



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
FACULDADE DE CEILÂNDIA - FCE
CURSO DE FÁRMACIA**

JENYFFER RIBEIRO ROSA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO CYP2D6*4 E CYP1A1 EM PACIENTES
PORTADORES DE CÂNCER DE TIREOIDE SUBMETIDOS A IODOTERAPIA**

**BRASÍLIA
2018**

JENYFFER RIBEIRO ROSA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO CYP2D6*4 E CYP1A1 EM PACIENTES
PORTADORES DE CÂNCER DE TIREOIDE SUBMETIDOS A IODOTERAPIA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Ceilândia, da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia

Orientadora: Dra. Jamila Reis de Oliveira
Coorientador: Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA
2018

Ficha catalográfica elaborada
automaticamente, com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a)

Ribeiro Rosa, Jenyffer

Análise do Polimorfismo CYP2D6*4 E CYP1A1 em pacientes portadores de câncer de tireoide submetidos ao tratamento com radiofarmaco iodeto de sódio / Jenyffer Ribeiro Rosa; orientador Jamila Reis de Oliveira; co-orientador Izabel Cristina Rodrigues da Silva. -- Brasília, 2018.

55 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. Carcinoma papilífero. 2. CYP2D6*4. 3. CYP1A1*m1. 4. Polimorfismo. 5. Iodoterapia. I. Reis de Oliveira, Jamila, orient. II. Cristina Rodrigues da Silva, Izabel, co orient. III. Título.

JENYFFER RIBEIRO ROSA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO CYP2D6*4 E CYP1A1 EM PACIENTES
PORTADORES DE CÂNCER DE TIREOIDE SUBMETIDOS A IODOTERAPIA**

BANCA EXAMINADORA


Dr. Jamila Reis de Oliveira
Professora Adjunta - FCE
Universidade de Brasília

Orientadora: Profa. Dra. Jamila Reis de Oliveira
(FCE/Universidade de Brasília)



Co- Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/Universidade de Brasília)

Ligia Canongia de Abreu Cardoso
(Centro Universitário Planalto do Distrito Federal - UNIPLAN)

Rafael Martins de Morais
(Universidade de Brasília)

Brasília

2018

“Habitue-se a ouvir a voz do seu coração. É através dele que Deus fala conosco e nos dá a força que necessitamos para seguirmos em frente, vencendo os obstáculos que surgem na nossa estrada”.

Beata Irmã Dulce

AGRADECIMENTOS

Minha graduação não teria sentido se não pudesse agradecer a todos os envolvidos para concretização do meu sonho, jamais conseguiria se eles não estivessem ao meu lado. Gostaria de prestar meus sinceros agradecimentos às pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão do meu curso.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e a Nossa Senhora, que sempre estiveram ao meu lado fazendo a minha caminhada ser mais leve e sutil mesmo nos momentos em que eu achava que não daria conta. Meu refúgio muitas das vezes em sua palavra, onde meu coração se tranquilizava e vinha a certeza de que a vitória chegaria, bastava eu confiar nEle. Agradecer pelas bençãos que Ele me concedeu como privilegio de poder estudar nessa instituição federal e pelas conquistas durante esses cinco anos.

Aos meus avós, minha mãe, meu “quase pai” e aos meus tios por todo apoio, pela motivação de ser melhor, por acreditarem no meu potencial. Em especial ao meu avô, minha avó e minha mãe por abdicarem de qualquer coisa para que meu sonho pudesse virar realidade. Obrigada pela paciência, confiança, amor e carinho durante todos esses anos, por muitas vezes a minha ausência foi longa, mas a compreensão de vocês era algo que me dava forças para que eu fosse orgulho para cada um de vocês. Vocês são tudo para mim.

Ao Pedro, meu amor, amigo, companheiro e refúgio por muitas vezes diante as tribulações. Não tenho dúvidas de que você foi essencial na minha caminhada, começando pela sua força em me motivar a estudar para passar no vestibular, mostrando sempre que eu era capaz bastante eu acreditar em mim.

Aos meus amigos de caminhada de vida, Thiago e Marcia, Tainara e Lunara vocês acreditaram em todo momento em mim, me deram apoio e incentivo.

Aos meus amigos da graduação, Ana Lidia, Samara, Weverson, Maria Cristina por todas as palavras de carinho, de força e motivação. Thaynara, Hellen e Vitor por serem presentes para a vida, por estarem ao meu lado em todos os momentos, por todas as noites de estudos, pelos desesperos compartilhados e por todo carinho que passavam para mim todos os dias em nossas rotinas cansativas.

A todo o corpo docente da Universidade de Brasília que me proporcionou um ensino de qualidade e contribuiu para o meu despertar profissional e pessoal.

Não poderia deixar de expressar o meu agradecimento e reconhecimento às minhas queridas orientadora e co-orientadore, Jamila Reis e Izabel Silva, pela presença amiga e afetuosa. Obrigada pela confiança em mim depositada, pela orientação e por todos os momentos em que se mostraram dispostas a me ajudar diante das minhas dificuldades. Pela disponibilidade, paciência e generosidade, minha enorme admiração e gratidão.

JENYFFER RIBEIRO

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURA.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO TEMA A SER ESTUDADO	12
Glândula tireoide	12
Câncer de tireoide.....	12
Radiofármaco Iodeto de Sódio Iodo 131	15
Citocromo p450.....	17
CYP2D6 (<i>CYP2D6*4</i>)	19
CYP1A1 (<i>CYP1A1*m1</i>).....	19
JUSTIFICATIVA	20
OBJETIVOS	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	21
ARTIGO.....	24
RESUMO.....	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MÉTODO.....	29
2.1 Cálculo da amostra	29
2.2 Comitê de ética, critérios de inclusão e exclusão.....	29
2.3 Amostras	29
2.4 Extração de DNA e genotipagem	30
2.5 Análise estatística	32
3. RESULTADOS	33
3.1 Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs4646903 no gene CYP1A1 em CPT.....	34
3.2 Frequência genotípica e alélica do polimorfismo genético CYP2D6 1846 G/A	34
4. DISCUSSÃO.....	36
5. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	40

ANEXOS	43
Anexo 1: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	43
Anexo 2: Dados clínicos dos prontuários dos pacientes	51
Anexo 3: Normas da revista científica de escolha para publicação – Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML)	52

RESUMO

O carcinoma papilífero de tireoide é a malignidade endócrina mais comum, representando cerca de 80-85% dos casos. Os polimorfismos CYP2D6*4 e CYP1A1*m1, codificam enzimas responsáveis pela metabolização de fármacos, levam a variação da atividade enzimática e por sua vez a suscetibilidade ao câncer. Nesse contexto, este estudo teve por objetivo investigar a associação entre os polimorfismos CYP2D6*4 e CYP1A1*m1 em pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide em um grupo de pacientes do Instituto Médico de Brasília (IMEB). Tratou-se de um estudo caso controle composto por 31 pacientes compondo o grupo caso (portadores de CPT), e 81 controles com anotações das características clínicas do prontuário e análise da genotipagem por meio da estratégia de PCR. Pode-se observar que não houve diferença estatística com relação a distribuição genotípica entre os alelos homozigotos e heterozigotos do CYP1A1*m1. No gene CYP2D6*4 verificou-se que a presença do alelo G funcional está associado a um fator protetor contra o câncer de tireoide e a mutação homozigota AA, ou heterozigota GA atuam como fator de risco. Conclui-se que o alelo G funcional é um fator protetor o polimorfismo CYP2D6*4, enquanto que as mutações homozigotas AA e heterozigota GA podem levar uma piora de prognostico nesse grupo de pacientes.

Palavras-chave: Carcinoma papilífero, CYP2D6*4, CYP1A1*m1, Polimorfismo, Iodoterapia.

ABSTRACT

Papillary thyroid cancer is the most common endocrine malignancy, accounting for about 80-85% of cases. The polymorphisms CYP2D6*4 and CYP1A1*m1, code enzymes responsible for the metabolization of drugs, lead to the variation of enzymatic activity and in turn the susceptibility to cancer. In this context, this study aimed to investigate the association between CYP2D6*4 and CYP1A1*m1 polymorphisms in patients with papillary thyroid carcinoma in a group of patients from the Medical Institute of Brasília (IMEB). It was a control case study composed of 31 patients comprising the case group (patients with TPC), and 81 controls with annotations of the clinical characteristics of the medical record and analysis of the genotyping by means of the PCR strategy. It can be observed that there was no statistical difference regarding the genotypic distribution between the homozygous and heterozygous alleles of CYP1A1*m1. In the CYP2D6*4 gene it was found that the presence of the functional G allele is associated with a protective factor against thyroid cancer and the mutation homozygous AA, or heterozygous GA acts as a risk factor. It is concluded that the functional G allele is a protective factor for the CYP2D6*4 polymorphism, whereas homozygous mutation AA and heterozygous GA may lead to a worsening of prognosis in this group of patients.

Keywords: Papillary carcinoma, CYP2D6*4, CYP1A1*m1, Polymorphism, Iodotherapy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição oligonucleotídeos	30
Tabela 2. Condições de termociclagem para PCR	30
Tabela 3. Reagentes para PCR	31
Tabela 4. Reagentes para digestão enzimática	31
Tabela 5. Análise dados clínicos dos pacientes.....	33
Tabela 6. Relação Sexo X Incidência	33
Tabela 7. Polimorfismo do gene CYP1A1 em pacientes com CPT e controles	34
Tabela 8. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo CYP2D6 nos grupos caso e controle.....	35

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Carcinoma Papilífero e Folicular . Fonte: (BARBOSA, G.L., VALGAS,G.O. 2004)	134
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A- Adenina
Arg- Arginina
BRAF -gene da Raf quinase do tipo B
CYP- Citocromo p450
CYP2D6- Citocromo p450 2D6
CYP1A1- Citocromo p450 1A1
C-Citosina
CFT- Carcinoma Folicular da Tireoide
CPT- Carcinoma Papilífero de Tireoide
DNA- Ácido desoxirribonucléico
dNTPs- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
G –Guanina
HT- Hormônios tireoidianos
I¹³¹ – Iodeto de sódio
IC- Intervalo de Confiança
IMC- Índice de Massa Corporal
INCA- Instituto Nacional do Câncer
KeV – Quilo eletron volt
mg –Miligrama
mL–Mililitro
mm – Milímetro
mM–Milimolar
NCBI – *National Center for BiotechnologyInformation*
OR – Odds Ratio
PB – Pares de bases
P –p-valor
PCI- Pesquisa de Corpo Inteiro
PCR –Reação em cadeia da polimerase
SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único
T – Timina
TK- Tirosina Kinase
TRH- Hormônio Regulador Tireotropina
TSH- Hormônio Tiroestimulante
T3-Triiodotironina
T4- Tetraiodotironina
µl – Microlitro
χ²– qui-quadrado
β- Beta
α- Alfa
γ- Gama

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO TEMA A SER ESTUDADO

Glândula tireoide

Dentre as glândulas endócrinas, tem-se a glândula tireoide que se situa no plano mediano do pescoço, localizada anteriormente a traqueia e a laringe. Têm forma de um H ou U. Apresenta dois lobos (direito e esquerdo), unidos por uma fita variável de tecido glandular, denominada istmo (TORTORA & NIELSEN, 2013).

