Amanda Shinzato

**Investigação molecular dos genes *PTEN* e *DREAM* em
pacientes portadores de bócio multinodular.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dra. Ericka Barbosa Trarbach

São Paulo

2015

Amanda Shinzato

**Investigação molecular dos genes *PTEN* e *DREAM* em
pacientes portadores de bócio multinodular.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dra. Ericka Barbosa Trarbach

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Shinzato, Amanda

Investigação molecular dos genes *PTEN* e *DREAM* em pacientes portadores de bócio multinodular / Amanda Shinzato. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Ericka Barbosa Trarbach.

Descritores: 1.Bócio nodular 2.Bócio/genética 3.Expressão gênica 4.Análise mutacional de DNA 5.PTEN fosfo-hidrolase 6.KCNIP3 proteína humana 7.Proteínas interatuantes com canais de Kv

USP/FM/DBD-197/15

Dedicatória

Toda minha vida e principalmente pela profissional que sou hoje devo à Deus e minha família. E ao meu Deus que é fiel, sou muito grata pela força e coragem, e pela promessa de Josué 1:9 “Lembre da minha ordem: Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o Senhor, teu Deus, serei contigo por onde quer que andares!”

E em mais uma etapa dedico essa conquista em especial para minha mãe, que se desfez de seus sonhos para viver os meus, que não mediu esforços para viver meus planos, que me deu suporte a todos os caminhos que desejei trilhar...

Muito obrigada, Mãe!

Agradecimentos

Na realização desse trabalho foi fundamental o auxílio de algumas pessoas, que aproveito para agradecer em especial minha querida orientadora Dr. Ericka B. Trarbach, pela paciência, pela atenção dispensada sempre que precisei, por permitir meus erros e estar sempre pronta a me corrigir com carinho.

As Dras. Suemi Marui e Rosalinda Camargo da Unidade de Tireoide do HCFMUSP pela colaboração.

Agradeço também aos queridos companheiros de laboratório e amigos adquiridos. Muito obrigada a Renata, Leonardo, Paulo e Isabella pela amizade, pelos momentos compartilhados e aprendizado.

Tenho muito a agradecer aos técnicos do LIM-25, Andréa, Graça, Rosana, Maria, Elisângela pela assistência e colaboração.

Um agradecimento especial a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de anexos

Resumo

Summary

1. Introdução.....	1
1.1. A glândula tireoide.....	1
1.2. Síntese dos hormônios tireoidianos T3 e T4.....	1
1.3. Regulação da função da tireoide	3
1.4. Bócio multinodular	3
1.5. Genética do BMN	5
1.6. Via de sinalização do PIP3/AKT e o gene <i>PTEN</i>	7
1.7. Via de sinalização TSH/TSHR e o papel do gene <i>DREAM</i> na tireoide.....	9
2. Objetivos	13
3. Pacientes e Métodos	14
3.1. Considerações éticas	14
3.2. Pacientes	14
3.2.1. Critérios de exclusão	15
3.2.2. Coleta de amostras	15
3.3. Análise molecular dos genes <i>PTEN</i> e <i>DREAM</i>	16
3.3.1. Extração de DNA genômico de sangue periférico	16
3.3.2. Extração de DNA e RNA de tecido tireoidiano	16
3.3.3. Amplificação gênica por PCR	17
3.3.4. Sequenciamento automático	18
3.3.4. Quantificação relativa do RNAm por PCR em tempo real .	20
3.4. Análise estatística	22
4. Resultados	23
4.1. Seleção de pacientes	23
4.2. Análise mutacional	24

4.3. Estudo de expressão gênica	24
5. Discussão.....	27
6. Conclusões.....	30
7. Anexos.....	31
8. Referências	39
9. Apêndice	

Lista de abreviaturas

Akt	Proteína quinase B
Anti-TG	Anticorpos anti-tireoglobulina
Anti-TPO	Anticorpos anti-tireoperoxidase
Anti-TRab	Anticorpos anti-receptor de TSH
BMN	Bócio multinodular
CAMP	AMP cíclico
CDNA	DNA complementar
Ct	Threshold cycle
DIT	Diiodotirosina
DNA	Ácido deoxirribonucleico
DRE	Elemento regulatório downstream
DREAM	Modulador antagonista do elemento regulatório downstream
EGF	Fator de crescimento epidérmico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HT	Hormônios tireoidianos
I ⁻	Iodeto
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
KCNIP3	Proteína de interação ao canal de potássio 3
MIT	Monoiodotirosina
RNA	RNA mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
Na ⁺	Sódio
NIS	Na/I symporter
Pb	Pares de bases
PDK	Quinases dependente de fosfoinositol
PDS	Pendrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PKA	Proteína quinase A
PTEN	Fosfatase e homólogo de tensina no cromossomo 10
RNA	Ácido ribonucleico
RQ	Quantificação relativa
RTK	Receptor de tirosina quinase
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
Tg	Tireoglobulina
TPO	Peroxidase tireoidiana
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormoniotireoestimulante
TSH-R	Receptor de TSH
TTF-1	Fator de transcrição da tireoide-1

Lista de símbolos

dl	Decilitro
g	Grama
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
°C	Graus centígrados
pmol	Picomol
rpm	Rotação por minuto
U	Unidades
UI/l	Unidades internacionais por litro
uL	Microlitro

Lista de siglas

NCBI	Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
OMS	Organização Mundial da Saúde

Lista de figuras

Figura 1. Organização estrutural da tireoide e representação esquemática do sistema de retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide	2
Figura 2. Comparação entre tireoide normal e bócio.	4
Figura 3. Esquema da via mitogênica PI3K/Akt.	8
Figura 4. Vias de sinalização do PKA mediada pelo receptor de TSH da família de receptores acoplados a proteínas G.	10
Figura 5. Esquema da ação da DREAM na regulação da transcrição gênica.....	11
Figura 6: Expressão do <i>DREAM</i> e do <i>PTEN</i> em pacientes portadores de BMN..	25
Figura 7: Frequência percentual absoluta dos níveis de expressão dos genes <i>DREAM</i> e <i>PTEN</i> observada nos pacientes com BMN.....	25

