo C/C do gene *TP53* contribui com 8,07% do fenótipo de CMT-s,

enquanto que 1,53% é devido à idade de início do tumor, como representado na Figura 3.

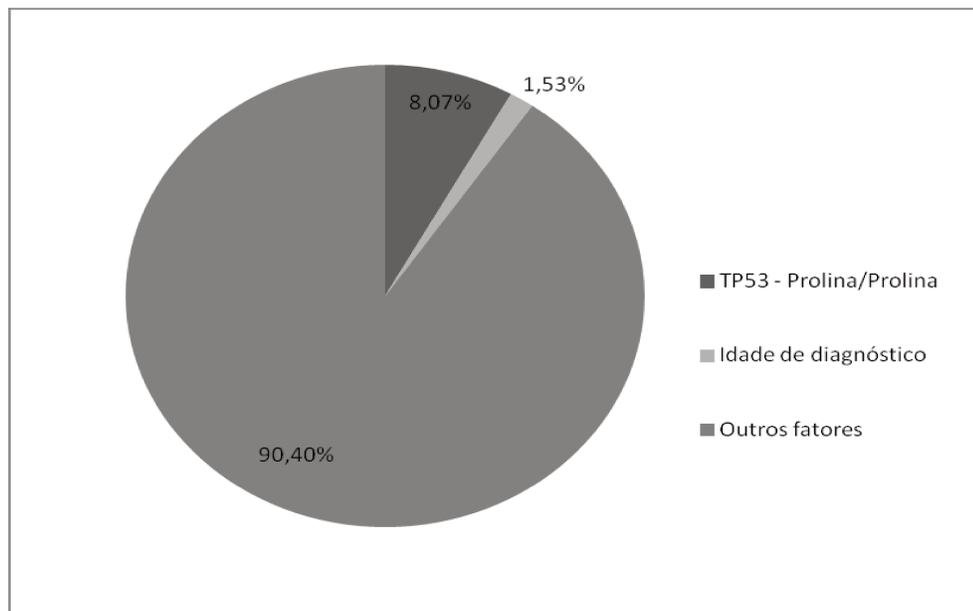


Figura 3: Análise *Stepwise Regression* em pacientes com CMT-s

Não foi possível estabelecer qualquer relação entre o perfil dos genes estudados e as características clínicas dos pacientes; hábitos alimentares, e consumo de álcool e/ou drogas. Um cálculo do tamanho da amostra indicou que uma coorte maior de pacientes seria necessária para alcançar o poder estatístico para detecção de efeitos principais ou interações genéticas.

RESUMO DOS ACHADOS

5. RESUMO DOS ACHADOS

5.1 Investigar a influência dos polimorfismos *CYP1A2*F* (rs762551), *CYP1A1m1* (rs4646903), *NAT2 C282T* (rs1041983), *GSTP1 codon 105* (rs1695), *TP53 codon 72* (rs1042522) na suscetibilidade ao Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico e Hereditário

Este estudo demonstrou uma associação entre a presença de alelos polimórficos de *CYP1A2*F*, *GSTP1* e *NAT2* e o desenvolvimento de CMTH. A herança em homozigose do alelo C do gene *CYP1A2*F* influencia o desenvolvimento de CMTH em mais de 2 vezes. Pacientes que apresentaram o alelo T em homozigose do gene *NAT2* possuem uma probabilidade 3 vezes maior de desenvolver CMTH e os indivíduos que herdaram o alelo G do gene *GSTP1* em homozigose apresentam maior probabilidade de desenvolvimento do CMTH.

Os resultados de CMT esporádico demonstrou associação entre as variantes dos genes *NAT2* e *TP53*. A herança do alelo C em homozigose para o gene *NAT2 C282T* aumenta o risco para o desenvolvimento de CMT-s em mais de 3 vezes e da mesma maneira a presença do alelo C em homozigose para o gene *TP53* também aumenta em mais de 3 vezes a suscetibilidade para CMT-s.

5.2 Verificar se os polimorfismos estudados se relacionam com fatores clínicos reconhecidamente envolvidos na evolução dos pacientes com Carcinoma Medular de Tireoide Esporádico e Hereditário

Uma análise estatística de regressão logística, ajustada para sexo, idade, etnia, tabagismo e os genes *CYP1A*F*, *CYP1A1m1*, *NAT*, *GSTP1* e *TP53* para os pacientes com CMTH demonstrou que, quando considerado o tamanho do tumor como estimativa de agressividade, o sexo masculino apresentou-se como fator de proteção ao aumento do tamanho do tumor (OR=0,12; p=0,0072). Considerando a recidiva local como estimativa de agressividade, o genótipo alterado do gene *GSTP1* apresentou-se como fator de risco para presença de recidiva local (OR=1,17; p=0,035).