Histologicamente é formada por dois principais tipos de células parenquimatosas: as foliculares, onde há maior concentração de iodo e produção dos hormônios tireoidianos (HT); Triiodotironina(T3) e tetraiodotironina ou tiroxina (T4), e as parafoliculares, na qual é produzido o hormônio calcitonina (ROBBINS & COTRAN, 2015).

A glândula tireoide possui relação direta entre o hipotálamo e hipófise, onde os estímulos ativam o hipotálamo à liberação do hormônio regulador tireotropina (TRH), que age sobre a adenohipófise estimulando a secreção de tireotropina (TSH), que, finalmente, regula a síntese e a secreção dos hormônios tireoidianos: T3 e T4. O aumento das concentrações desses, são controlados, via *feedback* negativo, pelo hipotálamo e adenohipófise que são inibidos, até os níveis de T3 e T4 normalizarem na corrente sanguínea (TORTORA & NIELSEN, 2013).

O iodo tem um importante papel para a formação da tirosina e da triiodotirosina, são essenciais para manutenção do metabolismo normal de todas as células, o iodeto é capturado no líquido extracelular e transportado para as células glandulares e os folículos da tireoide. Esse iodo é captado para dentro das células, onde será sintetizado e secretado nos folículos a tireoglobulina, que contém resíduos de tirosina. Estes resíduos serão substratos que se combinam com o iodo para formação dos hormônios tireoidianos T3 e T4 (BERNADÁ,2004).

Câncer de tireoide

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2016), câncer de tireoide é uma condição adquirida, de crescimento desordenado das células, que invadem tecidos e órgãos acompanhados da perda ou redução da diferenciação celular. É a neoplasia maligna mais comum do sistema endócrino e o segundo tumor maligno mais comum da região cabeça e pescoço (WRESSMANN;SINGH, 2008).

A estimativa feita pelo Instituto Oncoguia para 2018/2019, espera-se para o Brasil 1.570 novos casos de câncer de tireoide para o sexo masculino e 8040 para o sexo feminino, com risco estimado de 1,76 casos a cada 100 mil homens e 7,02

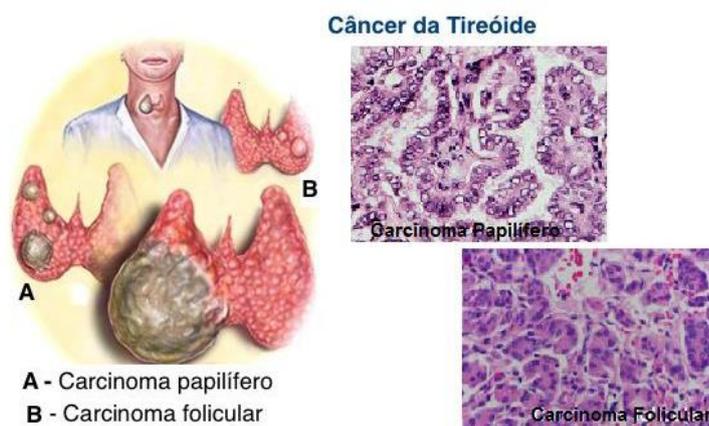
casos a cada 100 mil mulheres, acometendo três vezes mais as mulheres (Instituto Oncoguia,2018).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, a partir de dois grupos celulares de origem embrionária, as células C neuroendócrinas e produtoras de calcitonina, originam o carcinoma medular; e as células foliculares, produtoras de T4, e tireoglobulina que originam os tumores bem diferenciados e indiferenciados (Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço,2018).

Os carcinomas bem diferenciados são os papilíferos e foliculares, sua incidência é de 80% dentro dos casos papilíferos e 10% dos foliculares; crescem lentamente e se desenvolvem em apenas um lobo da glândula tireoide, podendo ocorrer nos dois e se disseminar para os nódulos linfáticos do pescoço, e outros órgãos se tratando do folicular (Figura 1). Os indiferenciados ou anaplásicos são de maior dificuldade de detecção acometendo cerca de 2% dos casos, estes são mais raros e altamente agressivos, apresentando alto potencial metastático. Os medulares costumam ser agressivos e normalmente aparecem com uma massa única tumoral e se desenvolve a partir das células C das glândulas, podendo disseminar para os gânglios linfáticos, pulmões, fígado antes mesmo que diagnosticado (Projeto Diretrizes- Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço,2001).

As funções fisiológicas da tireoide, podem ser preservadas no carcinoma de tireoide. Tanto as células normais quanto as neoplásicas foliculares, expressam as proteínas regulares do organismo, como a tireoglobulina e a co-transporte simporte sódio-iodo (NIS) (HANS GRAF, 2005).

Figura 1. **Carcinoma Papilífero e Folicular**



Fonte: (BARBOSA, G.L., VALGAS,G.O. 2004)

Nos últimos anos há um crescente interesse, vem se expandindo rapidamente, no conhecimento de alterações genéticas que ocorrem no câncer de tireoide. Isto originou novas teorias sobre a etiologia deste, fornecendo novas ferramentas de diagnósticos e marcadores de prognósticos (BUFFET, C.; GROUSSIN, L, 2015).

As diferenças histopatológicas são fatores determinantes para definir a patogênese molecular dos carcinomas da tireoide, uma vez que diversas causas genéticas poderiam explicar sua origem. No carcinoma papilífero de tireoide (CPT), a mutação ocorre por transversão de timina para adenina no exón 15 do gene da Raf quinase do tipo B (*BRAF*), o que ocasiona a substituição do aminoácido valina por glutamato na proteína. Esta mutação leva a uma ativação constante da *braf* quinase pela inserção de um resíduo carregado negativamente adjacente a um sitio de fosforilação, ocasionando a ruptura das interações hidrofóbicas entre resíduos no local de ligação do ATP, que o mantinha na conformação inativa. A mutação no gene *BRAF* é altamente expressa em neurônios e testículos e em menores níveis nas células hematopoiéticas e na tireoide (MACIEL;KIMURA; CERUTTI, 2005).

Segundo Maciel, Kimura e Cerutti (2005), outra mutação no CPT são os rearranjos *RET* (*rearranged during transfection*)/CPT. O gene *RET* não é expresso nas células foliculares da tireoide, porém ocorrem rearranjos cromossômicos entre genes *RET* e heterólogos, o que originam genes quiméricos *RET/CPT*. Tal rearranjo é uma fusão da região tirosina quinase (*TK*) do oncogene *RET* com a região terminal 5' de outro gene denominado *H4/D10S170*. A forma alterada do gene *RET* permite a expressão nas células foliculares, o qual era inativo, perdendo os domínios extra-celulares e parte do domínio transmembrana de *RET*.

No carcinoma folicular de tireoide (CFT) as mutações não são tão bem esclarecidas quanto no CPT. Algumas evidências têm sido relevantes para o CFT, sendo: o gene decorrente da fusão de *PAX8* (*paired box8*) e *PPAR β* (do inglês *peroxisome proliferator-activated gamma*), as mutações no gene *RAS* e a expressão ou perda de uma série de genes como *DDIT3* (DNA transcrição induzível de danos), *ARG2* (arginina tipo 2), *ITM1* (proteína de membrana integrada 1) e *Clorf 24* (cromossomo 1 aberto a leitura do fragmento 24) (MACIEL;KIMURA; CERUTTI, 2005).

O diagnóstico de ambos é feito por um método simples de citologia obtido por uma punção aspirativa com agulha fina. O prognóstico da doença por vezes é

favorável, porém o impacto social e econômico origina uma grande preocupação (SANTORO; VECCHIO,2010). Entre 7 a 20% dos pacientes podem evoluir com metástase não respondendo ao tratamento radioterápico, que acaba contribuindo para cerca de 1400 mortes anuais (MACIEL;KIMURA; CERUTTI, 2005).

O tratamento varia de acordo com o tipo histológico e o estadiamento clínico do tumor, apresenta-se como indicação inicial a ressecção cirúrgica (tireoidectomia), seguida de ablação com o radiofármaco Iodeto de sódio-131, o que leva a um prognóstico melhor com uma sobrevida longa em 80% dos casos. Após o tratamento, o uso de levotiroxina, é recomendado para reduzir os níveis séricos de TSH, minimizando o crescimento de qualquer tumor residual. Embora a sobrevida seja elevada, algumas recorrências nos carcinomas papilíferos e foliculares envolvendo linfonodos cervicais e metástases a distância não podem ser desprezadas, pela prevalência entre 7-20% dos pacientes (WARD,2004).

Fatores de risco têm sido descritos na literatura, onde a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) menciona alguns deles, evidenciado que, no entanto, nem todos indivíduos que passarem por tais situações serão acometidos pelo câncer, porém estão mais vulneráveis. Tais fatores são: tratamentos com radiação para a cabeça, pescoço ou tórax, especialmente na infância ou adolescência; história familiar de câncer de tireoide; grande nódulo ou em rápido crescimento e idade superior a 40 anos (Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia,2018).

Radiofármaco Iodeto de Sódio Iodo 131

Conforme a RDC nº38, 2008:

Radiofármaco é todo medicamento com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando pronto para o uso, contém um ou mais radionuclídeos em sua composição (RDC nº 38, 2008). A farmacocinética dos radiofármacos são determinadas de acordo com suas características físico-químicas, o que definirá onde será a fixação no órgão alvo, metabolização e eliminação do organismo. Enquanto as características físicas de um radionuclídeo determinam a aplicação do composto em diagnóstico ou terapia.

Nuclídeo é caracterizado pelo número atômico (Z) e número de massa (A), cuja estabilidade é determinada pela relação dos números de prótons e nêutrons. Quando seu núcleo é instável (radionuclídeo) transforma-se em outro mais estável

que emiti partículas (α, β^+, β^- , elétrons *Auger*) e/ou radiação eletromagnética (raios γ ou X), esse fenômeno é denominado radioatividade (OLIVEIRA, 2006).

A radiação beta (β) e gama (γ) possuem um poder penetrativo maior do que as partículas α , essas causam menores danos biológicos. Em meio aquoso no corpo humano estas partículas, conseguem se intensificar quebrando as moléculas de água formando radicais livres danificando o material biológico. Radionuclídeos com emissões de raios γ acompanham partículas, mas não contribuem para a eficácia de terapias. Emissões β^- fornecem uma dose de radiação uniforme onde sua deposição é nos tecidos alvos (tumores são heterogêneos). As α são emissões escolhidas quando a radiação é de pequeno alcance (OLIVEIRA, 2006).

A iodoterapia é uma terapia antiga, utilizada há mais de 70 anos, mundialmente empregada no tratamento do carcinoma de tireoide (NELSON, et al, 1996). Seus principais objetivos são: a radioablação, com a finalidade de acabar com os remanescentes glandulares após a tireoidectomia; e a terapêutica, eliminando os tecidos remanescentes para evitar atividades progressivas de metástases regionais e à distância (SAPIENZA, 2005).

A comissão Nacional de Energia Nuclear, por meio da norma 3.05 de 2013, refere-se ao radiofármaco como a substância radioativa que obtém propriedades física, químicas e biológicas. Determinados fatores influenciam a captação do radiofármaco no órgão alvo: por afinidades do radiofármaco pelo órgão, a forma a ser administrada e a vascularização do órgão (Comissão Nacional de Energia Nuclear, 2013).