Lista de tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos criados para amplificação dos éxons do gene <i>DREAM</i> , temperatura de anelamento e tamanho do produto de amplificação.	19
Tabela 2. Oligonucleotídeos criados para amplificação dos éxons do gene <i>PTEN</i> , temperatura de anelamento e tamanho do produto de amplificação.	19
Tabela 3. Características clínicas e hormonais dos pacientes com BMN avaliados.	23
Tabela 4. Polimorfismos encontrados nos genes <i>DREAM</i> e <i>PTEN</i> em pacientes com BMN.	24
Tabela 5. Análise dos níveis de expressão gênica do <i>PTEN</i> e do <i>DREAM</i> e sua relação com as características clínicas e hormonais dos pacientes com BMN	26

Lista de anexos

Anexo 1. Características clínicas e hormonais dos pacientes com BMN	31
Anexo 2. Genótipos dos polimorfismos encontrados nos genes <i>PTEN</i> e <i>DREAM</i>	33
Anexo 3. Dados da PCR em tempo real observados na análise do gene <i>PTEN</i>	35
Anexo 4. Dados da PCR em tempo real observados na análise do gene <i>DREAM</i>	37

Resumo

Shinzato A. *Investigação molecular dos genes PTEN e DREAM em pacientes portadores de bócio multinodular* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: O bócio é um termo genérico usado para descrever o aumento no volume da glândula tireoide que pode estar associado à formação de múltiplos nódulos, o chamado bócio multinodular. Camundongos transgênicos tireoide específicos com depleção do *Pten* ou aumento de expressão do *Dream*, dois importantes genes que têm sido implicados nas vias de sinalização das células foliculares, apresentam desenvolvimento de bócio. Em humanos, uma larga porcentagem de pacientes com doença de Cowden apresentam bócio ou outras anormalidades tireoidianas associadas a mutações germinativas no *PTEN*. **OBJETIVO:** O objetivo desse estudo foi investigar a expressão dos genes *PTEN* e *DREAM* em tecido hiperplásico tireoidiano, bem como mutações germinativas e somáticas no *PTEN* e mutações somáticas no *DREAM*, em pacientes portadores de bócio multinodular, com a finalidade de avaliar o papel destes genes na etiologia do bócio. **MÉTODOS:** Foram investigados 60 pacientes com bócio multinodular (54 mulheres). A extração do DNA genômico foi realizada a partir de tecido hiperplásico da tireoide e do sangue periférico dos pacientes enquanto o RNA foi obtido apenas do tecido glandular. A quantificação relativa do RNA mensageiro do *PTEN* e do *DREAM* foi avaliada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando o *GAPDH* como normalizador em dados produzidos pela PCR em tempo real. A alta e a baixa expressão de *PTEN* e *DREAM* foram definidas, respectivamente, por valores de quantificação superiores a 2.0 e inferiores a 0.5 em comparação a um *pool* comercial de RNA de tireoide normal de humanos. Análise de mutação foi realizada por amplificação da região codificante dos genes *PTEN* e *DREAM* pela PCR convencional seguida por sequenciamento automático (RQ = quantificação relativa; $\bar{x}$ = média e DP = desvio padrão). **RESULTADOS:** Foi observada alta expressão do *PTEN* em 58,3% dos pacientes portadores de bócio ($\bar{x}$ RQ = 3,81; DP = 2,26) enquanto apenas dois casos apresentaram baixa expressão ($\bar{x}$ RQ = 0,34; DP = 0,09). Nos 38,3% casos restantes foi observada expressão normal de *PTEN* ($\bar{x}$ RQ = 1,35; DP = 0,35). Em relação ao gene *DREAM*, alta e baixa expressão foram observadas em 33,3% ($\bar{x}$ RQ = 6,07; DP = 5,02) e 15,0% ($\bar{x}$ RQ = 0,30; DP = 0,10) dos pacientes

com bócio respectivamente, enquanto pouco mais da metade dos casos (51,6%) teve expressão normal ($\bar{x}$ RQ = 1,12 ; DP = 0,40). A Análise de mutações do *PTEN* e do *DREAM* revelaram apenas polimorfismos intrônicos, previamente descritos no banco de dados do NCBI, tanto nos DNA de sangue e/ou de tecido hiperplásico. CONCLUSÕES: Nossos resultados demonstraram uma expressão aumentada de *PTEN* em bócio multinodular, sugerindo que este pode estar hiperexpresso, ou pelo menos tem sua expressão mantida, nesta hiperplasia benigna da tireoide. Alterações na sequência gênica codificante do *PTEN* não foram observadas. Na análise mutacional e de expressão do *DREAM* não foram encontradas alterações que pudessem ser relacionadas à patogênese de bócio em humanos.

Descritores: Bócio nodular; Bócio/genética; Expressão gênica; Análise mutacional de DNA; PTEN fosfo-hidrolase; KCNIP3 proteína humana; Proteínas interatuantes com canais de Kv.

Summary

Shinzato A. *Molecular investigation of PTEN and DREAM genes in patients with multinodular goiter* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2015.

BACKGROUND: Multinodular goiter is a clinicopathological entity characterized by an increased volume of the thyroid gland with formation of nodules. A high proliferative status of thyroid follicular cells and goiter were observed in mutants mice with specifically deleted *Pten* or *Dream* overexpression in thyrocytes. In humans, a large percentage of patients with Cowden disease have goiters or other thyroid abnormalities associated with germ-line *PTEN* mutations. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to investigate the tissue expression of *PTEN* and *DREAM*, as well as germ-line and somatic *PTEN* mutations and somatic *DREAM* mutations, in patients with multinodular goiter to evaluated the role of these genes in goitrogenesis. **METHODS:** We investigated 60 multinodular goiter patients (54 females). Genomic DNA was extracted from both patients' hyperplastic thyroid tissue and peripheral blood whereas RNA was obtained only from glandular tissue. Relative quantification of *PTEN* and *DREAM* messenger RNA was evaluated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method normalized to GAPDH expression on data produced by real-time PCR. *PTEN* and *DREAM* over and lower expression were respectively defined by value > 2.0 -fold and < 0.5 -fold relative to a commercial pool of normal human thyroid RNA. Mutations analyses were performed by amplification of *PTEN* and *DREAM* coding region by PCR followed by automatic sequencing. RQ = relative quantification; $\bar{x}$ = average; SD = standard deviation. **RESULTS:** We observed a high expression of *PTEN* in 58.3% of multinodular goiter patients (RQ $\bar{x}$ = 3.81; SD = 2.26) and only two cases with lower expression (RQ $\bar{x}$ = 0.34; SD = 0.09). In the remaining 38.3% of patients expression of *PTEN* was normal (RQ $\bar{x}$ = 1.35; SD = 0.35). For the *DREAM*, over and lower expression were observed in 33.3% (RQ $\bar{x}$ = 6.07; SD = 5.02) and 15.0% (RQ $\bar{x}$ = 0.30; SD = 0.10) of patients respectively, whereas 51.6% had normal expression (RQ $\bar{x}$ = 1.12; SD = 0.40). Regarding *PTEN* and *DREAM* mutations analysis, only previously described intronic polymorphisms were observed in DNA from blood and/or thyroid hyperplastic tissue. **CONCLUSIONS:** Our results demonstrated that *PTEN* expression is higher in multinodular goiter suggesting that this gene is overregulated (or at least has its

expression maintained) in this benign hyperplastic thyroid lesions. No evidence for the involvement of *DREAM* in goitrogenesis was observed in our cohort of multinodular goiter patients.