Nos pacientes com CMT-s, com o auxílio da análise *Stepwise Regression*, observamos que a herança de um genótipo homozigoto em Prolina para o gene *TP53* representa uma importante fatia de 8,07% no risco para o desenvolvimento da doença; a idade de diagnóstico representa 1,53% das características clínicas da doença.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Identificar os indivíduos que possuem um risco aumentado para o câncer é importante para planejar e implementar políticas de prevenção e estratégias de conduta, não apenas em nível de saúde pública, mas também para cada paciente em particular. Assim como em outros países, temos verificado um grande aumento no número de indivíduos identificados como portadores de nódulos de tireoide graças ao maior acesso da população ao sistema de saúde e, sobretudo, a métodos diagnósticos não-invasivos, simples, rápidos e de custo relativamente baixo em nosso meio, como é a ultra-sonografia (43-45).

Mutações germinativas no gene *RET* conferem um alto risco de desenvolver CMT, mas não explicam todos os casos nem a variabilidade na apresentação clínica dos pacientes. Uma fração considerável da herdabilidade, coeficiente genético que expressa a relação entre a variância genotípica e a variância fenotípica, mede o nível da correspondência entre o fenótipo e o valor genético que ainda precisa ser identificado, que provavelmente possa estar relacionado aos efeitos cumulativos de alelos de suscetibilidade associados a genes de baixa ou moderada penetrância (7-8, 11, 14, 32, 46-47).

Inúmeros polimorfismos têm sido investigados com o objetivo de se delinearem modelos poligenéticos da suscetibilidade ao câncer. Tais modelos são particularmente interessantes para o câncer de tireoide (48). Por essa razão, um método de rastreamento capaz de identificar indivíduos que apresentam risco

maior para desenvolver câncer de tireoide poderia selecionar indivíduos para tratamentos preventivos ou, ainda, encaminhá-los para a intervenção diagnóstica e terapêutica precoces, determinando quais pacientes com nódulos tireoidianos se beneficiariam de terapias específicas (49).

O uso de marcadores moleculares de risco, identificados através de um simples exame em sangue periférico, poderia auxiliar no rastreamento de malignidade. Assim, a precisa identificação de marcadores de suscetibilidade é de fundamental importância na predisposição de riscos. Por isso, faz-se necessário o uso de biomarcadores como “indicadores sinalizando eventos em amostras ou sistemas biológicos” (50-51).

Uma série de genes de detoxificação e reparo que podem contribuir para esse modelo têm sido identificados em carcinoma diferenciado da tireoide e outros tumores (24-26). Na verdade, as diferenças nos mecanismos celulares de ativação e detoxificação de substâncias químicas cancerígenas podem conferir diferentes graus de suscetibilidade ao câncer para cada indivíduo, refletindo-se nas variações fenotípicas observadas (24-26, 37).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que uma parte significativa de todos os cânceres está relacionada a fatores ambientais, considerando-se o fumo do tabaco e a dieta como principais atribuíveis em uma lista longa e crescente de elementos cancerígenos (52).

Os estudos de marcadores de polimorfismos pontuais ou de uma única base (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) vêm se tornando populares graças às suas propriedades, que os transformam em instrumentos simples e baratos para a análise genética de diferentes doenças (53). A esmagadora quantidade de dados advindos de estudos com polimorfismos gênicos vem indicando a sua importância na compreensão dos principais fatores implicados no desenvolvimento do câncer (22). Os polimorfismos que existem nas enzimas responsáveis pelo metabolismo de drogas e de substâncias tóxicas ajudam a compreender a susceptibilidade individual aos carcinógenos químicos e ajudam a explicar as variações da incidência do câncer de tireoide em todo o mundo (54).

Os genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos podem ser interessantes para delinear modelos de risco. A habilidade individual de biotransformar substâncias potencialmente tóxicas tem sido associada com maior ou menor suscetibilidade a agentes tóxicos e ao risco para câncer. Indivíduos incapazes de detoxificar adequadamente substâncias agressivas ou metabólitos carcinogênicos podem sofrer um dano direto no DNA ou um dano celular, com a formação de elementos químicos e macromoléculas que podem causar instabilidade genômica (49).

É importante notar que a influência de alguns polimorfismos genéticos únicos pode ter uma pequena contribuição na suscetibilidade de malignidade que é influenciada por uma multidão de genes que podem proteger contra um ao outro ou aumentar a suscetibilidade para um aumento na lista de carcinógenos

químicos, físicos e biológicos. Também, as diferentes enzimas dos sistemas GST, CYP e NAT têm substratos endógenos e ambientais específicos, um fato que ajuda a explicar a diferença na proporção de muitos tumores descritos em diferentes populações (55).

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, uma associação entre a presença de alelos polimórficos de *CYP1A2*F*, *GSTP1* e *NAT2* e o desenvolvimento de CMTH e também a associação entre os genes *NAT2* e *TP53* ao fenótipo CMT-s.

A herança do alelo C em homozigose do gene *CYP1A2*F* influencia o desenvolvimento de CMTH em mais de 2 vezes. A indução de *CYP1A1* ocorre via ligação do composto indutor ao receptor de “Aryl hidrocarbon” (Ah), que ativa a transcrição na metabolização de xenobióticos (56). A bioativação de vários HAPs é iniciada com estimulação do receptor Ah e este, por sua vez, ativa a transcrição da *CYP1A1*, do epóxido hidrolase e de outras enzimas (57).