O radiofármaco iodeto de sódio (^{131}I) é um radioisótopo artificial de emissão de raios γ e β^- onde é produzido por reatores nucleares pela irradiação do Telúrio, com energia de 364 KeV com energia de 364 KeV para raios γ utilizada para diagnóstico, e para β^- 606 KeV com fim de terapia variando de acordo com a dose. Possuem meia-vida física de 8,02 dias, fornecido para utilização clínica na forma de sal iodado (RAMOS, 2010). Têm como característica decaimento por emissão beta menos (β^-), destruindo as células, cancerosas ou normais, que o captam e o mantêm em seu interior por algum tempo como ocorre com as células tireoidianas foliculares ou com as metástases derivadas deste tecido. Uma das desvantagens deste tratamento é a maior chance dos efeitos colaterais, pois não têm especificação das células as quais irão ser afetadas (JUNIOR, et al, 2012).

O iodeto de sódio pode ser absorvido e incorporado pela tireoide nos folículos de armazenamento, com isso além de ser utilizado como tratamento na erradicação das células cancerosas, é empregado como marcador de dosagem de tireoglobulina (TG) para a pesquisa de corpo inteiro (PCI) onde rastreia-se as metástases, pois é possível que com a interação com a radiação γ resulte em um sinal luminoso no local identificado pela presença de iodeto (BARBOSA; VALGAS).

O iodeto de sódio é administrado comumente por via oral em forma líquida, sendo concentrado nos tecidos tireoidianos, glândulas salivares e no estômago. Este será eliminado pela urina, fezes e suor. Em um primeiro momento o nível de radiação no organismo será elevado, porém com o passar tempo decai de acordo com a ingestão de líquidos consumidos (BARBOSA; VALGAS).

O NIS é o principal responsável para a eficácia do tratamento visto que ele é necessário para manter a concentração de ^{131}I dentro das células neoplásicas, onde a dose de radiação absorvida no tecido é dependente da concentração de ^{131}I para exercer sua função. Alguns fatores externos podem comprometer a captação da radiação: a competição com o iodo não radioativo, uma vez que o iodo radioativo possui as mesmas propriedades que o iodo orgânico e a supressão dos níveis de TSH, devido a terapia com a tiroxina. Logo a melhor combinação para o tratamento e em conjunto com a terapia supressora de tiroxina (SAPIENZA, 2005).

Citocromo p450

O citocromo P450 (CYP) é uma superfamília de enzimas heme-tiolato que desempenha papel central no metabolismo oxidativo, peroxidativo e redutivo de compostos endógenos, incluindo ácidos graxos, esteróides, leucotrienos, prostaglandinas, ácidos biliares e vitaminas lipossolúveis. Muitas dessas enzimas expressas em níveis elevados no retículo endoplasmático dos hepatócitos, são responsáveis pela detoxificação de compostos exógenos, como diversos fármacos, carcinógenos e contaminantes ambientais (NICARETA,2004).

As CYP's são preferencialmente expressas na área centro lobular do fígado, suas enzimas estão localizadas no retículo endoplasmático liso (REL) de diferentes tipos de células. As principais subfamílias encontradas em animais e seres humanos são CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E, CYP3A e CYP4A (NICARETA,2004).

Essas enzimas estão intimamente envolvidas com o metabolismo de fármacos. A biotransformação dos xenobioticos ocorrem em duas fases, onde as

enzimas do citocromo P450 em sua maioria estão presentes no fígado irão realizar o metabolismo de fase 1 que consiste, basicamente, na hidrólise, redução, ou oxidação e geralmente resulta na introdução ou perda de um grupo funcional, tal como -OH, -NH₂, -SH, -COOH, ou, produzindo um intermediário quimicamente reativo (VASQUEZ,2010).

O metabolismo de fase 2 consiste principalmente em conjugação com sulfato glicurônico, glutatona, ou um aminoácido. Os metabólitos da reação de fase 2 são facilmente excretados na urina ou bile. As reações de fase 1 podem aumentar ou eliminar a atividade biológica do substrato xenobiótico, enquanto as reações de fase 2 tipicamente inativam a fase 1 e facilitam a eliminação do seu metabolito, transformando substratos lipofílicos em moléculas solúveis em água que podem ser transportados para a circulação ou a bile (ANZENBACHER,2001).

Estudos feitos por CÉSPEDES-GARRO e colaboradores, 2014 puderam evidenciar a diferença nas variações de metabolização de fármacos entre diferentes grupos étnicos latino americanos com populações mestiças, arremetem que o citocromo p450 é altamente polimórfico.

Variações genéticas em 1% dos indivíduos de uma espécie, na qual um específico gene apresenta variações em suas sequências codificantes, não codificantes ou reguladoras podem traduzir-se em fenótipos diferentes, o que pode ser compreendido como polimorfismo genético (SALAZAR-PELAÉZ, et al, 2012).

Dentre as variações, existe os SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) que são variações encontradas em 90% do genoma humano, podendo ocorrer um a cada 1000 pares de bases, podendo ser responsáveis por diversas patologias. Observados na região codificante ou na região reguladora do gene podem ocasionar a mudança na sequência de aminoácidos, alterando o desempenho do gene e por consequência de suas proteínas (SALAZAR-PELAÉZ, et al, 2012).

As mutações nos genes CYP podem causar uma deficiência enzimática, em que a expressão da enzima é diminuída, a especificidade entre enzima e substrato é alterada ou há um aumento da expressão da enzima. Com base na composição dos alelos, os indivíduos afetados podem ser divididos em quatro grandes fenótipos: metabolizadores pobres (MPs), tendo dois genes não funcionais, metabolizadores intermediários (MIs) sendo deficientes em um alelo, metabolizadores extensivos (ME), com duas cópias de genes normais e

metabolizadores rápidos (MUR) com três ou mais cópias funcionais do gene ativo (GOSHAL, et al,2014).

CYP2D6 (CYP2D6*4)

O CYP2D6*4, refere-se ao citocromo P450, família 2, subfamília D, isoenzima 6, variante alélica número 4. Está localizado no cromossomo 22q13.1 A CYP2D6 é uma enzima amplamente estudada pela sua relevância clínica, está envolvida no metabolismo de drogas como antipsicóticos, anti-hipertensivos, analgésicos e beta-bloqueadores (CÉSPEDES-GARRO, et al, 2014).

O tamoxifeno, medicamento utilizado no tratamento do câncer de mama, é metabolizado pela enzima CYP2D6. Estudos feitos por diversos autores CHIN *et al.* (2016), INGELMAN-SUNDBERG. (2005), PARK *et al.* (2012) comprovaram que os pacientes que possuíam o polimorfismo eram pobres metabolizadores, uma vez que reduzem o efeito do tamoxifeno por não formar seu principal metabólito ativo, o endoxifeno. Isto evidencia a importância do estudo do polimorfismo do CYP2D6, visto que a terapêutica de pacientes com o mesmo, torna-se menos eficaz.

O conhecimento dos polimorfismos sobre as atividades das enzimas CYP é importante pelo efeito modificador entre os indivíduos, o que arremete que de acordo com cada um desses polimorfismos é possível uma farmacoterapêutica mais adequada, visto que esses influenciam diretamente no metabolismo oxidativos das drogas (NYÍRŐ,et al, 2012).

A variante a alélica 4 do gene CYP2D6 caracteriza a função enzimática como pobre metabolizadora. Alguns fármacos não são metabolizados, uma vez não ativos, por consequência não possuem efeito propriamente no organismo, e elevam as chances de intoxicar o paciente e desenvolver os efeitos colaterais (Hospital Israelita Albert Einstein,2017).

CYP1A1 (CYP1A1*m1)

O gene CYP1A1, refere-se ao citocromo P450, família 1, subfamília A isoenzima 1, variante alélica m1, que codifica a isoforma CYP1A1, está localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q22-24). Possui uma distribuição tecidual no fígado, rim, pulmão e intestino, órgãos de ampla perfusão e grande capacidade de distribuição em termos farmacocinéticos, são as enzimas constitutivamente mais abundante em todas as espécies (ZORDOKY; EL-KADI,2010).

Entre os CYPs, CYP1A1 e CYP2E1 foram os mais comumente investigados sendo relacionados com o câncer. As enzimas codificadas pelos genes das

CYP2E1, CYP1A1 e CYP1A2 estão envolvidas na ativação de diversas substâncias cancerígenas, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas e heterocíclicos aminas (ZORDOKY; EL-KADI,2010).

A capacidade do sistema CYP, bem como as de reações microsossomais de fase 2 é aumentada por um processo de indução: um processo em que induz o aumento da concentração de uma droga ou de outro xenobiótico o que resulta no aumento de atividade de várias enzimas. Trata-se de um fenômeno relativamente comum e, geralmente é observado durante as fases de testes de novas drogas em desenvolvimento (GHANEM, et al, 2006).

O polimorfismo mais estudado é o T6235C que é comumente referido como polimorfismo de MspI, associado à regulação de CYP1A1 e transcrição da sua meia-vida , resultando em indução elevada da enzima e em níveis mais elevados de seus os intermediários ativados (ZORDOKY; EL-KADI,2010).

A enzima CYP1A1 é amplamente estudada pelo seu polimorfismo de restrição MspI (CYP1A1m1) na região 3' não codificante do gene, resultante da transição de uma timina para citosina (T→C), que parece promover aumento da sua expressão (ZORDOKY; EL-KADI,2010).

JUSTIFICATIVA

O avanço tecnológico junto a ciência, proporcionou um alto rendimento para o sequenciamento de ocorrências de novas anormalidades moleculares, o que permite a evolução acerca do diagnostico molecular do câncer de tireoide. Por vezes foram encontrados diversos marcadores moleculares do câncer de tireoide, em mais de 70% dos carcinomas diferenciados, isto leva a melhor compreensão dos seus mecanismos moleculares e as novas perspectivas de tratamento (ANDRADE, et al, 2016). Diante disto, as enzimas em estudo, CYP2D6 e CYP1A1, são importantes metabolizadoras de drogas, uma vez presente o polimorfismo nessas afetam a eficácia do tratamento, e o quadro diagnóstico de câncer (RUEDA,et al, 2008).