Descriptors: Goiter, nodular; Goiter/genetics; Gene expression; DNA mutational analysis; PTEN Phosphohydrolase; KCNIP3 human protein; Kv channel-interacting proteins.

Introdução

1.1. A glândula tireoide

A tireoide é uma glândula endócrina localizada na região anterior à traqueia e à laringe sendo formada por dois lobos laterais unidos na linha média por um istmo. Esta glândula é responsável pela síntese dos hormônios tireoidianos (HT), T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina), que são essenciais para a homeostase metabólica de quase todos os tecidos humanos e crucial para o desenvolvimento de fetos e crianças (1, 2).

Histologicamente, a tireoide é composta por dois tipos de células, as células foliculares (ou folículos tireoidianos) e as células parafoliculares, também conhecidas como células C (Figura 1). Os folículos são micro-unidades esféricas constituídos de uma única camada de células epiteliais organizadas ao redor de um lúmen o qual é preenchido por uma substância gelatinosa chamada colóide. A tireoglobulina (Tg) é a proteína predominante no colóide e esta atua como suporte para a síntese dos HT (3, 4). Já as células parafoliculares encontram-se dispersas pelo espaço inter-folicular e têm como função a secreção da calcitonina, hormônio que promove a deposição de cálcio nos ossos, diminuindo, conseqüentemente, o nível de cálcio no sangue (3, 4).

1.2. Síntese dos hormônios tireoidianos T3 e T4

A função da tireoide é gerar a quantidade de HT necessária para suprir a demanda dos tecidos periféricos. Os hormônios T3 e T4 são produzidos nas células foliculares a partir de uma série de reações que exigem a participação de proteínas específicas da tireoide tais como a Tg, o simporter de sódio e iodo (NIS), a pendrina (PDS) e a

peroxidase tireoidiana (TPO), cuja expressão é controlada por fatores de transcrição específicos: o TTF-1, o FOXE1, o FOXE2e o PAX-8 (4, 5).

Figura 1. Organização estrutural da tireoide e representação esquemática do sistema de retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Fonte: editado de KONDO *et al* (6).

Para a síntese dos HT é essencial à disponibilidade de iodo proveniente da dieta na forma de iodeto (I^-). O I^- é transportado ativamente pela corrente sanguínea para as células da tireoide (tireócitos) através da proteína NIS localizada na membrana das células foliculares. Uma vez captado, o I^- migra pela célula folicular em direção à membrana apical cujo efluxo para o colóide é realizado pela PDS. No colóide o I^- é oxidado pela TPO, a reação catalizada na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido pelas enzimas Duox 1 e 2. Depois de oxidado, o I^- é incorporado aos resíduos de tirosil da molécula de Tg, reação denominada organificação, com a formação de moniodotirosina (MIT) que, ainda ligado a TPO, pode sofrer uma nova oxidação e reagir com outro radical de I^- produzindo a diiodotirosina (DIT). Além dessas reações a TPO atua no acoplamento

das iodo tirosinas MIT e DIT para a formação do T3 e do T4, sendo o acoplamento de um DIT mais um MIT formando o T3 e o acoplamento de duas moléculas de DIT formando o T4 (4, 5).

1.3. Regulação da função da tireoide

A função da tireoide é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide num modelo típico de retroalimentação negativa de acordo com a disponibilidade dos HT e da ingestão de iodo (4). O crescimento, a produção e a secreção dos HT são regulados principalmente pela secreção hipofisária do hormônio estimulador da tireoide (TSH, do inglês *thyroid stimulating hormone*) que se liga a receptores específicos (TSHR) nos tireocitos levando endocitose e a clivagem da Tg, permitindo então a liberação hormonal (4, 5).

A regulação da secreção do TSH, por sua vez, é controlada pelo hormônio hipotalâmico liberador do TSH, o TRH (do inglês, *thyrotropin releasing hormone*) enquanto os HT inibem a síntese e a secreção de ambos, do TSH e do TRH (Figura 1) (4, 5).

1.4. O bócio multinodular

As doenças da tireoide são comuns e decorrentes de alterações da função ou da estrutura morfológica da glândula (2). O bócio multinodular (BMN) é definido como um aumento da glândula tireoide secundário ao aumento da célula folicular e do índice de proliferação, resultando em células foliculares heterogêneas em crescimento e função distribuídas em dois ou mais nódulos (Figura 2) (7). Nos casos em que ocorre crescimento acentuado da tireoide pode haver comprometimento de estruturas do trato aerodigestivo, causando dispneia e disfagia (8).

O termo BMN é utilizado ainda para descrever o bócio adenomatoso (bócio sem envoltório capsular), bócio nodular atóxico (bócio com uni ou multinódulos não associado ao aumento da secreção de HT) e o bócio colóide nodular (bócio apresentando um ou vários nódulos com presença de colóide abundante) (2, 4, 8-10).

Figura 2. Comparação entre tireoide normal e bócio. Fonte: addison.es/bocio.html, acessado em 13 de agosto de 2014.

O BMN é considerado uma hiperplasia benigna comum que ocorre, clinicamente, em cerca de 4-7% dos indivíduos em regiões com dieta suficiente de iodo, sendo observado um aumento significativo da prevalência de bócio em áreas com deficiência deste mineral (11, 12).