A atividade catalítica e o modo de indução de *CYP1A1* são conservados em animais superiores, confirmando sua importante função fisiológica. O padrão de atividade e a capacidade indutora desta enzima em humanos, relacionada à formação de metabólitos de HAPs capazes de reagir com a molécula de DNA é, portanto, de grande importância para a estimativa do risco de desenvolvimento de doenças. A enzima *CYP1A1* é considerada primariamente uma enzima extra-hepática em humanos, sendo encontrada no pulmão, nos linfócitos e na

placenta após exposição a HAPs, incluindo aqueles presentes na fumaça do cigarro (58).

Os indivíduos que herdaram o alelo G do gene *GSTP1* em homozigose apresentam maior probabilidade de desenvolver CMTH. Indivíduos com as formas variantes do gene *GSTP1* produzem uma enzima com uma capacidade de detoxificação diminuída para uma extensa lista de carcinógenos ambientais (59).

Variantes enzimáticas do gene *GSTP1* possuem menor capacidade de detoxificação dos xenobióticos quando comparados com a enzima codificada pelo gene do tipo selvagem, denominado *Ile/Ile*. Ao contrário, a hiperexpressão de *GSTP1* causa resistência a diversas drogas anti-neoplásicas e a presença do polimorfismo desse gene pode diminuir a eficácia terapêutica de quimioterápicos (60).

Pacientes que apresentaram o alelo T em homozigose para o gene *NAT2* possuem uma probabilidade três vezes maior para o desenvolvimento de CMTH, e a herança do alelo C em homozigose para o gene *NAT2 C282T* aumenta o risco para o desenvolvimento de CMT-s em mais de 3 vezes.

O gene *NAT* codifica uma enzima inativadora, que catalisa a conjugação de substâncias cancerígenas, como as que são formadas por exposição à radiação ionizante e ao tabaco (46). A enzima é responsável pela N-acetilação de arilaminas e de vários xenobióticos e drogas como a hidralazina, e tem sido implicada na suscetibilidade a várias neoplasias, incluindo carcinomas de tireoide (26).

Além disso, a presença em homozigose do alelo C para o gene *TP53* também aumenta em mais de três vezes a susceptibilidade da para CMT-s. Genes de controle do ciclo celular e apoptose, reguladores diretamente envolvidos na iniciação da proliferação de células malignas têm sido alvos preferidos na busca de marcadores de risco de câncer (61).

Genótipos diferentes de *TP53* resultariam numa produção de p53 com conformação diferente e, conseqüentemente, influenciam nas atividades de p53 (62). A função de p53 é crucial no câncer. Acredita-se que a sua ação específica ocorra através da parada do ciclo celular para promoção de reparo ou, quando isso não é possível, induzindo a apoptose (31, 63). Polimorfismos nesse gene podem levar a uma atividade aberrante da proteína, afetando a sua função (18, 21, 25). O alelo Prolina foi associado com um risco aumentado de câncer de tireoide entre outros tipos de câncer (24).

Este estudo também demonstrou que, quando considerado o tamanho do tumor como estimativa de agressividade, o sexo masculino apresentou-se como fator de proteção ao aumento do tamanho do tumor (OR=0,12; p=0,0072). Considerando a recidiva local como estimativa de agressividade, o genótipo alterado do gene *GSTP1* apresentou-se como fator de risco para presença de recidiva local (OR=1,17; p=0,035). Pela primeira vez, estes dados de variabilidade fenotípica são apresentados com genes de baixa penetrância. O que temos na literatura são apenas relações de variabilidades com o gene *RET*.

Como por exemplo, um estudo recente demonstrou associação entre o alelo polimórfico de S836S do gene *RET* e doença metastática precoce observada em CMT tanto hereditário quanto esporádico, sugerindo que esta variante possa interferir na progressão tumoral (16).

Um efeito modulador da combinação do alelo polimórfico de L769L e o tipo selvagem S836S sobre o resultado clínico de pacientes com CMT hereditários também tem sido descrito (64).

Nos pacientes com CMT-s, verificou-se que a herança de um genótipo homocigoto em Prolina para o gene *TP53* representa uma importante fatia de 8,07% no risco para o desenvolvimento da doença; a idade de diagnóstico representa 1,53% das características clínicas da doença, porém a grande maioria dos fatores determinantes para o desenvolvimento do CMT possivelmente possa estar relacionada com a presença de polimorfismos do gene *RET* ou até mesmo outros genes e/ou outros fatores que não foram abordados neste estudo.

A presença do alelo variante S836S do gene *RET* foi associada com idade mais jovem e uma porcentagem mais elevada de metástases locais e distantes no momento do diagnóstico em pacientes com CMT esporádico (64).

Em contraste, um estudo demonstrou que a variante S836S do gene *RET* foi mais expressa em portadores da mutação G533C, também do gene *RET*, em relação à população controle. No entanto, ele não conseguiu demonstrar uma

associação entre esta variante e a idade precoce de desenvolvimento da doença nesta família estudada (11).