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi identificar a distribuição desse polimorfismo de nucleotídeo único (SNP's) na região 3801 do gene CYP1A1*m1 e na região 1846 do gene CYP2D6*4 em pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide comparando-os com o grupo controle. Além de avaliar possíveis relações entre esses polimorfismos e seus dados clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, Luis Jesuino O. et al . Protein molecular modeling of genetic markers for thyroid cancer. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro , v. 52, n. 5, p. 324-337, Oct. 2016.
- ANZENBACHER, Pavel; ANZENBACHEROVA, Eva. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 5-6, p. 737-747, 2001.
- BERNADÁ, MHG. Metabolismo do iodo. *Semin Bioquímica do Tecido Anim.* 2004;(I):1–12.
- BARBOSA, Gean Lucas; VALGAS, Glêcio Oliveira. A UTILIZAÇÃO DO ¹³¹I NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CÂNCER DE TIREÓIDE CARCINOMA PAPIÍAR.
- BUFFET, C.; GROUSSIN, L. Molecular perspectives in differentiated thyroid cancer. In: **Annales d'endocrinologie**. Elsevier Masson, 2015. p. 1S8-1S15.
- CHIN, Fee Wai et al. CYP2D6 genetic polymorphisms and phenotypes in different ethnicities of Malaysian breast cancer patients. **The breast journal**, v. 22, n. 1, p. 54-62, 2016.
- CÉSPEDES-GARRO, Carolina et al. Ethnic background and CYP2D6 genetic polymorphisms in Costa Ricans. **Revista de biologia tropical**, v. 62, n. 4, p. 1659-1671, 2014.
- Comissão Nacional de Energia Nuclear. *Instrução normativa n 3.05 de 17 de dezembro de 2013*. Dispõe sobre **Requisitos de segurança e proteção radiológica para serviços de medicina nuclear**.p 22-30.
- GHANEM, Mohamed M. et al. Apoptosis and Bax expression are increased by coal dust in the polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed lung. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 9, p. 1367, 2006.
- GHOSHAL, Ujjala et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, and CYP2E1 genes modulate susceptibility to gastric cancer in patients with *Helicobacter pylori* infection. **Gastric Cancer**, v. 17, n. 2, p. 226-234, 2014.
- Hospital Israelita Albert Einstein. Estudo Molecular do Polimorfismo *4 do Gene CYP2D6 [CYP2D6] [Internet]. 2017 [cited 2017 Jan 1]. Available from: <https://www.genomika.com.br/exames/CYP2D6/>

INGELMAN-SUNDBERG, Magnus. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. **The pharmacogenomics journal**, v. 5, n. 1, p. 6, 2005.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **O que é ?**. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>> Acesso em: 17/06/2018 às 11:31:02.

JÚNIOR, Luciano Monteiro Prado et al. Análise epidemiológica de portadores de câncer diferenciado de tireóide tratados com iodoterapia. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 1, n. 3, 2012.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abbas; ASTER, Jon C. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Pg 715-764. Elsevier Brasil, 2015.

MACIEL, Rui Monteiro de Barros; KIMURA, Edna T.; CERUTTI, Janete Maria. Patogênese dos tumores diferenciados da tireóide (papilífero e folicular). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2005.

NICARETA, Lilian. Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis*. 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná.

NYÍRÓ, Gábor et al. The effect of the CYP 2C19* 2 polymorphism on stroke care. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 99, n. 1, p. 33-39, 2012.

OLIVEIRA, Rita et al. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.

Oncoguia. **Estatística para câncer de tireoide**. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistica-para-cancer-de-tireoide/7406/234/>>. Acesso em: 29/05/2018 às 19:00:54.

PARK, In Hae et al. Lack of any association between functionally significant CYP2D6 polymorphisms and clinical outcomes in early breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen treatment. **Breast cancer research and treatment**, v. 131, n. 2, p. 455-461, 2012.

RAMOS, Vitor Santos. Filtros para imobilização de efluentes gasosos do iodo resultante da manipulação de materiais radioativos em serviço de medicina nuclear. 2010. Dissertação (Doutorado em Engenharia Nuclear) - COOPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- RUEDA, Lidiane Camila et al. Avaliação de polimorfismos nos genes CYP1A1, CYP2D6 e CYP19 em uma amostra de pacientes com câncer de mama esporádico. 2008.
- SANTORO, Massimo; VECCHIO, Giancarlo. Thyroid cancer: A molecular perspective. 2010.
- SALAZAR-PELAÉZ, Lina María et al. Polimorfismos genéticos da interleucina-1 e o risco de periodontite periapical crônica numa população de Antioquia, Colômbia. **Archives of Oral Research**, v. 8, n. 1, 2012.
- Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Diagnóstico e Tratamento do Câncer da Tireóide. In: Projeto Diretrizes. 2001. p. 1–10.
- SAPIENZA, Marcelo Tatit et al. Tratamento do carcinoma diferenciado da tireóide com iodo-131: intervenções para aumentar a dose absorvida de radiação. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 3, p. 341-349, 2005.
- Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Entendendo o câncer de tireoide**. Disponível em: <<https://www.endocrino.org.br/entendendo-o-cancer-de-tireoide/>>. Acesso em: 15/05/2018 às 14:59:34.
- SOUZA, Cármino A. et al. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2000
- TERAPÊUTICAS, Novas Considerações. Carcinoma de Tireóide Pouco Diferenciado. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 5, 2005.
- TORTORA, Gerard J.; NIELSEN, Mark T. **Princípios de Anatomia Humana**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000.
- VASQUEZ, M. L. M. et al. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO. **Medicamentos na prática clínica**, p. 45, 2010.
- ZORDOKY, Beshay NM; EL-KADI, Ayman OS. Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. **Pharmacology & therapeutics**, v. 125, n. 3, p. 446-463, 2010.
- WARD, Laura S. et al. Câncer diferenciado da tiroide: fatores prognósticos e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2004.
- WREESMANN, Volkert B.; SINGH, Bhuvanesh. Clinical impact of molecular analysis on thyroid cancer management. **Surgical Oncology Clinics**, v. 17, n. 1, p. 1-35, 2008.

ARTIGO

Título: Análise do polimorfismo CYP2D6*4 e CYP1A1*m1 em pacientes portadores de câncer de tireoide submetidos a iodoterapia.

Autores: Jenyffer R. Rosa ¹, Rafael M. de Moraes^{1,2}, Ligia C. de Abreu Cardoso¹, Otávio T. Nóbrega¹, Izabel Cristina R. da Silva¹, JAMILA R. de Oliveira¹.

Afiliações:

1. Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil;
2. Imagens Médicas de Brasília (IMEB), Brasília, DF, Brazil;

***Autor Correspondente:**

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Email: belbiomedica@gmail.com

Endereço: Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Brasília - DF. CEP:
72220-275

Aprovada em 29 de junho de 2018

RESUMO

O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é a malignidade endócrina mais comum, representando cerca de 80-85% dos casos. Os polimorfismos CYP2D6*4 e CYP1A1*m1, codificam enzimas responsáveis pela metabolização de fármacos, levam a variação da atividade enzimática e por sua vez a suscetibilidade ao câncer. Nesse contexto, este estudo teve por objetivo investigar a associação entre os polimorfismos CYP2D6*4 e CYP1A1*m1 em pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide em um grupo de pacientes do Instituto Médico de Brasília (IMEB). Tratou-se de um estudo caso controle composto por 31 pacientes compondo o grupo caso (portadores de CPT), e 81 controles com anotações das características clínicas do prontuário e análise da genotipagem por meio da estratégia de PCR. Pode-se observar que não houve diferença estatística com relação a distribuição genotípica entre os alelos homozigotos e heterozigotos do CYP1A1*m1. No gene CYP2D6*4 verificou-se que a presença do alelo G funcional está associado há um fator protetor contra o câncer de tireoide e a mutação homozigota AA, ou heterozigota GA atuam como fator de risco. Conclui-se que o alelo G funcional é um fator protetor o polimorfismo CYP2D6*4, enquanto que as mutações homozigotas AA e heterozigota GA podem levar uma piora de prognostico nesse grupo de pacientes.

Palavras-chave: Carcinoma papilífero, CYP2D6*4, CYP1A1*m1, Polimorfismo, Iodoterapia.

ABSTRACT

Papillary thyroid cancer is the most common endocrine malignancy, accounting for about 80-85% of cases. The polymorphisms CYP2D6 * 4 and CYP1A1 * m1, code enzymes responsible for the metabolization of drugs, lead to the variation of enzymatic activity and in turn the susceptibility to cancer. In this context, this study aimed to investigate the association between CYP2D6 * 4 and CYP1A1 * m1 polymorphisms in patients with papillary thyroid carcinoma in a group of patients from the Medical Institute of Brasília (IMEB). It was a control case study composed of 31 patients comprising the case group (patients with TPC), and 81 controls with annotations of the clinical characteristics of the medical record and analysis of the genotyping by means of the PCR strategy. It can be observed that there was no statistical difference regarding the genotypic distribution between the homozygous and heterozygous alleles of CYP1A1 * m1. In the CYP2D6 * 4 gene it was found that the presence of the functional G allele is associated with a protective factor against thyroid cancer and the mutation homozygous AA, or heterozygous GA acts as a risk factor. It is concluded that the functional G allele is a protective factor for the CYP2D6 * 4 polymorphism, whereas homozygous mutations AA and heterozygous GA may lead to a worsening of prognosis in this group of patients.

Keywords: Papillary carcinoma, CYP2D6*4, CYP1A1*m1, Polymorphism, Iodotherapy.

1. INTRODUÇÃO

A glândula tireoide está localizada anterolateralmente à traqueia e laringe, consiste em dois lóbulos ligados por um istmo. Histologicamente é formada por dois principais tipos de células parenquimatosas: as foliculares, onde há maior concentração de iodo e produção dos hormônios tireoidianos (HT) T3 e T4, e as parafoliculares, nas quais é produzido o hormônio calcitonina. As células foliculares podem originar os cânceres bem diferenciados (papilífero e folicular); já as parafoliculares, originam o câncer medular¹.

O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é a malignidade endócrina mais comum, representando cerca de 80-85% dos casos. São lesões solitárias ou multifocais no interior da tireoide, podendo ser circunscritas. Suas características morfológicas abrangem lesões com áreas de fibrose e calcificação, frequentemente císticas, o núcleo de suas células são grandes com cromatina muito finamente dispersa que confere aspecto opticamente claro, inclusões intranucleares e sulcos nucleares. Na inspeção macroscópica, o câncer de tireoide papilar apresenta-se como uma neoplasia invasiva de cor esbranquiçada que não possui uma cápsula¹.

De acordo com uma estimativa feita pelo instituto Oncoguia 2018/2019 para casos novos de carcinoma de tireoide, devem acometer cerca de 1570 (1,76%) homens e 8040 (7,02%) mulheres, sendo mais frequentes em pacientes na faixa etária de 30-50 anos, podendo acometer todas as idades ².

Os tratamentos sugeridos para os casos de CPT, são tireoidectomia total ou parcial, seguido em conjunto com a terapia supressora com tiroxina, o tratamento com o iodeto de sódio³. A administração deste leva a ablação de remanescentes glandulares e das atividades progressivamente maiores para o tratamento de metástases ganglionares, pulmonares e ósseas ⁴.

As células neoplásicas possuem a capacidade de manter, ao menos parcialmente, a concentração de iodo, servindo como um marcador para que a radiação possa alcança-las e leva-las à morte⁴.

O protocolo de tratamento foi definido pelo Instituto Nacional do Câncer – INCA, onde deve-se seguir as seguintes etapas: avaliação inicial; anamnese e exame físico: concomitância de outras doenças, como diabetes e hipertensão, e o tratamento que está recebendo para elas, pós-operatório imediato ou em tratamento supressivo com hormônio tireoideano: se em pós-operatório imediato,

deve-se aguardar 3 a 4 semanas, para dar-se a elevação do TSH; se em tratamento supressivo com hormônio tireoideano - se T3, suspendê-lo e aguardar de 2 a 3 semanas; se T4, suspendê-lo e aguardar de 4 a 6 semanas, uso de substâncias iodadas, necessidade de melhorar a captação de Iodo: prescrição de TSH recombinante⁵. De acordo com a resposta individualizada de cada paciente durante 24 horas após o início da iodoterapia determinando a dose absorvida pelos tecidos, é definida a dose terapêutica individualizada⁶

Denomina-se polimorfismo genético, variabilidades na sequência de DNA em uma determinada região, onde este é encontrado em uma frequência superior a 1% da população. Esses da mesma forma que influenciam na diversidade humana, podem atuar diretamente sobre fatores de riscos associados a doenças⁶.