Na ausência de disfunção tireoidiana, como doença autoimune da tireoide, tireoidite e carcinoma da tireoide, o BMN é descrito como não tóxico que pode ocorrer endemicamente ou esporadicamente. A ocorrência endêmica do BMN é principalmente relacionada à deficiência de iodo e é definida quando a prevalência de bócio entre crianças

de 6-12 anos de idade é superior a 5% e, esporadicamente, quando ocorre em 5% ou menos desta população (13).

No entanto, a deficiência de iodo como o principal fator responsável pelo aparecimento do bócio pode ser uma simplificação excessiva, pois nem todos os habitantes de uma região deficiente, ou severamente deficiente, de iodo desenvolvem bócio assim como a suplementação de iodo não previne seu aparecimento (4). Assim, outros fatores como o tabagismo, a obesidade, a idade e o sexo (o bócio é mais frequente em mulheres na proporção de 5:1) entre outros, podem ter relação com a bociogênese e o mais provável é que ocorra interação entre fatores genéticos, endógenos e ambientais na determinação de sua patogênese (4, 14).

1.5. Genética do BMN

A importância dos fatores genéticos no surgimento do BMN é evidenciada pelos numerosos casos relatados de bócio familiar, usualmente com padrão de herança autossômico dominante, e pela alta taxa de concordância do bócio entre os gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos (15, 17-20).

Um estudo de caso controle realizado por SINGER *et al.* (15) com 376 indivíduos sem uma região não deficiente em iodo, demonstrou uma alta proporção de pais ($P < 0,001$) e irmãos afetados ($P = 0,004$) entre os pacientes eutireoideos com bócio em comparação aos pacientes controles sem bócio, bem como um risco aumentado em 2,7 vezes de desenvolvimento de bócio nas crianças filhas de pais afetados. Neste mesmo estudo foram avaliadas a contribuição do tabagismo, obesidade e gravidez e estas não foram estatisticamente importantes ($P = 0,06$, $0,13$ e $0,56$, respectivamente) (15).

Estudos de ligação foram realizados na identificação de genes, ou marcadores, de predisposição genética ao bócio. O primeiro deles foi realizado por BIGNELL *et al.* (16) em uma família canadense com 18 casos de BMN não tóxico (16). Um *locus* no cromossomo 14q, denominado *MNG1* (bócio multinodular 1), foi identificado nesta região sendo este mesmo resultado obtido no estudo de família de origem alemã (16, 17). Um segundo *locus*, o *MNG2*, foi identificado em uma família italiana com bócio atóxico familiar e padrão de herança autossômica dominante ligada ao X (18). Adicionalmente, foram obtidas evidências a partir de novos estudos de ligação em família com bócio para *loci* candidatos nos cromossomos 3p, 2q, 7q e 8p (19).

O papel das mutações em genes candidatos específicos também tem sido estudado no desenvolvimento do bócio. Anormalidades nos genes envolvidos na hormogênese da tireoide, tais como *Tg*, *TPO*, *pendrina*, *TSHR* e *NIS* foram relacionadas ao surgimento de várias formas de bócio, geralmente com alteração na função glandular (20).

Recentemente, estudos de ligação e de sequenciamento do exoma identificaram mutações em quatro novos genes em bócio familiar atóxico, *RGS12* (regulador da sinalização de proteína G 12), *GRPEL1* (GrpE-tipo 1), *CLIC6* (proteína de canal intracelular de cloreto 6) e *WFS1* (Wolframina), cuja expressão na tireoide oferece suporte ao seu papel na função desta glândula (21). Contudo, as alterações genéticas que predispõe ao surgimento do BMN atóxico permanecem ainda desconhecidas na maioria dos pacientes (4).

Estudos *in vitro* e envolvendo modelos animais demonstraram que distúrbios nas vias de sinalização das células foliculares da tireoide geram sinais proliferativos para os tireócitos e estão muitas vezes envolvidos no desenvolvimento de patologia tireoidianas como o bócio e o câncer (22-24). Esses mecanismos estimulatórios ainda não estão

completamente esclarecidos sendo, a seguir, discutido o papel de duas importantes vias mitogênicas da célula folicular da tireoide as vias PI3K/MAPK e do TSH/TSHR e o envolvimento dos genes *PTEN* e *DREAM* nestes processos.

1.6. Via de sinalização do PIP3/AKT e o gene *PTEN*

A fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) é o mediador central da via de transdução de sinal iniciada pelos receptores tirosina quinase, catalizando a conversão de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Estes, por sua vez, recrutam a AKT (proteína quinase B) para a membrana plasmática pela ligação ao domínio PH (homologia com a plesostrina) específico. Proteínas serina/treonina quinases conhecidas como PDKs (fosfoinositol dependente de quinases) reconhecem e fosforilam a AKT ainda na membrana (Figura 3). Uma vez ativada, a AKT pode ter uma série de efeitos a jusante, como por exemplo ativação do mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos). A via PI3K/AKT/mTOR atua na regulação da proliferação celular, apoptose e migração celular (Figura3).

O *PTEN* (fosfatase e homólogo de tensina no cromossomo 10) foi identificado como um gene supressor tumoral que codifica uma proteína catalizadora específica da desfosforilação do PIP3 em PIP2, resultando na inibição da sinalização da via AKT. A perda da função catalítica do PTEN, por mutação ou silenciamento epigenético, leva ao aumento nos níveis de PIP3 e a ativação constitutiva da via AKT. Essas alterações têm sido encontradas com frequência em diversos tipos de câncer, tais como de fígado, glioblastoma, câncer de mama, câncer renal, câncer de próstata, melanoma maligno, câncer endometrial e de tireoide (22-28).

Figura 3. Esquema da via mitogênica PI3K/AKT/mTOR, com ativação inicial dos receptores de tirosina quinase (RTK) e PTEN antagonizando a fosforilação de PIP3.

Quatro síndromes raras têm sido associadas a mutações germinativas inativadoras no gene *PTEN*, coletivamente chamadas de síndromes de hamartomas múltiplos, que incluem a síndrome de Bannayan-Zonana, síndrome de Lhermitte-Duclos, síndrome de Proteus e a síndrome de Cowden (29). A síndrome de Cowden (SC) é a mais frequente delas e tem prevalência estimada em 1/200.000 nascidos afetando ambos os sexos, apesar de ser observada uma ligeira predominância no sexo feminino (30). Essa síndrome é transmitida de forma autossômica dominante, sendo descritas mutações que afetam o domínio fosfatase da proteína PTEN em 81% dos casos familiares (31-33).