Embora os riscos desses polimorfismos genéticos sejam relativamente modestos, sua frequência elevada na população sugere que eles podem ter um impacto considerável sobre a incidência do CMT. De fato, polimorfismos de genes que codificam enzimas envolvidas na detoxificação de substâncias tóxicas podem contribuir para a suscetibilidade variável a uma série de compostos cancerígenos. A identificação de um perfil de suscetibilidade para CMT pode permitir o reconhecimento de um grupo de indivíduos em risco que, portanto, merecem uma observação mais cuidadosa.

Uma fração considerável da herdabilidade restante que ainda precisa ser identificada pode ser devida aos efeitos cumulativos de alelos de suscetibilidade associados a genes de baixa a moderada penetrância, de acordo com um modelo poligênico de herança, (23-26).

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Embora os riscos genéticos destes polimorfismos sejam relativamente modestos, a sua frequência elevada na população sugere que eles podem ter um impacto considerável sobre a incidência de CMT. De fato, os polimorfismos de genes que codificam enzimas envolvidas na detoxificação de substâncias tóxicas podem contribuir para a suscetibilidade variável para uma série de compostos cancerígenos. A identificação de um perfil de suscetibilidade ao CMT pode permitir o reconhecimento de um grupo de indivíduos em risco merecendo, portanto, uma observação mais cuidadosa.

Infelizmente, as vias do processo carcinogênico são complexas e mediadas pela atividade de múltiplos genes. Além disso, esses polimorfismos podem ter efeitos aditivos ou opostos. Do mesmo modo, substâncias tóxicas podem produzir efeitos diferentes, compostos e complexos. Portanto, conclusões definitivas dependem de estudos com amostras maiores que determinam as estimativas de risco associadas com outras variantes polimórficas, interações gene-gene e interações gene-ambiente.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
2. Orlov S, Orlov D, Shaytzag M, Dowar M, Tabatabaie V, Dwek P, et al. Influence of age and primary tumor size on the risk for residual/recurrent well-differentiated thyroid carcinoma. *Head Neck*. 2009 Jun;31(6):782-8.
3. Ward LS, Graf H. [Thyroid cancer: increased occurrence of the disease or simply in its detection?]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Dec;52(9):1515-6.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.
5. Aschebrook-Kilfoy B, Ward MH, Sabra MM, Devesa SS. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid*. 2011 Feb;21(2):125-34.
6. Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer*. 2000 Mar 1;88(5):1139-48.
7. Magalhaes PK, de Castro M, Elias LL, Soares EG, Maciel LM. Polymorphisms in the RET proto-oncogene and the phenotypic presentation of familial medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2004 Oct;14(10):848-52.
8. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet*. 1993 Jul;2(7):851-6.
9. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*. 2009 Jun;19(6):565-612.
10. Romei C, Cosci B, Renzini G, Bottici V, Molinaro E, Agate L, et al. RET genetic screening of sporadic medullary thyroid cancer (MTC) allows the preclinical diagnosis of unsuspected gene carriers and the identification of a relevant percentage of hidden familial MTC (FMTC). *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Feb;74(2):241-7.
11. Tamanaha R, Camacho CP, Pereira AC, da Silva AM, Maciel RM, Cerutti JM. Evaluation of RET polymorphisms in a six-generation family with G533C RET mutation: specific RET variants may modulate age at onset and clinical presentation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Jul;71(1):56-64.
12. Wiench M, Wygoda Z, Gubala E, Wloch J, Lisowska K, Krassowski J, et al. Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 1;19(5):1374-80.
13. Berard I, Kraimps JL, Savagner F, Murat A, Renaudin K, Nicolli-Sire P, et al. Germline-sequence variants S836S and L769L in the RET proto-oncogene are not associated with predisposition to sporadic medullary carcinoma in the French population. *Clin Genet*. 2004 Feb;65(2):150-2.

14. Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Sculli M, Lari R, et al. RET exon 11 (G691S) polymorphism is significantly more frequent in sporadic medullary thyroid carcinoma than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3579-84.
15. Rocha AP, Magalhaes PK, Maia AL, Maciel LM. [Genetic polymorphisms: implications in the pathogenesis of medullary thyroid carcinoma]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Jul;51(5):723-30.
16. Siqueira DR, Romitti M, da Rocha AP, Ceolin L, Meotti C, Estivalet A, et al. The RET polymorphic allele S836S is associated with early metastatic disease in patients with hereditary or sporadic medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2010 Dec;17(4):953-63.
17. Bugalho MJ, Coelho I, Sobrinho LG. Somatic trinucleotide change encompassing codons 882 and 883 of the RET proto-oncogene in a patient with sporadic medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2000 Jun;142(6):573-5.
18. Vineis P. The relationship between polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Toxicology.* 2002 Dec 27;181-182:457-62.
19. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer JL. Advances in cancer epidemiology: understanding causal mechanisms and the evidence for implementing interventions. *Annu Rev Public Health.* 2005;26:37-60.
20. Carbone M, Pass HI. Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen? *Semin Cancer Biol.* 2004 Dec;14(6):399-405.
21. Vineis P. Individual susceptibility to carcinogens. *Oncogene.* 2004 Aug 23;23(38):6477-83.
22. Vineis P. Cancer as an evolutionary process at the cell level: an epidemiological perspective. *Carcinogenesis.* 2003 Jan;24(1):1-6.
23. Bufalo NE, Leite JL, Guilhen AC, Morari EC, Granja F, Assumpcao LV, et al. Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. *Endocr Relat Cancer.* 2006 Dec;13(4):1185-93.
24. Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS. GST profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy. *Cancer Lett.* 2004 Jun 25;209(2):129-37.
25. Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpcao LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett.* 2004 Jul 16;210(2):151-7.
26. Guilhen AC, Bufalo NE, Morari EC, Leite JL, Assumpcao LV, Tincani AJ, et al. Role of the N-acetyltransferase 2 detoxification system in thyroid cancer susceptibility. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan 1;15(1):406-12.
27. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med.* 2000 Jul 13;343(2):78-85.

28. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res.* 2000 Jan 3;464(1):65-76.
29. Clapper ML. Genetic polymorphism and cancer risk. *Curr Oncol Rep.* 2000 May;2(3):251-6.
30. Vineis P. Diet, genetic susceptibility and carcinogenesis. *Public Health Nutr.* 2001 Apr;4(2B):485-91.
31. Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2002 Aug;2(8):605-15.
32. Pasquali D, Circelli L, Faggiano A, Pancione M, Renzullo A, Elisei R, et al. CDKN1B V109G polymorphism a new prognostic factor in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2011 Mar;164(3):397-404.
33. Bartsch H, Hietanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environ Health Perspect.* 1996 May;104 Suppl 3:569-77.
34. Anwar WA, Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Mostafa HM, Au WW. Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. *Carcinogenesis.* 1996 Sep;17(9):1923-9.
35. Bois FY, Krowech G, Zeise L. Modeling human interindividual variability in metabolism and risk: the example of 4-aminobiphenyl. *Risk Anal.* 1995 Apr;15(2):205-13.
36. Kroemer HK, Eichelbaum M. "It's the genes, stupid". Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. *Life Sci.* 1995;56(26):2285-98.
37. Ward LS, Morari EC, Leite JL, Bufalo NE, Guilhen AC, Araujo PP, et al. Identifying a risk profile for thyroid cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Jul;51(5):713-22.
38. Nakabashi CC, Guimaraes GS, Michaluart P, Jr., Ward LS, Cerutti JM, Maciel RM. The expression of PAX8-PPARgamma rearrangements is not specific to follicular thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 Aug;61(2):280-2.
39. De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, Wenz MH. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. *Mutat Res.* 2005 Jun 3;573(1-2):111-35.
40. Hothorn T, Leisch F. Case studies in reproducibility. *Brief Bioinform.* 2011 May;12(3):288-300.
41. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010 May;10(3):564-7.
42. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007 May;39(2):175-91.
43. Chow SM, Law SC, Au SK, Mang O, Yau S, Yuen KT, et al. Changes in clinical presentation, management and outcome in 1348 patients with differentiated

- thyroid carcinoma: experience in a single institute in Hong Kong, 1960-2000. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2003 Sep;15(6):329-36.
44. Hegedus L, Bonnema SJ, Bennedbaek FN. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives. *Endocr Rev*. 2003 Feb;24(1):102-32.
 45. Tan GH, Gharib H. Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging. *Ann Intern Med*. 1997 Feb 1;126(3):226-31.
 46. Agundez JA. Polymorphisms of human N-acetyltransferases and cancer risk. *Curr Drug Metab*. 2008 Jul;9(6):520-31.
 47. Lesueur F, Cebrian A, Robledo M, Niccoli-Sire P, Svensson KA, Pinson S, et al. Polymorphisms in RET and its coreceptors and ligands as genetic modifiers of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):1177-80.
 48. Castro MR, Gharib H. Continuing controversies in the management of thyroid nodules. *Ann Intern Med*. 2005 Jun 7;142(11):926-31.
 49. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2004 Dec;14(6):473-86.
 50. Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol*. 1996 Apr;15(4):273-80.
 51. Yuspa SH. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):341-4.
 52. Pruss-Ustun A, Corvalan C. How much disease burden can be prevented by environmental interventions? *Epidemiology*. 2007 Jan;18(1):167-78.
 53. Kirk BW, Feinsod M, Favis R, Kliman RM, Barany F. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. *Nucleic Acids Res*. 2002 Aug 1;30(15):3295-311.
 54. Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ*. 1999(148):231-49.
 55. Leite JL, Morari EC, Granja F, Campos GM, Guilhen AC, Ward LS. Influence of the glutathione s-transferase gene polymorphisms on the susceptibility to basal cell skin carcinoma. *Rev Med Chil*. 2007 Mar;135(3):301-6.
 56. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1993 Feb;14(1):77-87.
 57. Hirvonen A. Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *J Occup Environ Med*. 1995 Jan;37(1):37-43.
 58. 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 P450IA in lung cancer patients. *Int J Cancer*. 1991 Mar 12;47(5):681-5.
 59. Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1985;57:357-417.
 60. Henderson CJ, McLaren AW, Moffat GJ, Bacon EJ, Wolf CR. Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function. *Chem Biol Interact*. 1998 Apr 24;111-112:69-82.