Um dos polimorfismos mais estudados são os relacionados a superfamília CYP450. Este está relacionado a metabolização/detoxificação de xenobióticos, que por sua vez leva a modificação da atividade enzimática levando-as à metabolização ultrarrápida, normal, ou pobre⁷.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi identificar a distribuição desse polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na região 3801 do gene CYP1A1*m1 e na região 1846 do gene CYP2D6*4 em pacientes portadores de carcinoma papilífero de tireoide comparando-os com o grupo controle. Além de avaliar possíveis relações entre esses polimorfismos e seus dados clínicos.

2. MÉTODO

2.1 Cálculo da amostra

As amostras foram obtidas de um estudo de caso-controle com base hospitalar concluído em seis meses (junho a dezembro de 2017).

Para isto, a amostra foi calculada estimando-se a prevalência de 1% de câncer de tireoide entre os tipos de câncer na população adulta, consolidado em erro amostral de 5% e intervalo de confiança (IC) de 95%, em número de pacientes $n = 8450$, chegou-se a 12 participantes. Com a compensação de perdas, foi considerado uma amostra de 31 portadores de CPT. Por outro lado, o grupo controle foi composto por 81 participantes (43 mulheres e 38 homens, média de idade 52 anos \pm 6 anos) com indivíduos saudáveis pareados. Foram recrutados voluntários e indivíduos saudáveis acompanhando os pacientes no departamento geral de pacientes ambulatoriais (OPD).

2.2 Comitê de ética, critérios de inclusão e exclusão

O consentimento informado foi obtido de todos os sujeitos antes da coleta de informações. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional CAAE nº 57382416.6.0000.0023. Pacientes de ambos os sexos, idade maior que 18 anos, com câncer da tireoide e que seriam submetidos a iodoterapia no serviço de Medicina Nuclear Imagens Médicas de Brasília (IMEB). Para o grupo controle, indivíduos de ambos os sexos, que não possuem casos de câncer, não submetidos a iodoterapia e não aparentados dos pacientes do grupo caso. Participantes foram excluídos em ambos os grupos com idade menor do que 18 anos, que apresentassem diagnóstico de câncer da tireoide e não fossem eletivos à iodoterapia, bem como àqueles que não desejassem participar da pesquisa ou representantes legais que não consentissem.

2.3 Amostras

Este estudo foi composto por 31 indivíduos (20 mulheres e 11 homens; média de idade 43 anos \pm 13 anos), foi realizado na Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, Brasil.

2.4 Extração de DNA e genotipagem

Procedimentos técnicos laboratoriais foram realizados a fim de coletar amostras de sangue venoso, cerca de 5 mL, em material adequado, novo e descartável após a iodoterapia, para isolamento do DNA. O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do do PureLink® Genomic DNA Mini Kit da empresa Invitrogen (catálogo #K1820-02, lote #19339891). A concentração de DNA foi determinada através da corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. O rendimento médio alcançado foi de 20 ng/μL. Em seguida, o DNA diluído foi submetido à estratégia PCR (Polymorphism Polymerase Chain Reaction) para estudo da distribuição dos SNPs.

As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para avaliar os polimorfismos foram, respectivamente:

Tabela 1. Descrição oligonucleotídeos

GENE	OLIGONUCLEOTÍDEO	REFERÊNCIA
CYP2D6*4 rs3892097	<i>Foward 5' GCC TTC GCC AAC CAC TCC G 3'</i> <i>Reverse 5' AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC 3'</i>	Nepomnyashchikh, Vavilin et al.2012
CYP1A1 rs4646903	<i>Foward 5'-GGCTGAGCAATCTGACCCTA- 3'</i> <i>Reverse 5'-GGCCCCAACTACTCAGAGGCT-3'</i>	Li et al., 2004

As condições de termociclagem para o gene CYP2D6*4 e CYP1A1, realizadas no equipamento Termociclador Techne modelo TC-512, foram descritos na tabela abaixo:

Tabela 2. Condições de termociclagem para PCR

GENE	DESNATURAÇÃO INICIAL	DESNATURAÇÃO	ANELAMENTO	EXTENSÃO	EXTENSÃO FINAL
CYP2D6*4	94°C por 5 minutos	30 ciclos 94°C por 30'segundos	60°C por 15 segundos	72°C por 20 segundos	72°C por 7 minutos
CYP1A1	95°C por 5 minutos 64 °C por 2 min e 75°C por 2 min	33 ciclos 94°C por 60'segundos	64°C por 60 segundos	75°C por 60 segundos	72°C por 10 minutos

Em cada reação para CYP2D6*4 e CYP1A1 foram utilizados os seguintes reagentes:

Tabela 3. Reagentes para PCR

GENE	TAMPÃO 10X	MgCl ₂ 50mM	dNTPs	Taq-Polimerase	Oligonucleotídeo <i>foward e reverse</i>	Água Milli-Q
CYP2D6*4	12,5µl	3,8µl	5µl	2µl	5µl	37,8µl
CYP1A1	2,5µl	0,5µl	0,5 µl	0,5 µl	1,5µl	25µl

O produto da PCR para rs3892097 trata-se de um fragmento de 355 pb, foi submetido a digestão com a enzima de restrição BseBI e em seguida a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3% com brometo de etídio na potência de 80W por 1 hora. Logo foi possível visualizar o polimorfismo CYP2D6*4 em duas bandas de 105 e 250pb, definidas como alelo selvagem G, o aparecimento de um fragmento não digerido de 355pb indica a presença da mutação A de CYP2D6*4, denominado mutação homozigótica. No CYP2D6*4 selvagem, existe um local de restrição que se perde em indivíduos que tiveram a troca de base G para A. Como consequência, esta enzima não corta o DNA genômico devido a mutação homozigótica. Fenotipicamente, os indivíduos portadores do genótipo GG são considerados metabolizadores ultra-rápidos; os de genótipo GA são considerados metabolizadores intermediários e AA são lentos.

Contudo a PCR correspondente à rs4646903 foi de um fragmento de 739 pb, que ao realizar a digestão com a enzima de restrição *MspI* (*New England Biolabs*, Inc. Beverly, MA, USA) e submete-la uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 3% com brometo de etídio na potência de 100W por 30 minutos, obteve-se que o alelo mutante (C) cria um novo sítio de restrição, e o fragmento de 739pb é clivado em dois de 408pb e 362pb. O alelo selvagem (T) do gene CYP1A1 não é clivado pela enzima, e, assim, o polimorfismo foi dividido em genótipo de clivagem (C/C), heterozigoto (T/C), e genótipo de não clivagem (T/T).

Os sistemas de digestão foram montados da seguinte forma:

Tabela 4. Reagentes para digestão enzimática

GENE	PCR	TAMPÃO DA ENZIMA	ENZIMA	ÁGUA MILI-Q	BANHO MARIA
CYP2D6*4	10 µl	2,0 µl	1µL de BseBI (10U/µL)	17µL	60°C por 1 hora
CYP1A1	10 µl	2,0 µl	1µL de <i>MspI</i> (10U/µL)	17µL	37°C por 3 horas

2.5 Análise estatística

A aderência ao equilíbrio Hardy-Weinberg para a frequência genotípica em controles foi analisada pelo teste do qui-quadrado com um grau de liberdade. As frequências genotípicas e alélicas dos pacientes portadores do câncer papilífero da tireoide que foram submetidos a iodoterapia foram comparadas ao grupo controle por meio do teste qui-quadrado em modelos recessivos e dominantes. A associação de características clínicas para cada genótipo foi analisada com o teste qui-quadrado e foi adotado o nível de significância de 5%.

Também foram calculadas Odds Ratio (OR) das frequências alélicas e genotípicas, com intervalo de confiança (IC) de 95%. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. RESULTADOS

De acordo com os dados clínicos idade, sexo e índice de massa corporal (IMC) obtidos através dos prontuários dos pacientes, ilustrados na tabela 5, pode-se observar que a média de idade entre o grupo caso foi de 46,09 anos \pm 11,65, com a idade mínima de 24 anos e máxima de 65 anos. O IMC desse grupo obteve uma média de \pm 27,79Kg/m² com desvio padrão de 5,64; valor mínimo de 17,58 Kg/m² máximo 40,58Kg/mg², de acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS,2009; preconiza-se que: magreza (IMC < 22 Kg/m²), eutrofia (IMC entre 22 e 27 Kg/m²) ou excesso de peso (IMC > 27 Kg/m²)⁸.

Tabela 5. Análise dados clínicos dos pacientes

		Descritivos							
		N	Média	Erro Desvio	Erro Erro	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
Idade	GG	10	43,800	7,6999	2,4349	38,292	49,308	30,0	52,0
	GA	9	52,667	11,6619	3,8873	43,703	61,631	36,0	65,0
	AA	3	34,000	13,2288	7,6376	1,138	66,862	24,0	49,0
	Total	22	46,091	11,6534	2,4845	40,924	51,258	24,0	65,0
IMC	GG	10	28,0220	5,24693	1,65923	24,2686	31,7754	20,81	38,86
	GA	9	28,3089	6,98881	2,32960	22,9368	33,6810	17,58	40,48
	AA	3	25,4733	2,34926	1,35635	19,6374	31,3092	23,67	28,13
	Total	22	27,7918	5,64261	1,20301	25,2900	30,2936	17,58	40,48

De acordo com o sexo do banco em questão pode-se observar que 61% eram de mulheres, sendo equivalente a 1,5 mulheres para cada homem em estudo como pode ser observado na tabela 6, referente a relação dos pacientes para o estudo do polimorfismo da CYP2D6. No entanto não houve diferença estatística entre os sexos de ambos os genes, onde o $p=0,292$.

Tabela 6. Relação Sexo X Incidência

		CYP2D6							
		GG		GA		AA		Total	
		Contagem	% de N da coluna						
Sexo	F	5	50,0	7	77,8	1	33,3	13	59,1
	M	5	50,0	2	22,2	2	66,7	9	40,9
	Total	10	100,0	9	100,0	3	100,0	22	100,0

p=0,292

3.1 Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs4646903 no gene CYP1A1 em CPT

A frequência genotípica do polimorfismo rs4646903 no gene CYP1A1 nos controles estava em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P=0,318$). A distribuição genotípica deste polimorfismo não é estatisticamente diferente em relação aos participantes de CPT quando comparados com os indivíduos controles (genótipos TT, TC e CC – 13, 14 e 4, respectivamente – contra 16, 11 e 4, respectivamente, $P=0,0715$). Além disso, não houve diferença significativa nas frequências alélicas entre pacientes com CPT e controles (alelo T, C: 40 e 22 contra 43 e 19, respectivamente, $OR=0,21$, e $P=0,559$), o que está representado na tabela 7.