Além da presença de hamartomas, a SC é caracterizada pelo aparecimento de alterações benignas da tireoide, tais como BMN e adenomas, com risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de mama, tireoide e endometriais (34-36). Mutações inativadoras de *PTEN* têm sido também descritas em aproximadamente 15% dos

carcinomas anaplásico, 10% dos carcinomas foliculares e raramente em carcinomas papilíferos da tireoide (31).

A hipótese de que alterações gênicas no *PTEN* pudessem estar envolvidas no surgimento do bócio, pode ser considerada pela descrição de síndromes distintas, mas com sobreposição de fenótipos, apresentando mutações similares (ou mesmo idênticas) em um mesmo gene (37, 38). Em adição, YEAGER *et al.* (26) encontraram evidências interessantes sobre o envolvimento do PTEN na bociogênese. Esses autores geraram um camundongo “*knockout*” em que o gene *Pten* é seletivamente deletado nas células foliculares da tireoide, levando a ativação constitutiva da PI3K/Akt. A ativação desta via foi suficiente para induzir hiperplasia da tireoide e formação de bócio colóide em camundongos jovens e também, em animais mais velhos, o desenvolvimento de adenomas mas sem evidências de transformação maligna. Dessa forma, a via PI3K/Akt foi considerada um sinal proliferativo *major* das células foliculares da tireoide (39).

No entanto, até o momento, não existem relatos de estudos do gene *PTEN* em bócio em humanos.

1.7. Via de sinalização TSH/TSHR e o gene *DREAM*

A ligação do TSH ao seu receptor na superfície das células foliculares da tireoide ativa a cascata mitogênica da PKA (proteína quinase A)/AMP cíclico- dependente, o que leva a indução da progressão do ciclo celular e a expressão de marcadores de diferenciação (Figura 4) (40). Contudo, os resultados obtidos em diferentes sistemas de cultura celulares são contraditórios e o verdadeiro papel do TSH no processo mitogênico ainda é obscuro (41).

Um número crescente de evidências indica que outros fatores de crescimento peptídicos, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), cooperam com o TSH em sua atividade mitogênica (42). Além disso, tem sido demonstrado que TSHR mantém uma atividade relativamente alta mesmo em ausência do TSH, sugerindo a existência de mediadores endógenos capazes de ativar espontaneamente a atividade desse receptor, cujos mecanismos moleculares e relevância fisiológica ainda são bastante desconhecidos (43).

Figura 4. Vias de sinalização da PKA mediada pelo receptor de TSH. O TSHR pertence a família de receptores acoplados a proteínas G que após ativado induz a produção de AMP cíclico (cAMP) pela adenilciclase e estimula a proteína quinase (PKA). A ativação dessa via atua no controle do ciclo celular, da diferenciação celular e da apoptose.

O gene *DREAM* (modulador antagonista do elemento regulatório *downstream*), atualmente conhecido como *KCNIP3* (proteína de interação ao canal de potássio 3), é um repressor de transcrição dependente de cálcio que interage com proteínas do núcleo e do citoplasma, sendo altamente expresso no sistema nervoso central, na tireoide, nos testículos e nas células do sistema imune (44, 45). Quando as moléculas de Ca^{2+} não estão

associadas ao DREAM, essas proteínas formam tetrâmeros que se ligam o elemento DRE (elemento regulatório *downstream*), presente na região promotora do gene alvo inibindo sua transcrição (Figura 5) (45, 46). O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} causa a dissociação do tetrâmero e a presença de dímeros de DREAM no sítio DRE leva a ativação gênica (Figura 5) (47).

Figura 5. Esquema da ação da DREAM na regulação da transcrição gênica. DREAM em tetrâmero, sem interação com Ca^{2+} , se liga ao DRE (elemento regulatório *downstream*) reprimindo a transcrição do gene alvo. Quando a DREAM interage com Ca^{2+} ocorre clivagem da molécula tetramérica, promovendo liberação de dímeros de DREAM e ativação da transcrição do gênica.

Estudando camundongos transgênicos com hiperexpressão do *DREAM* na tireoide, RIVAS *et al.* (48) demonstraram que esta proteína funciona como um efetor intracelular do TSHR pela interação direta proteína-proteína, promovendo o acoplamento deste receptor com a G_{as} e levando a ativação da via de sinalização do AMP cíclico com consequente indução da transcrição dos genes *NIS* e *TPO* (48). A hiperexpressão do *DREAM* foi relacionada ainda a um aumento na proliferação das células da tireoide e do volume glandular nesses camundongos (48). Alterações significantes nos níveis de T3, T4 ou TSH, ao contrário do descrito em outros modelos animais com ativação constitutiva

da via do AMP cíclico, não foram observadas nos transgênicos com hiperexpressão do *DREAM*.

Como a *DREAM* controla a atividade do fator de transcrição de tireoide 1 (TTF-1) reprimindo a expressão do gene da Tg, esse mecanismo foi sugerido como o responsável pela manutenção do estado eutireoideo em presença da hiperexpressão do *DREAM* (29, 40). Outros trabalhos demonstraram ainda que o *DREAM* pode exercer um papel importante na regulação da expressão do gene da calcitonina na tireoide, também mediado pela via do AMP cíclico(47).

O estudo da expressão protéica da *DREAM* por *western blot* em tireoide humana, mostrou a hiperexpressão dessa proteína em 10 de 16 amostras de bócio multinodular em relação a glândula normal. Nessas amostras, observou-se ainda que a expressão da *DREAM* estava correlacionada positivamente com a expressão do TSHR, enquanto a expressão da Tg era diminuída. Assim, hiperexpressão do *DREAM* foi sugerido como um novo mecanismo etiológico na patogênese do bócio em humanos (48).

Dessa forma, diversos estudos têm demonstrado a presença de novos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento nodular e no aumento da glândula tireoide. O estudo dos genes *PTEN* e *DREAM* em pacientes com bócio multinodular, como proposto no presente trabalho, pode fornecer dados adicionais sobre sua importância na etiologia genética do bócio.

2. Objetivos

Com a finalidade de se obter evidências que auxiliem na compreensão do papel dos genes *PTEN* e *DREAM* no mecanismo etiológico da formação do bócio em humanos, foram avaliadas:

- a ocorrência de mutações germinativas e somáticas no gene *PTEN* em pacientes com BMN; e
- a expressão gênica do *PTEN* na tireoide hiperplásica desses pacientes.
- a ocorrência de mutações somáticas no gene *DREAM* em pacientes com BMN; e
- a expressão gênica do *DREAM* na tireoide hiperplásica desses pacientes;
- a relação entre a expressão gênica do *PTEN* e do *DREAM* com as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com BMN.