61. Loktionov A. Common gene polymorphisms, cancer progression and prognosis. *Cancer Lett.* 2004 May 10;208(1):1-33.
62. Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science.* 1995 Mar 10;267(5203):1498-502.
63. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2002 Aug;2(8):594-604.
64. Severskaia NV, Saenko VA, Il'in AA, Chebotareva IV, Rumiantsev PO, Isaev PA, et al. [RET and GFRA1 germline polymorphisms in medullary thyroid cancer patients]. *Mol Biol (Mosk).* 2006 May-Jun;40(3):425-35.

ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Controles



LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa em Câncer de Tireóide

Pesquisadora: Profª Dra Laura Sterian Ward / Profª Dra Lígia Vera Montalli Assumpção

Doador – indivíduo **controle**

Sr(a) _____ Anos _____
RG: _____ HC: _____
Endereço: _____
Telefone: _____ Data: / / _____

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

Assinatura do Paciente ou Responsável pelo Paciente

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

ANNAMENESE ALIMENTAR (QUALIDADE E QUANTIDADE)

Freqüência de Consumo(DIÁRIO, SEMANAL, EVENTUAL, NUNCA)

Arroz				
Macarrão				
Batata/fec,				
Pão				
Bolacha				
Verduras				
Legumes				
Fruta				
Leite				

Derivados				
Carnes				
Embutidos				
Ovos				
Feijão/Legum,				
Margarina				
Frituras				
Doces				
Refrigerante				

Café				
Enlatados				
Congelados				
Cereais				
Condimentos				
Fast-foods				
Churrasco				

Descreva seu dia alimentar (o que come geralmente):

Café	Lanche	Almoço	lanche	jantar	ceia

Consumo de Líquidos: _____ Quant./Freq.: _____

PERGUNTAS APENAS PARA MULHERES:

Qual a idade de primeira menstruação (menarca)?

Já fez uso de anticoncepcionais orais? Quanto tempo?

() atualmente sim () sim, mas não atualmente, () não

Gravidez?

Quantos abortos espontâneos?

Com que idade ocorreu a menopausa?

Por que motivo:

Faz ou fez uso de reposição hormonal?

Qual:

Idade:

ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes



LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa em Câncer de Tireóide

Pesquisadora: Prof^a Dra Laura Sterian Ward e Prof^a Dra Lígia Vera Montalli Assumpção

Paciente ou Responsável pelo **paciente**

Sr(a) _____ Anos _____

RG: _____ HC: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Data: / /

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

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

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

ANEXO 4 – Questionário para Pacientes com Câncer de Tireoide

Questionário – Pacientes com Câncer de Tireoide

IDENTIFICAÇÃO

Data de nascimento:

Etnia:

Sexo:

Estado civil:

Grau de escolaridade:

Profissão:

HISTÓRICO MÉDICO

Nasceu de parto:

normal prematuro com meses cesárea forceps

Pesou ao nascer:,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,

Foi amamentado no peito

sim não

Alguma vez foi informado de que tinha nódulo tireoidiano?

Sim Não

Qual idade possuía quando foi informado que possuía o nódulo?

Como foi feito o diagnóstico:

exame clínico ultra-sonografia outros exames

Que tratamento recebeu:

apenas observação/acompanhamento

punção aspirativa

uso de medicamentos: Levotiroxina- Puran T4, Synthroid, Levois, Euthyrox

Anti-tireoidiano – Propiltiuracil, Tapazol

cirurgia

iodo radioativo

Submeteu-se a cirurgia para remover a tireóide? () parcial ou () total?

Data da cirurgia:

Fez uso de algum dos medicamentos abaixo:

() Selênio () Multivitaminas () Iodo

Você possuía alguma das seguintes doenças tireoidianas:

() bócio ou nódulo benigno () Tireoidite ou doença de Hashimoto

() Hipertireoidismo () Doença de Graves

() Hipotireoidismo () Câncer de tireóide

Você já apresentou alguma doença imunológica (diabetes, lúpus, Graves, Hashimoto, artrite, etc)?

Apresentou Câncer?

Que tipo? Quando?

Foi submetido à cirurgia?

Foi submetido à radioterapia? Durante meses,

Foi submetido à quimioterapia? Durante meses,

ANTECEDENTES FAMILIARES

Fatores relacionados à sua família podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de câncer, Por este motivo são importantes as seguintes informações:

Algum familiar próximo possui alguma das seguintes doenças tireoidianas:

() bócio ou nódulo benigno () Tireoidite ou doença de Hashimoto

() Hipertireoidismo () Doença de Graves

() Hipotireoidismo () Câncer de tireóide

Se alguém tem doença tireoidiana, faz tratamento (toma remédio, faz acompanhamento, fez cirurgia, etc)?