Tabela 7. Polimorfismo do gene CYP1A1 em pacientes com CPT e controles

	Grupo				P	OR	IC (OR)
	CPT		Controle				
	N	%	N	%			
TT	13	41,9	16	51,6			
CT	14	45,2	11	35,5	0,715	N/A	N/A
CC	4	12,9	4	12,9			
Total	31	100,0	31	100,0			
TT	13	41,9	16	51,6	0,306	0,67	0,25-1,85
CT+CC	18	58,1	15	48,4			
Total	31	100,0	31	100,0			
T	40	64,5	43	69,4			
C	22	35,5	19	30,6	0,556	0,21	0,38-1,71
Total	62	100,0	62	100,0			

* $P<0,05$; NA = não se aplica

3.2 Frequência genotípica e alélica do polimorfismo genético CYP2D6 1846 G/A

A frequência genotípica do polimorfismo genético CYP2D6 1846 G/A nos controles estava em equilíbrio Hardy-Weinberg ($P=0,162$). A distribuição genotípica deste polimorfismo não é estatisticamente diferente em relação aos participantes de CPT quando comparados com os indivíduos controles (genótipos GG, GA, AA – 10, 9 e 3, respectivamente – contra 58, 19 e 4, respectivamente, $P=0,0591$). Porém, houve diferença significativa nas frequências alélicas entre pacientes com CPT e

controles (alelo G, A: 29 e 15 contra 135 e 27, respectivamente, OR=0,39 e P=0,011), o que está representado na Tabela 8.

Tabela 8. Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo CYP2D6 nos grupos caso e controle

	Grupos							
	CPT		Controle		P	OR	IC	
	N	%	N	%				
GG	10	45,5	58	71,6				
GA	9	40,9	19	23,5	0,0591	NA	NA	
AA	3	13,6	4	4,9				
Total	22	100,0	81	100				
GG	10	45,5	58	71,6				
GA+AA	12	54,5	23	28,4	0,021*	0,33	0,13-0,87	
Total	22	100,0	81	100				
G	29	65,9	135	83,3				
A	15	34,1	27	16,7	0,011*	0,39	0,18-0,82	
Total	44	100,0	162	100				

* P<0,05; NA = não se aplica

4. DISCUSSÃO

Em um estudo feito nos Estados Unidos por Xu e colaboradores, com o objetivo de associar a prevalência da obesidade com o carcinoma papilífero da tireoide, realizou-se a antropometria e o risco de CPT. Pode-se observar que para homens e mulheres em análises individuais e em grupo, houve um risco aumentado de CPT por aumento de 5%, em porcentagem da gordura corporal e por 5 Kg/m² com aumento do IMC. Os indivíduos obesos tiveram aproximadamente quatro vezes mais riscos a CPT do que indivíduos com o peso normal, homens com IMC elevados tiveram um risco ligeiramente maior do que as mulheres do grupo em estudo⁹.

A correlação do IMC com o câncer papilífero de tireoide dá-se pela associação de certos comportamentos alimentares, tais como excesso de ingestão de proteínas, pelo alto teor de nitrosaminas e hidrato de carbono, o que aumenta o risco ao CPT. Em um estudo feito em ratos mostrou-se que vegetais como batata doce, mandioca são metabolizados em tiocianatos, substância que induziu ao CPT em animais, no entanto não há nenhum estudo que comprovasse em humanos¹⁰.

De acordo com a literatura por um estudo de metanálise para a associação entre o aumento do IMC e o risco para câncer, entre homens e mulheres, e mais elevados quando idosos, pela elevação de peso, nos homens, um incremento de 5 Kg/mg² no IMC foi fortemente associado com adenocarcinoma esofágico ($p < 0,0001$), e câncer de tireoide ($p=0,2$), e um aumento do IMC houve associações positivas para câncer de tireoide, câncer retal, câncer de mama em ambos os sexos¹¹. Porém neste estudo mostrou que em relação entre os genótipos, os dados clínicos idade e IMC não houve diferença estatística, mostrando homogeneidade entre os grupos ($p > 0,05$).

No Brasil, segundo o INCA, a incidência de câncer de tireoide é 5 vezes maior entre as mulheres, do que o estimado para os homens, com um grupo de risco com a média de idade de 35 anos, e a prevalência entre jovens e idosos 25-65 anos¹². O presente estudo se enquadra dentro dos dados fornecidos pois 59,1% do banco são de mulheres, sendo 1,5 mulheres a cada homem.

No presente estudo foi verificado que o alelo G funcional do polimorfismo CYP2D6*4 está associado há um fator protetor contra o câncer de tireoide. Enquanto que os alelos T e C do polimorfismo CYP1A1 não há diferença estatística considerável.

Lemos e colaboradores buscaram investigar o polimorfismo CYP2D6*4 a sua frequência em associação com câncer de tireoide; foi realizada uma análise de associação em relação aos genótipos homozigotos A/A, GG e heterozigoto G/A. Os resultados mostraram que o genótipo homozigoto, retratado no estudo como pobre metabolizador, seria um fator protetor contra CPT¹³. Ao contrario deste estudo, conforme descrito na tabela 8, verifica-se que a presença do genótipo GG, quando dicotomizados considerados como ultrarrápidos, protege contra o carcinoma papilifero de tireoide.

Estudos feitos por diversos autores, como os de INGELMAN-SUNDBERG (2005), PARK *et al.* (2012) e CHIN *et al.* (2016), comprovaram que os pacientes que possuíam o polimorfismo CYP2D6*4, eram pobres metabolizadores, uma vez responsáveis pela metabolização do tamoxifeno, reduziã o efeito terapêutico do mesmo, pois não o convertiam em seu metabólito ativo, o endoxifeno^{14,15,16}. Estes estudos corroboram com a análise, uma vez que os pacientes com este polimorfismo, possuem uma chance elevada de seu tratamento não ser eficaz sendo um fator de risco para o câncer, conforme demonstrado na tabela 8.

O estudo de Souza e colaboradores, corrobora com os resultados encontrados, visto que a pobre metabolização do tamoxifeno ocasionada pela ingestão concomitante dos inibidores da CYP2D6 levou ao mesmo efeito que o polimorfismo da enzima CYP2D6*4, reduzindo a eficácia do tratamento endócrino com tamoxifeno e levando a uma pobre metabolização de fármacos. Houve um aumento na mortalidade em pacientes portadores de câncer de mama em pacientes com genótipo CYP2D6*4/4 (p-0,041 OR-4,1, IC 95%- 1,1) em comparação com pacientes do tipo selvagem. Também foi observado por esses autores, o aumento na recorrência do câncer de mama, quando comparados com metabolizadores ultrarrápidos. Assim, este polimorfismo, que dificulta o metabolismo, pode ser considerado um fator de risco no caso do CPT¹⁷.

Em um estudo realizado por Bufalo, Natassia (2012) a fim de verificar a influência do perfil genótipo do gene CYP1A1 no desenvolvimento do carcinoma de tireoide, pôde-se perceber que a herança do heterozigoto CT aumenta a susceptibilidade em 1,3 vezes para o carcinoma de tireoide. Entretanto seu Odds Ratio foi de 1,302, visto que OR maior que um é considerado um fator de proteção, não há confiabilidade nos dados¹⁹. Não houve diferença estatística entre os alelos homozigotos e heterozigotos no presente trabalho.

Rueda, Camila (2008) em seu estudo buscou relacionar o polimorfismo CYP1A1 e CYP2D6*4 com o risco de desenvolver câncer de mama esporádico. Para CYP1A1 a distribuição genotípica dos alelos m1 e m2 entre os casos e controle, obteve-se os alelos homozigotos selvagem em sua maioria entre eles, mantendo assim o equilíbrio de acordo com Hardy-Weinberg. O gene CYP2D6*4 apresentou uma frequência gênica de homozigotos selvagens de 0,11 nos casos e 0,18 nos controles, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg²⁰.

A análise do polimorfismo feita do gene CYP1A1 não apresentou associação com risco para câncer de mama. Para o CYP2D6*4 a comparação entre os casos e controle da atividade metabólica da enzima, não houve diferença estatística relevante, entretanto em alguns estudos com uma população espanhola, pode-se observar que há um risco aumentado de câncer de mama em indivíduos heterozigotos²⁰.

Gomes e colaboradores investigaram a associação dos polimorfismos CYP2D6*4 e CYP2D6*1, com a susceptibilidade a tumores da hipófise, pode se observar que tanto nos casos, quanto nos controles as frequências genotípicas tiveram uma diferença significativa. Não houve resultados significativos para CYP2D6*4, porém as variações do CYP2D6*1 levam a ser um fator de risco para susceptibilidade dos tumores da hipófise, cujo mecanismo se poderá requer a um aumento da metabolização de um pro-carcinogênico desconhecido ou a um desequilíbrio de ligação com outro gene envolvido no processo de gênese tumoral²¹.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a associação da distribuição genotípica com os dados clínicos, não se obteve diferença estatística mostrando homogeneidade entre os grupos.

Não há diferença na distribuição genotípica do polimorfismo do gene CYP1A1, nem na frequência alélica entre portadores de CPT e grupo controle. Já o polimorfismo do gene CYP2D6 embora não tenha diferença em sua distribuição genotípica entre os grupos, apresenta diferença nas frequências alélicas.

Há uma associação entre o polimorfismo CYP2D6*4 e o CPT, sendo o alelo G funcional desse polimorfismo um fator protetor, diferentemente do polimorfismo do gene CYP1A1, que não apresentou tal associação.

Tendo em vista que as enzimas CYP2D6 e CYP1A1 são extensivamente estudadas devido a sua importância clínica, a evolução das mesmas ainda não foi completamente compreendida. Por serem responsáveis pela mediação do metabolismo dos fármacos, sua variabilidade deve ser conhecida, visto que pode ser de extrema importância para realizar terapia individualizadas visando o melhor prognóstico do paciente. Estudos futuros devem ser realizados a fim de elucidar a relação entre o polimorfismo e a eficácia do tratamento, visto que não há na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KUMAR, Vinay; ABBAS, Abbas; ASTER, Jon C. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**.pg 715-764. Elsevier Brasil, 2015.
2. Oncoguia. **Estatística para câncer de tireoide**. Disponível em <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estatistica-para-cancer-de-tireoide/7406/234/>> Acesso em: 29/05/2018 às 19:00:27.
3. MACIEL, Rui. Carcinoma diferenciado da tireoide (papilífero e folicular): diagnóstico e conduta. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 42, n. 4, p. 299-305, 1998.
4. SAPIENZA, Marcelo Tatit et al. Tratamento do carcinoma diferenciado da tireoide com iodo-131: intervenções para aumentar a dose absorvida de radiação. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 49, n. 3, p. 341-349, 2005. Pubmed, PMID: 16543987.
5. AVALIAÇÃO. Iodoterapia do Carcinoma Diferenciado da Tireoide. **Revista brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 2, p. 187-189, 2002.
6. ROCHA, Andreia Possatti da et al. Polimorfismos genéticos: implicações na patogênese do carcinoma medular de tireoide. **Brazilian archives of endocrinology and metabolism. São Paulo. Vol. 51, n. 5 (jul. 2007), p. 723-730**, 2007.
7. CÉSPEDES-GARRO, Carolina et al. Ethnic background and CYP2D6 genetic polymorphisms in Costa Ricans. **Revista de biologia tropical**, v. 62, n. 4, p. 1659-1671, 2014. Pubmed, PMID: 25720195
8. GOMES, Leonor et al. CYP2D6 genetic polymorphisms are associated with susceptibility to pituitary tumors. **Acta medica portuguesa**, v. 18, n. 5, p. 339-43, 2005. Pubmed, PMID: 16611538
9. XU, Li et al. Obesity and the risk of papillary thyroid cancer: a pooled analysis of three case-control studies. **Thyroid**, v. 24, n. 6, p. 966-974, 2014. Pubmed, PMID: 24555500
10. GHANEM, Mohamed M. et al. Apoptosis and Bax expression are increased by coal dust in the polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed lung. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 9, p. 1367, 2006. Pubmed, PMID: 16966090