3. Pacientes e Métodos

3.1. Considerações éticas

Esse estudo foi realizado de acordo com as normas da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) Nº Protocolo: 0799/11. Os participantes foram esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos desse estudo e solicitados que estes assinassem um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Apêndice).

3.2. Pacientes

A coorte desse estudo foi constituída de 60 pacientes portadores de BMN não tóxico provenientes do Ambulatório de Endocrinologia e do Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes apresentaram bócio com indicação clínica-cirúrgica para remoção parcial ou total da tireoide de acordo com o médico-assistente responsável.

Todos os pacientes foram submetidos às dosagens de rotina de TSH, T3 e T4 livre utilizando kits comerciais (imunofluorimétrico) e anticorpos anti-TPO, anti-TG e TRAb (imunofluorimétrico indireto e radioimunoensaio direto ou Imunoensaio eletroquimioluminescente) realizadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42 do HCFMUSP.

A ultrassonografia de tireoide foi realizada para avaliação de parênquima tireoidiano, presença e características de nódulo(s), volume glandular estimado. Em caso de bócio com suspeita de compressão de traquéia ou mergulhante, a radiografia simples de tórax foi realizada. A tomografia computadorizada foi realizada apenas na presença de sintomas compressivos, para caracterização do lúmen traqueal.

Foram selecionados os pacientes que apresentaram função tireoidiana normal e dois ou mais nódulos ao ultrassom. Os pacientes foram classificados como portadores de: a) bócio adenomatoso (BA) - bócio sem envoltório capsular, b) bócio nodular atóxico (BNA) - bócio com uni ou multinódulos não associado ao aumento da secreção de HT e c) bócio colóide nodular (BCN) - bócio apresentando um ou vários nódulos com presença de colóide abundante, tal como descrito no laudo anatomopatológico.

3.2.1 - Critérios de exclusão

Foram excluídos desse estudo pacientes com exposição a fatores secundários que pudessem estar relacionados com a bociogênese: gestantes, pacientes com hipertireoidismo subclínico (TSH $<0,1$ $\mu\text{m/L}$ e hormônios tireoidianos normais) ou clínico (TSH $<0,1$ mU/L e hormônios tireoidianos elevados), pacientes com presença de anticorpos anti-tireoidianos (anticorpo anti-tiroperoxidase, anti-TPO e anti-receptor de TSH, TRab) e com câncer de tireoide. Ainda, pacientes em uso de drogas que pudessem interferir na ação tireoidiana, como amiodarona, lítio, interferon e, especialmente, levotiroxina, também foram excluídos.

3.2.2- Coleta de amostras

Amostras de tecido nodular de cada paciente foram obtidas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido durante o procedimento cirúrgico para extração dos ácidos nucleicos DNA e RNA e cerca de 10 mL de sangue periférico foi coletada em tubo contendo EDTA para extração de DNA genômico.

3.3. Análise molecular dos genes *PTEN* e *DREAM*

3.3.1. Extração de DNA genômico de sangue periférico

A extração de DNA genômico a partir de amostra de sangue periférico foi realizada pelo método *salting out*. O sangue foi incubado em solução de lise de glóbulos vermelhos (114 mM cloreto de amônia; 1 mM carbonato de amônia) durante 30 minutos à 4°C. Após este período, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm/15 minutos/4°C. O sobrenadante foi descartado e o botão de células dissolvido em solução tampão (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8) contendo 1% de SDS e 0,2 mg/mL de proteinase K e incubado a 37°C durante a noite. No dia seguinte, foram acrescentados 1,2 mL de NaCl e a amostra foi centrifugada a 3000 rpm/15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo tipo de 15 mL utilizando pipeta Pasteur e foram adicionados duas vezes o volume de etanol absoluto gelado. O tubo foi invertido até completa precipitação do DNA, o qual “flocula” no etanol. O DNA foi removido com anzol de vidro e lavado com etanol 70% (4 vezes) e por último com etanol absoluto. O pellet de DNA foi seco a temperatura ambiente e transferido para um tubo tipo *ependorf* onde foi homogeneizado em cerca de 1 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0.1 mM EDTA pH 8,0). O DNA extraído foi conservado a -4°C até a sua utilização.

3.3.2. Extração de DNA e RNA de tecido tireoidiano

O DNA e o RNA de tecido hiperplásico foram obtidos utilizando coluna de afinidade aos ácidos nucleicos com o *All Prep DNA/RNA kit®* (*Qiagen*) seguindo o protocolo do fabricante.

As amostras de obtidas foram analisadas pela leitura em espectrofotômetro *NanoDrop®* (*Thermo Scientific*) para avaliação da qualidade da amostra, sendo consideradas satisfatórias aquelas que apresentaram concentração suficiente para as análises e razão 260/280 entre 1,8-1,9 e 1,8-2,0 para o DNA e o RNA, respectivamente. A integridade do RNA obtido foi avaliada ainda pela presença das bandas 18S e 28S ribossomais após denaturação das amostras (15 min/56°C) e eletroforese em gel de agarose 1%.

3.3.3 -Amplificação gênica por PCR

A análise mutacional do gene *PTEN* (ENST00000371953) foi realizada nas amostras de DNA obtidas dos tecidos sanguíneo e glandular, enquanto as mutações no *DREAM* (ENST00000295225) foram investigadas apenas no tecido somático, utilizando PCR seguido por sequenciamento automático. Para ambos os genes foram avaliados apenas os éxons codificantes e suas respectivas regiões de junção exon-intron, utilizando oligonucleotídeos específicos desenhados com o auxílio do programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Os oligonucleotídeos foram verificados quanto sua especificidade e estabilidade utilizando o BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/) e o programa Gene Runner (<http://www.generunner.net/>), respectivamente. Quando necessário, esses oligonucleotídeos foram editados manualmente para remoção de sequências que favorecessem a formação de estruturas secundárias (principalmente, estruturas em forma de grampo de cabelo e dímeros).

Nas tabelas 1 e 2 estão descritas as sequências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos éxons dos genes *PTEN* e *DREAM*, respectivamente, bem como as temperaturas de anelamento e o tamanho do produto amplificado por cada par.