Algum familiar próximo já apresentou alguma doença imunológica (diabetes, lúpus, Graves, Hashimoto, artrite, etc)?

Você tem algum parente próximo que apresentou Câncer?

Relação de parentesco	Parente materno ou paterno	Tipo de câncer	Idade aproximada do diagnóstico	Era fumante	Tratamento	Curado?	

Quantas pessoas moram na sua casa?

Quantas trabalham:

Renda média:

HISTÓRICO SOCIAL E HÁBITOS DE VIDA

Ingere bebidas alcoólicas regularmente?

() sim

() não

() atualmente não, parei há

Que tipo de bebidas (destilado, cerveja)? Freqüência:

Complete esta tabela se consome ou consumiu bebidas alcoólicas no passado:

Bebida	Quantas doses?	Por quanto tempo(anos)
Cerveja(1 lata)		
Vinho (1 copo)		
Pinga(1 dose)		

É fumante?

() sim

() atualmente não, já parei há

() não

Se fumou ou fuma, indique para cada idade , quantos cigarros fuma ou fumou por dia (um maço=20 cigarros)

Quantas horas por dia você faz atividades físicas (como caminhar, correr, nadar, musculação, ou outras)? _____, Quantas vezes por semana? _____,

AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

Peso atual: _____ Estatura: _____

Hábito intestinal: _____ Hábito urinário: _____

Alteração de peso recente: _____ Quantos quilos: _____ Motivo: _____

Faz algum controle na alimentação: _____ Qual: _____

Dietas anteriores/ resultado: _____

Patologia associada : HAS, DM, Colesterol, triglicérides, etc,,,

ANNAMENESE ALIMENTAR (QUALIDADE E QUANTIDADE)

Freqüência de Consumo(DIÁRIO, SEMANAL, EVENTUAL, NUNCA)

Arroz				
Macarrão				
Batata/fec,				
Pão				
Bolacha				
Verduras				
Legumes				
Fruta				
Leite				

<i>Derivados</i>				
Carnes				
Embutidos				
Ovos				
Feijão/Legum,				
Margarina				
Frituras				
Doces				
Refrigerante				

Café				
Enlatados				
Congelados				
Cereais				
Condimentos				
Fast-foods				
Churrasco				

Descreva seu dia alimentar (o que come geralmente):

Café	Lanche	Almoço	lanche	jantar	ceia

Consumo de líquidos: _____ Quant./Freq.: _____

QUALIDADE DE VIDA

- 1) Você está satisfeito (a) com seu conhecimento sobre a doença? () sim () não
- 2) Ela afetou seu humor, trazendo sintomas de depressão ou ansiedade? () sim () não
- 3) Ela afetou sua vida familiar? () sim () não
- 4) Ela afetou sua vida profissional? () sim () não
- 5) Ela afetou sua aparência? () sim () não
- 6) Ela afetou seu lazer? () sim () não
- 7) Você obteve informações suficientes sobre sua cirurgia? () sim () não
- 8) Os tratamentos causaram desconforto? () sim () não
- 9) Você teve orientação adequada sobre cura, sobrevida e depois de seu tratamento?() sim () não
- 10) Você foi orientado adequadamente sobre a continuidade do seu tratamento após a cirurgia? () sim () não
- 11) Você tem ou teve algum medo relacionado a sua doença? () sim () não
- 12) A doença alterou sua alimentação? () sim () não
- 13) Você sentiu diferença no apetite ? () sim () não
- 14) Quais as alterações notadas? _____

15) Alteração de peso? () sim () não - quantos quilos/ _____

PERGUNTAS APENAS PARA MULHERES

Qual a idade de primeira menstruação (menarca)?

Já fez uso de anticoncepcionais orais? Quanto tempo?

() atualmente sim () sim, mas não atualmente, () não

Gravidez?

Quantos abortos espontâneos?

Com que idade ocorreu a menopausa?

Por que motivo:

Faz ou fez uso de reposição hormonal?

Qual:

Idade:

ANEXO 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da UNIFESP



Diagnóstico Molecular Ampliado do Carcinoma Medular de Tiróide

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Voluntário: _____ Idade: _____ (anos)

Investigador Principal: Dr, Rui M, B, Maciel

Co-investigadores: Dr^a Rosa Paula M, Biscolla, Dr^a Janete M, Cerutti, Dr, Magnus R, Dias da Silva, Dr, João Roberto M, Martins, Dr, Cléber P, Camacho e Dr^a Danielle Andreoni,

Pesquisadores envolvidos: Flavia O, F, Valente, Susan C, Lindsey, Ji H, Yang, Priscila S, Signorini, Ariane C, Sarubo, Missaki Y, Sittoni e Maria Sharmila A, de Sousa,

Diagnóstico Molecular do Carcinoma Medular de Tiróide

Estas informações estão sendo fornecidas de maneira clara e simples para sua participação voluntária neste estudo, Portanto, leia este termo (4 páginas) com atenção e pergunte aos pesquisadores responsáveis sobre quaisquer dúvidas, sempre que considerar necessário, Após a leitura, caso concorde voluntariamente em participar, assine-o,