11. RENEHAN, Andrew G. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **The Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 569-578, 2008. Pubmed, PMID: 29430510
12. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA, 2016.
13. LEMOS, Manuel C. et al. Genetic polymorphism of CYP2D6 influences susceptibility to papillary thyroid cancer. **Clinical endocrinology**, v. 67, n. 2, p. 180-183, 2007. Pubmed, PMID: 17547692.
14. INGELMAN-SUNDBERG, Magnus. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. **The pharmacogenomics journal**, v. 5, n. 1, p. 6, 2005. Pubmed, PMID: 15492763.
15. PARK, In Hae et al. Lack of any association between functionally significant CYP2D6 polymorphisms and clinical outcomes in early breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen treatment. **Breast cancer research and treatment**, v. 131, n. 2, p. 455-461, 2012. Pubmed, PMID: 21437611.
16. CHIN, Fee Wai et al. CYP2D6 genetic polymorphisms and phenotypes in different ethnicities of Malaysian breast cancer patients. **The breast journal**, v. 22, n. 1, p. 54-62, 2016. Pubmed, PMID: 26510986.
17. SOUZA, Rodrigo Duarte Martins et al. Importância do CYP2D6 em usuárias de tamoxifeno no câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 5, 2011.
18. GOLBERT, Lenara et al. Carcinoma diferenciado de tireóide: avaliação inicial e acompanhamento. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia= Brazilian archives of endocrinology and metabolism. São Paulo. Vol. 49, n. 5 (out. 2005), p. 701-710**, 2005. Pubmed, PMID: 16444352.
19. BÚFALO, Natássia Elena et al. Análise molecular de genes envolvidos na metabolização do estrógeno na doença de graves e no carcinoma diferenciado da tireóide. [tese]. 2012.
20. RUEDA, Lidiane Camila et al. Avaliação de polimorfismos nos genes CYP1A1, CYP2D6 e CYP19 em uma amostra de pacientes com cancer de mama esporadico. [tese]. 2008.

21. GOMES, Leonor et al. CYP2D6 genetic polymorphisms are associated with susceptibility to pituitary tumors. **Acta medica portuguesa**, v. 18, n. 5, p. 339-43, 2005. Pubmed, PMID: 15511538

ANEXOS

Anexo 1: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DE ALTERAÇÕES EM PADRÕES MOLECULARES NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES PORTADORES DO CÂNCER DA TIREOIDE SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM O RADIOFÁRMACO IODETO DE SÓDIO

Pesquisador: Rafael Martins de Moraes

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 57382416.6.0000.0023

Instituição Proponente: INSTITUTO DE MEDICINA NUCLEAR E ENDOCRINOLOGIA DE BRASÍLIA LTDA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.965.528

Apresentação do Projeto:

A tireoide é a maior glândula endócrina presente no corpo humano. Possui a função de sintetizar os hormônios tireoidianos (T3 e T4), que são extremamente importantes em diversas funções corporais. O câncer de tireoide (tireoide) é responsável por apenas <1% de todos os cânceres humanos, porém, é a neoplasia endócrina mais frequente. É subdividido em quatro principais tipos: papilar; folicular; medular e anaplásico. Dentro desse contexto, as alterações genéticas têm papel decisivo no aparecimento de várias neoplasias humanas. Mutações e polimorfismos são duas alterações genéticas frequentes. Deste modo, em alguns casos o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade às patologias e há um aumento significativo de danos ao DNA em pacientes que possuem câncer de tireoide.

METODOLOGIA: consiste na coleta de sangue em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Serão recrutados 441 participantes da pesquisa no grupo Caso e 200 participantes da pesquisa no grupo Controle. O DNA genômico será extraído de leucócitos presentes no sangue utilizando o método Salting Out. Os exames de polimorfismo genético, que será realizado pelo método PCR qualitativo. Em seguida, a análise de polimorfismo se dará com o uso de enzimas de restrição, a

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3966-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.965.528

depende da região gênica a ser analisada. Serão analisados os polimorfismos dos genes P53, XRCC1, ERCC2/XPD, NOS3, TNFA, PDE, GP1BA, IFNG, PDC1D, SOD2, GST, NIS, CYP, PLA, VEGF, MNSOD, ILs e APOs, SOD3, BAX, BCL2 e TERT. A mensuração de TGF-Beta, TNF-Alfa e interleucinas será realizada pelo método ELISA, de acordo com as especificações do kit de alta sensibilidade R&D Systems Quantikine, nas amostras de sangue e saliva. A avaliação das proteínas p53, Bax, Bcl-2, TGF-, IL-10 e hTERT será realizada em todas as amostras de CECs em ambas as células neoplásicas e células do infiltrado inflamatório. Além do sangue, informações relacionadas ao prontuário do paciente do grupo caso também serão coletadas, tais como: tempo de tratamento, dose, outros exames complementares.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO: foram apresentados.

SOBRE AS FORMAS DE RECRUTAMENTO: para os participantes do grupo controle, o recrutamento se dará na sala de coleta de amostras no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ceilândia (FCE). O material biológico (sangue) dos participantes serão estocados na FCE da Universidade de Brasília (UnB), sob a guarda da pesquisadora Izabel Cristina Rodrigues da Silva e do pesquisador Rafael Martins de Moraes na extração do DNA das amostras, além das realizações dos exames para verificação dos polimorfismos genéticos.

METODOLOGIA DE ANÁLISE DE DADOS: será feita por meio das análises das frequências alélicas e genotípicas serão estimadas, usando-se o programa SPSS versão 20.0, por contagem direta, sendo essas expressas como porcentagem do número de alelos. Além disso, será aplicado o teste do qui-quadrado e o Odds Ratio (OR), de forma a comparar as distribuições das frequências e também fazer possíveis associações com os alelos, genótipos e haplótipos entre os 2 grupos avaliados (caso e controle).

Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo Primário será "Determinar a prevalência de polimorfismos genéticos e dosar a concentração de proteínas séricas em pacientes portadores do câncer da tireoide que serão submetidos ao tratamento com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (I131) e comparar com o grupo sadio no acompanhamento, tratamento, prognóstico e estadiamento da doença, em um estudo prospectivo e de caso controle".

E os Objetivos Secundários serão "Avaliar a influência entre o polimorfismo dos genes P53, XRCC1, ERCC2/XPD, NOS3, TNFA, PDE, GP1BA, IFNG, PDC1D, SOD2, GST, NIS, CYP, PLA, VEGF, MNSOD, ILs e APOs, SOD3, BAX, BCL2 e TERT, no tratamento e prognóstico em participantes com câncer de tireoide submetidos a dose terapêutica com o Radiofármaco Iodeto de Sódio (I131); Correlacionar a imunexpressão das proteínas MnSOD, Bax, Bcl-2 e hTERT nas lesões de tireoide relatadas no

Endereço: SEPN 707/07 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 70.790-075
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3966-1511 **E-mail:** cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.965.528

laudo histopatológico; Comparar as concentrações plasmáticas de TNF- e Interleucinas dos participantes da pesquisa (grupo caso) com indivíduos sadios (grupo controle); Avaliar o background genético como acompanhamento no acompanhamento, tratamento, prognóstico e estadiamento da doença; Influência da iodoterapia (após o tratamento) nos genes citados anteriormente".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos foram descritos pelo pesquisador como sendo: A recomendação da sequência dos tubos é baseada na (CLSI H3-A6, Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipunctures; Approved Standard, 6th ed) e deve ser respeitada, para que não ocorra contaminação por aditivos nos tubos subsequentes (contaminação cruzada dos aditivos), quando há necessidade da coleta para diversos analitos de um mesmo paciente. As medidas de segurança visam evitar injúrias tanto aos participantes como aos profissionais que farão o procedimento de coleta. Antes da coleta, o paciente será tranquilizado, agindo-se com honestidade, explicando passo-a-passo do procedimento, desde os equipamentos necessários até um possível desconforto no momento da coleta. Os critérios de avaliações de riscos e benefícios foram privados das Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML - 2014): coleta e preparo da amostra biológica para Coleta de sangue venoso, descritos a seguir: formação de hematoma: No momento da antes e após a coleta, existem alguns riscos e possíveis complicações, que poderão vir a acontecer. A formação de hematoma é a complicação mais comum em processos de punção venosa. É acometido devido à extravasamento do sangue para o tecido. Esse processo pode ocorrer durante ou após a punção. Quando acontece, o paciente pode sentir dor no local, e em alguns casos, a compressão de algum ramo nervoso. Punção arterial acidental: A punção acidental de uma artéria é outro risco. Porém, é um fato considerado raro, sabendo que a escolha do local e habilidade do profissional é preponderante para que isso seja evitado. A punção acidental arterial está associada principalmente à punções na veia basilica, pelo fato de estar proximamente localizada a(à) artéria braquial. Caso ocorra, é necessário realizar uma pressão na região afetada, por pelo menos 5 minutos, além de obstruir o local da punção com maior eficiência. Infecção: Embora raro, existe a possibilidade da punção venosa de gerar alguma infecção no paciente, por isso, não deve ser desprezada. Por isso, é importante que antes da punção, haja a assepsia no ponto de aplicação. O uso de algodão embebido em álcool etílico comercial, álcool iodado ou antissépticos à base de iodo, são recomendados para tal. Quando mais rápido for desde o momento da assepsia até o momento da punção na pele do paciente, menor será o risco de infecções. Um adesivo curativo deverá ser colocado após a punção, permanecendo

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 70.790-075
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3966-1511 **E-mail:** cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**

Continuação do Parecer: 1.965.528

no paciente durante no mínimo 15 minutos. Lesão nervosa: Caso não ocorra sucesso na primeira tentativa de punção, a agulha deverá ser retirada, para que assim, uma segunda tentativa seja realizada. Isso evita que ocorra lesões em ramos nervosos próximos ao local da punção. Outra medida para que isso não ocorra, é orientar ao paciente, antes e durante a coleta, a não realizar movimentos bruscos. Dor: Geralmente, a dor gerada pela punção e retirada da agulha, é de fraca intensidade e suportável. Para que isso seja minimizado, acalmar e orientar o paciente antes e durante a coleta é adequado. Porém, medidas serão adotadas, visando também a segurança do profissional da saúde. Os equipamentos de proteção individual (EPIs) devem estar de acordo visando a proteção do profissional e do paciente. A principal forma de contaminação de agentes infecciosos é pelo contato. Todos as diretrizes para medidas de proteção e saúde dos trabalhadores devem estar de acordo com a Norma Regulamentadora Brasileira no 32 ou NR-32 (Segurança e Saúde no Trabalho em Serviços de Saúde), de 11 de novembro de 2005. Boas práticas individuais que pregam os Requisitos de Segurança no Laboratório Clínico também deverão ser tomadas, seguindo a norma ABNT NBR 14785:2001. O descarte de resíduos será feito de acordo com a RDC/Anvisa n. 306/2004.