As reações de PCR foram preparadas num volume final de 25 µl contendo 50 ng de DNA genômico, 200 µmol/L de dNTPs, 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 5,0 µl de tampão de PCR 5_x e 0,5 U de *Taq polimerase* levadas ao termociclador. As condições de ciclagem foram 96°C por 5 minutos seguida de 30 ciclos: 94° por 30 segundos, temperatura de anelamento (específica para cada par de oligonucleotídeos) por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, e 10 minutos a 72°C de extensão final. Posteriormente, 5µl do produto da PCR foram corados com 0,5 uL de *Blue Green Loading Dye I Safe* (LGC) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, juntamente com o marcador de peso molecular para verificação do tamanho do fragmento gerado sob luz ultravioleta.

3.3.4 - Sequenciamento automático

As reações de sequenciamento automático foram realizadas a partir de 2,5 uL de cada produto de PCR purificados com 1 uL da mistura de enzimas Exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase - Exo-SAP* (Affymetrix). Essa mistura foi incubada por 37°C/15 min e 85°C/15min e mantida no gelo. Para a reação de sequenciamento foi adicionado 5 pmol de oligonucleotídeo (sense ou anti-sense), 0,75 uL de *Big Dye*.

Tabela 1. Oligonucleotídeos criados para amplificação dos éxons codificantes do gene *PTEN* (ENST00000371953), temperatura de anelamento e tamanho do produto de amplificação.

Éxon	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Temperatura de anelamento (°C)	Amplificado (pb)
1	ATCAGCTACCGCCAAGTCC (S) CAACCAGGCAAGAGTTCCG (AS)	56	389
2	ACCGTGAGTTTCTGTTTTCTC (S) CTGTATCCCCCTGAAGTCCA (AS)	59	497
3	CATAGAAGGGGTATTTGTTGG (S) CAATGCTCTTGGAAGTCTTGA (AS)	56	365
4	AAGATTCAAGGCATGTTTGT (S) TCACTCGATAATCTGGATGAC (AS)	54	234
5	CCTGAATAAAATGGGGGAA (S) CCCACCTCAATAAACTGAAG (AS)	54	582
6	GCTACGACCCAGTTACCAT (S) ATTTGTTCAAATGCTTCAGAA (AS)	56	377
7	TCCATATTTCTGTATATTGC (S) CAAAACACCTGCAGATCTAA(AS)	56	398
8	TCATGTGAATGAAAATGCAAC (S) CGTAAACACTGCTTCGAAATA (AS)	56	573
9	CCTAGCAAGAAAGAAAATGTTGA (S) CACAAATGTCCATTGCCATTA (AS)	56	483

S: sense; AS: antisense; pb: pares de bases.

Tabela 2. Oligonucleotídeos criados para amplificação dos éxons codificantes do gene *DREAM* (ENST00000295225), temperatura de anelamento e tamanho do produto de amplificação.

Éxon	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Temperatura de anelamento (°C)	Amplificado (pb)
1	AGGGGTGGAGCGATAGAAG (S) CAAAGGAAAGTGGAACAAGAG (AS)	56	329
2	GTTCAAGCTGGCCTCATCTA (S) CAATAGAGACAGGGGCGATG (AS)	56	397
3	GTTCTCCACCTGCTATTTTG (S) TAAAGGCCCTGGGATATT (AS)	57	328
4-5	CAAGGGGGTGGAGAGAGG (S) CCCAGGGTGAAGTCAACAAGAT (AS)	58	590
6	ATGGATGCCGTCAGTCTCTT (S) CAGTCTCTGGATGGACAGC (AS)	55	369
7	CTTCTCTCTCCAGCTCGTC (S) GAGTAGGGAGGCTCAGAGG (AS)	58	352
8	CCAGAGTAGTCACAGGGGCA (S) AGACAAGAGGGCAAGTGGAG (AS)	58	402
9	CTCCCTGCACCAATAAGAC (S) CTGGCAGGATGGAGGTTTCT (AS)	56	246

S: sense; AS: antisense; pb: pares de bases.

Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystem), contendo dideoxynucleotídeos terminadores marcados com compostos fluorescentes, e água desionizada estéril para um volume final de 10 uL. A reação foi levada a um termociclador por 96°C/2min, seguindo-se 35 ciclos: 96°C/15s, 55°C/5s e 60°C/4min.

Ao término do tempo de reação, o produto foi precipitado adicionando-se 25 uL de isopropanol 100%, 1 uL de acetato de sódio a 3M e 1 uL de EDTA a 125 mM e incubado por 15 min à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 4200 rpm a 4°C por 45 min e o sobrenadante descartado. Ao tubo foram adicionados 35 uL de etanol 70%, centrifugado as mesmas condições anteriores por 15 min e o etanol foi completamente descartado invertendo-se o tubo sobre papel toalha. Essa etapa de lavagem foi repetida por mais uma vez e o tubo foi deixado secar sobre a bancada ao abrigo da luz.

A reação foi então ressuspensa em 3 uL de formamida e submetida a eletroforese capilar no sequenciador automático no *3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de seus respectivos exons presentes na base de dados do Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) com o auxílio do software comercial *Sequencher*TM (*Gene Codes*).

3.3.5 - Quantificação relativa do RNAm por PCR em tempo real

As amostras de RNA foram utilizadas na confecção de cDNA empregando-se o kit *Quanti Tect Reverse Transcription Kit* (*Qiagen*), seguindo o protocolo do fornecedor. O cDNA obtido foi utilizado na PCR em tempo real utilizando kit *Quanti Tect*® *SYBR*® *Green PCR Kit* (*Qiagen*) e oligonucleotídeos pré-desenhados para os genes de interesse

DREAM (Hs_KCNIP3_1_SG *Quanti Tect primer assay*, NM_001034914, NM_013434, Cat. No. 00060564) e *PTEN* (Hs_PTEN_1_SG *Quanti Tect primer assay*, NM_000314, Cat. No. QT00086933), seguindo o protocolo do fabricante.