Este estudo tem por objetivo estudar os genes (material genético; DNA) envolvidos no carcinoma medular de tiróide em pacientes e familiares possivelmente afetados, além de correlacionar tais dados com os diferentes fenótipos (características clínicas) da doença,

A tiróide pode apresentar várias doenças e uma delas é o câncer de tiróide, Quando a tiróide é examinada (palpação) e apresenta alguma massa, nódulo ou aumento da glândula, há necessidade de uma ecografia da glândula (pescoço) e outros exames laboratoriais com finalidade diagnóstica,

Assim, é importante o exame de sangue, no qual o material genético (DNA) será examinado pelos pesquisadores do Ambulatório de Tiróide e Laboratório de Endocrinologia Molecular, na Disciplina de Endocrinologia (Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina), para a identificação de possíveis genes associados ao câncer de tiróide, No caso, o gene envolvido corresponde a uma proteína chamada RET, que, se alterada (apresentar mutações), pode levar ao desenvolvimento do carcinoma medular de tiróide (câncer de tiróide),

Para o exame, coletam-se 10 ml de sangue, obtido através de punção de veia do antebraço, A coleta de sangue é um procedimento de rotina e não apresenta riscos à saúde, Algumas vezes pode ocorrer o aparecimento de um pequeno hematoma no local da punção o que se resolve espontaneamente em alguns dias,

No caso de voluntários apresentarem material genético (DNA) com mutações, poderá ser sugerido um plano terapêutico, como a retirada cirúrgica da glândula tiróide, cirurgia esta que recebe o nome de tireoidectomia, Após a cirurgia é necessário fazer o acompanhamento para

termos certeza de que a glândula afetada foi retirada e para evitar que a doença reapareça, Assim, são realizados diversos exames de sangue, urina e ultrassom do pescoço que vão nos mostrar se sobrou algum resto de tireoide afetada pela doença.

Dado que este tipo de carcinoma é transmitido de forma hereditária, no caso do material genético (DNA) de voluntários apresentar a mutação (câncer de tireoide), deverá ser revelado aos familiares o risco deles também apresentarem a mutação,

Não há benefício direto para o voluntário (e/ou familiares), Trata-se de um estudo experimental para verificar a presença de mutações no gene RET, as quais podem levar ao desenvolvimento de carcinoma medular de tireoide, e podem ser usadas como marcador para diagnóstico de tal forma de carcinoma, Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício,

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição,

Todas as informações obtidas sobre cada voluntário (e/ou seus familiares) para este estudo serão analisadas em conjunto e consideradas confidenciais, não sendo reveladas para outros, que não sejam os pesquisadores envolvidos, Dados que possam identificar o voluntário (e/ou seus familiares), como nome, serão mantidos em um arquivo separado das demais informações do estudo, O material biológico (sangue) e todas as demais informações sobre o voluntário (e/ou seus familiares) serão identificadas somente por números,

Apesar de todos os cuidados para manter a informação sobre o voluntário confidencial, existe o risco que informação perceptível (como o fato de o voluntário ter câncer, ou de ter risco de ter câncer ou outra doença) possa ser descoberto ou inferido por seus familiares, Da mesma forma o próprio voluntário pode descobrir ou inferir sobre dados de seus familiares,

É importante também ressaltar que os resultados e/ou informações (identificados somente por números) serão compartilhados com pesquisadores de outros centros colaboradores (no consórcio BRASMEN) para um melhor entendimento desta doença no Brasil,

O voluntário tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores, Não há despesas pessoais para o voluntário em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, Também não há compensação financeira relacionada à sua participação, Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa, Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o voluntário tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas,

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos pesquisadores responsáveis pelo estudo para esclarecimento de eventuais dúvidas, O investigador principal é Dr, Rui Monteiro de Barros Maciel, Professor Titular pela Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Medicina da UNIFESP – EPM, Todos os pesquisadores responsáveis pelo estudo podem ser encontrados nos endereços: Laboratório de Endocrinologia Molecular (R, Pedro de Toledo 669 - 11º andar), ou no Ambulatório de Tireoide (R, Borges Lagoa, 800) – telefone (11)5084-5231, Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br,

Comprometemo-nos em utilizar os dados, as amostras de sangue e os resultados obtidos somente para esta pesquisa, Todavia, há que se ressaltar que haverá estocagem de amostras de material biológico (sangue) e o pedido de permissão para o seu uso futuro deverá ser submetido e aprovado pelo CEP – UNIFESP,

Eu acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **Diagnóstico Molecular Ampliado do Carcinoma Medular de Tireoide**, Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar neste estudo, Ficaram claros para mim quais são os objetivos, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de armazenamento de dados e materiais biológicos, e de esclarecimentos permanentes sobre estudos futuros, Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário, Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço,

_____ RG, _____

Assinatura do voluntário / representante legal

Data ____/____/____

_____ RG, _____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Para os casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual,

(Somente para o responsável pelo estudo)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo,

_____ RG, _____

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____