E os Benefícios foram descritos pelos pesquisadores como sendo: Por se tratar de apenas uma coleta de sangue, através de punção de veia periférica, procedimento usual na prática clínica, os riscos referentes ao trabalho são mínimos. O anonimato dos pacientes é assegurado, pois o estudo tem enfoque nos dados e não nos pacientes individualmente. Os dados genéticos resultantes somente serão acessíveis aos pesquisadores do presente estudo e não serão dissociados dos indivíduos. Os benefícios do uso de dados genéticos humanos coletados no âmbito da pesquisa serão compartilhados entre a comunidade envolvida sob a forma de publicação de artigos científico sobre o assunto. Será oferecida a possibilidade de contato eletrônico (e-mail) a todos os participantes que desejarem, para que as possíveis descobertas de informações sejam repassadas, em forma de artigos científicos (modo como serão divulgados os resultados da presente pesquisa). Os benefícios deste estudo são maior conhecimento sobre os aspectos fisiopatológicos, diagnóstico, tratamento e prognóstico da doença do câncer da tireoide. Será oferecida a possibilidade de retorno das informações obtidas, bem como a descrição dos achados referentes aos polimorfismos genéticos de cada indivíduo analisado. Os participantes ou representantes legais terão acesso aos resultados mediante a sua solicitação à pesquisadora responsável, a qualquer momento, desde que as amostras já tenham sido processadas e analisadas. Esta solicitação poderá ser feita durante a assinatura do TCLE, por e-mail ou telefone, presentes no TCLE, e a pesquisadora agendará uma reunião para a entrega do resultado. Os resultados do

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 70.790-075
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3966-1511 **E-mail:** cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.965.528

presente estudo ficarão disponíveis aos participantes e aos profissionais da empresa Imagens Médicas de Brasília (IMEB).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Universidade de Brasília Faculdade de Ceilândia é Coparticipante da pesquisa.

Haverá a análise de prontuários dos participantes da pesquisa. Foram estabelecidos os critérios de inclusão e exclusão, assim como, os riscos e os benefícios. O orçamento foi apresentado e o cronograma está dentro do período de submissão ao CEP UniCEUB. Há, também, a descrição da metodologia de análise dos dados. O projeto apresenta mérito acadêmico e científico e representa importante contribuição para o entendimento das bases moleculares e citológicas do câncer da tireóide.

O pesquisador deve observar a regulamentação específica, Resolução no 340/04 do Conselho Nacional de Saúde que aprovar as Diretrizes para Análise Ética e Tramitação dos Projetos de Pesquisa da Área Temática Especial de Genética Humana:

quantos aos aspectos éticos, há que se garantir os seguintes elementos:

III.3 - As pesquisas envolvendo testes preditivos deverão ser precedidas, antes da coleta do material, de esclarecimentos sobre o significado e o possível uso dos resultados previstos.

III.4 - Aos sujeitos de pesquisa deve ser oferecida a opção de escolher entre serem informados ou não sobre resultados de seus exames.

III.5 - Os projetos de pesquisa deverão ser acompanhados de proposta de aconselhamento genético, quando for o caso.

III.6 - Aos sujeitos de pesquisa cabe autorizar ou não o armazenamento de dados e materiais coletados no âmbito da pesquisa, após informação dos procedimentos definidos na Resolução sobre armazenamento de materiais biológicos.

IV.1 - As pesquisas da área de genética humana devem ser submetidas à apreciação do CEP e, quando for o caso, da CONEP como protocolos completos, de acordo com o capítulo VI da Resolução CNS No 196/96 (substituída pela Resolução CNS no 466/12), não sendo aceitos como emenda, adendo ou subestudo de protocolo de outra área, devendo ainda incluir:

a) justificativa da pesquisa;

b) como os genes/segmentos do DNA ou do RNA ou produtos gênicos em estudo se relacionam com eventual condição do sujeito da pesquisa;

c) explicitação clara dos exames e testes que serão realizados e indicação dos genes/segmentos do DNA ou do RNA ou de produtos gênicos que serão estudados;

d) justificativa para a escolha e tamanho da amostra, particularmente quando se tratar de

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3966-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.965.528

- população ou grupo vulnerável e de culturas diferenciadas (grupos indígenas, por exemplo);
- e) formas de recrutamento dos sujeitos da pesquisa e de controles, quando for o caso;
- f) análise criteriosa dos riscos e benefícios atuais e potenciais para o indivíduo, o grupo e gerações futuras, quando couber;
- g) informações quanto ao uso, armazenamento ou outros destinos do material biológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

* TCLE:

- Esse instrumento teve a sua formatação adequada conforme a solicitação do CEP UniCEUB: Como coparticipante, o CEP da UnB vai receber o projeto para análise, mas deve constar no TCLE os dados do CEP-UniCEUB, pois é o comitê que avalia o estudo submetido pela instituição proponente, INSTITUTO DE MEDICINA NUCLEAR E ENDOCRINOLOGIA DE BRASÍLIA LTDA.

- Foi acrescentada a informação da existência de grupo controle;

* Termo de concordância da instituição proponente - anexado a Plataforma Brasil;

* Folha de rosto com as devidas assinaturas do pesquisador principal, da instituição proponente e do patrocinador principal.

* Termo de guarda não contém as informações dos pesquisadores (nome, e-mail e telefone de contato).

* Termo de responsabilidade.

* Termo de responsabilidade e compromisso - apresentado através da Plataforma Brasil.

Recomendações:

O CEP-UniCEUB ressalta a necessidade de desenvolvimento da pesquisa, de acordo com o protocolo avaliado e aprovado, bem como, atenção às diretrizes éticas nacionais quanto aos incisos XI.1 e XI.2 da Resolução nº 466/12 CNS/MS concernentes às responsabilidades do pesquisador no desenvolvimento do projeto:

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3966-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.965.528

g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e

h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

- Resolução CNS n. 441/11, referente à análise ética de projetos de pesquisa que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores. Observação: O envio de relatórios deverá ocorrer pela Plataforma Brasil, por meio de notificação de evento. O modelo do relatório encontra-se disponível na página do UniCEUB

http://www.uniceub.br/Instituicao/pesquisa/ins030_pesquisacomitebio.aspx, em Relatório de Finalização e Acompanhamento de Pesquisa.

Para entrar em contato com o CEP-UniCEUB utilize o e-mail cep.uniceub@uniceub.br.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa está apta a iniciar a coleta de dados, ressaltando que:

1) quando da ocorrência do procedimentos de descarte do material biológico armazenado deverá ser observada a regulamentação pertinente, Resolução CNS n. 441/11, item 11.II:

- O descarte do material biológico humano armazenado em Biobanco pode ocorrer: a) pela manifesta vontade do sujeito da pesquisa; b) devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade; c) por iniciativa da instituição; e d) pela dissolução do Biobanco. III - Nas hipóteses previstas nas alíneas "c" e "d", são obrigatórias: a) a oferta formal do material armazenado a, no mínimo, duas instituições de pesquisa que possuam Biobanco e a apresentação comprovada da recusa; e b) a submissão da decisão institucional e da destinação do material biológico ao CEP, que as encaminhará para avaliação da CONEP.

2) No Termo de Guarda de Material Biológico inserir informações dos contatos dos pesquisadores (e-mail e telefone de contato), devendo uma via ficar com o participante (o representante legal), e, a outra, com o pesquisador responsável.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo previamente avaliado, com parecer n. 1.949.153, tendo sido homologado na 2ª Reunião Ordinária do CEP-UniCEUB de 2017, em 17 de fevereiro do mesmo ano.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar	
Bairro: Setor Universitário	CEP: 70.790-075
UF: DF	Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3966-1511	E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.965.528

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_745986.pdf	19/01/2017 16:44:50		Aceito
Outros	Proponente.pdf	19/01/2017 16:43:59	Rafael Martins de Moraes	Aceito
Outros	Coparticipante.pdf	19/01/2017 16:43:18	Rafael Martins de Moraes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	19/01/2017 16:42:41	Rafael Martins de Moraes	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	GUARDA.pdf	19/01/2017 16:42:16	Rafael Martins de Moraes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	RESPONSABILIDADE_TERMOS.pdf	19/01/2017 16:40:47	Rafael Martins de Moraes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	19/01/2017 16:37:13	Rafael Martins de Moraes	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	19/01/2017 16:33:48	Rafael Martins de Moraes	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	19/01/2017 16:31:51	Rafael Martins de Moraes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASÍLIA, 15 de Março de 2017

Assinado por:
Marília de Queiroz Dias Jacome
(Coordenador)

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar
Bairro: Setor Universitário **CEP:** 70.790-075
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3966-1511 **E-mail:** cep.uniceub@uniceub.br

Anexo 2: Dados clínicos dos prontuários dos pacientes

Ficha para Dose Terapêutica com Radiofármaco Iodeto de Sódio (¹³¹I)		
Nome:		
Sexo:		
Telefone para contato:		
e-mail:		
Idade:		
Sexo:	Masculino ()	Feminino ()
Indicação e CID:		
1) História Clínica		
Medicamentos em uso:		
Fumante:	Sim ()	Não ()
Pré-disposição:	Sim ()	Não ()
2) Exames Complementares		
Anti-tireoglobulina:		
Anti-tireoide peroxidase:		
B-HCG:		
Hemograma:		
Leito tireoidiano/PCI:		
Tireoglobulina:		
TSH:		
Outros:		
3) Histopatológico		
4) Ecografia		
5) Relacionado à Dose		
Dose sugerida de tratamento:		
Reposição hormonal:		
Uso do TSHrh		
Data da suspensão do hormônio:		
Início da dieta pobre em iodo:		

Anexo 3: Normas da revista científica de escolha para publicação – Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML)

Artigos de revisão

Serão aceitos apenas mediante convite.

Avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto, devem incluir conclusões e ter até 5 mil palavras. A organização do texto, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos, exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

Artigos originais

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original que possam ser replicados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir:

Referências

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, e ser numeradas sucessivamente pela ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Devem seguir as normas do Estilo Vancouver. Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

Exemplos:

- Artigos de periódicos (um só autor) Fry PH. O significado da anemia falciforme no contexto da 'política racial' do governo brasileiro 1995-2004. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005; 12: 347-70. PubMed PMID: 16353330.
- Artigos de periódicos (até seis autores) Barbosa AJA, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation with culture. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 May; 112(5): 523-5. PubMed PMID: 3282485.
- Artigos de periódicos (mais de seis autores) Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-H. pylori antibodies in Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25(7): 683-9. PubMed PMID: 1342599.
- Artigo de periódico on-line Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2006 Jan; 27(1): 34-7. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>.
- Livros no todo (dois autores) Eyre HJ, Lange DP. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2002.
- Capítulos ou parte de livro editado por outro autor Mendenhall WM. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS,

Rosenberg SA , editors. Cancer: principles and practice of oncology. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 729-80.

- Parte de livro em meio eletrônico São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: São Paulo (Estado). Entendendo o meio ambiente. São Paulo; 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>.

- Evento em meio eletrônico Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

- Tese ou dissertação Silva MAL. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme. 2008. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.

- Citações no texto Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

Tabelas e figuras

- As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

- As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos.

Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

- O SGP aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png, e com resolução de no mínimo 300 dpi.
- O direito à privacidade do paciente não deve ser infringido. Imagens que eventualmente permitam a identificação pessoal somente poderão ser utilizadas com consentimento por escrito do paciente ou responsável, quando da submissão do manuscrito.

Abreviações e nomes de medicamentos

- As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não disponíveis para prescrição.
- As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.

Contato com a secretaria do JBPML

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial Tel.: +55 (21) 3077-1400. E-mail: jbpml@sbpc.org.br