O gene referência escolhido para essas análises foi o *GAPDH* (Hs_GAPDH_1_SG *Quanti Tect primer assay*, NM_001256799, NM_002046, Cat. No. QT00079247), e a amostra calibradora utilizada foi um pool de RNA comercial de tecido tireoidiano normal *Human Thyroid Poly A+ RNA* (Clontech). As reações de PCR foram corridas em placas 0,1 mL de 96 poços no equipamento *Step One Plus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

Durante a reação de PCR, foi determinado o "*cycle threshold*" (C_T) que é definido como o número de ciclo necessários para o início de amplificação da sequência-alvo presente em cada amostra. A quantificação relativa de cada gene foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ após o C_T do gene-alvo ser corrigido pelo o C_T do gene referência (ΔC_T) e da amostra calibradora ($\Delta\Delta C_T$) utilizando o *StepOne™ Software v2.3* (Applied Biosystems) (49). Os valores de quantificação relativa foram expressos em RQ (*relative quantification*), onde o RQ atribuído para a amostra calibradora é sempre 1 e os valores das demais amostras são relativos a este. A hiperexpressão de um gene foi definida por um valor RQ maior que 2 e a hipoexpressão RQ menor que 0.5. Todas as reações foram realizadas em duplicata e repetidas quando necessário (indicativa de erro na reação ou alto desvio padrão entre as duplicatas).

3.4. Análise estatística

As variáveis nominais foram apresentadas como números absolutos e avaliados em tabelas de contingência, pelo teste do qui-quadrado (χ^2) utilizando o programa *SOFA-Statistics Open For All* (<http://www.sofastatistics.com/home.php>). As variáveis contínuas foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão ou mediana (percentis 25-75%) conforme a presença de distribuição paramétrica ou não, respectivamente.. As médias ou medianas entre os grupos foram comparadas empregando-se análise da variância simples (ANOVA *one-way*) utilizando o programa Sigma Stat v2.0 (SPSS Inc, *Chicago, EUA*).

4. Resultados

4.1. Seleção de pacientes

A coorte selecionada para esse estudo consistiu de 60 pacientes (54 mulheres e 6 homens). As características clínicas e hormonais destes pacientes de acordo com a classificação do bócio são apresentadas na tabela 3. Os dados individuais dos pacientes conforme os critérios de inclusão neste estudo são apresentados no anexo 1.

Tabela 3. Características clínicas e hormonais dos pacientes com BMN avaliados.

	BA	BNA	BCN	Total	P
Sexo (F:M)	20:1	5:2	29:3	54:6	0,189
Idade (anos)	53,2 ($\pm$ 12,1)	54,1 ($\pm$ 22,2)	54,8 ($\pm$ 13,9)	54,2 ($\pm$ 14,2)	0,935
TSH (μ U/mL)	1,34 (0,65-2,21)	1,36 (0,86-1,91)	1,06 (0,89-1,37)	1,12 (0,89-1,83)	0,418
T3 (ng/dL)	128,5 (110,0-152,0)	133,0 (105,0-165,0)	113,0 (103,2-147,2)	120,0 (106,0-152,0)	0,443
T4 Livre (ng/dL)	1,04 ($\pm$ 0,20)	1,08 ($\pm$ 0,14)	1,12 ($\pm$ 0,23)	1,09 ($\pm$ 0,21)	0,370
Tamanho do bócio (g)	40,9 (14,1-107,8)	58,0 (41,1-73,1)	57,2 (25,5-130,8)	44,9 (22,6-107,8)	0,613

Variáveis nominais foram apresentadas como números absolutos, variáveis contínuas foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão ou mediana (percentis 25-75%) conforme a presença de distribuição paramétrica ou não, respectivamente.

F - Feminino; M - Masculino; BA – Bócio adenomatoso; BNA – Bócio nodular atóxico; BCN – Bócio coloide nodular.

Valores de referência: T3 (ng/dL): 12 a 20 anos : 72 a 214, 20 a 50 anos : 70 a 200, > 50 anos : 40 a 180; T4L (ng/dL): 0,70 a 1,50; TSH basal (μ U/mL): 16 a 20 anos: 0,5 a 4,4, >20 anos: 0,4 a 4,5. Obs: todos os pacientes tiveram valores de antiTPO e antiTG menores que <35 μ U/mL e TRAb menor que 1,75 UI/L ou <8%.

4.2. Análise mutacional

Não foram encontradas alterações novas na região codificante dos genes *DREAM* e *PTEN*, apenas polimorfismos intrônicos previamente descritos nos bancos de dados de SNPs do NCBI (Tabela 4). Os genótipos de cada indivíduo dos polimorfismos encontrados estão descritos no anexo 2.

Tabela 4. Polimorfismos encontrados nos genes *DREAM* e *PTEN* em pacientes com BMN.

Gene	ID (dbSNP)	Localização	Alteração nucleotídica	MAF (pacientes)	MAF** (1 th genomes)
<i>DREAM</i>	rs2248415	Intrônica	c.15+41C>G	C=0.23	C=0.28
	rs117109173	Intrônica	c.228+10C>G	G=0.08	G=0.07
<i>PTEN</i>	rs1903858	Intrônica	c.80-96A>G	G=0.45	G=0.42
	rs555895	Intrônica	c.1026+32T>G	G=0.46	G=0.43

MAF (*minor allele frequency*).

**valores de MAF descritos no banco de dados do 1000 genomes (<http://www.1000genomes.org/>).

4.3. Estudo da expressão gênica

Os níveis de RNAm do *PTEN* foram considerados hiperexpressos ($\bar{x}$ RQ = 3,81; intervalo de expressão de 2,1 a 13,4) em 35 dos 60 casos de BMN (58,3%). Expressão reduzida do *PTEN* ($\bar{x}$ RQ = 0,34) foi observada em apenas dois pacientes (3,3%). Nos demais 23 pacientes (38,4%) a expressão deste gene foi considerada normal ($\bar{x}$ RQ = 1,34; intervalo de 0,7 a 1,9 vezes) (Figuras 6 e 7).

Em relação ao gene *DREAM*, um aumento de expressão ($\bar{x}$ RQ = 6,07, intervalo de expressão de 2,1 e 23,8) foi detectado em 20 dos 60 nódulos avaliados (33,4%). Nove pacientes (15%) apresentaram expressão reduzida ($\bar{x}$ RQ = 0,30, intervalo de expressão

de 0,15 a 0,43) do *DREAM*. Nas demais 31 amostras (51,6%) a expressão deste gene foi classificada como normal ($\bar{x}$ RQ = 1,12, intervalo de expressão de 0,54-1,91) (Figuras 6 e 7).

Figura 6: Expressão do *DREAM* e do *PTEN* em pacientes portadores de BMN. O gráfico representa a distribuição dos valores individuais de RQ obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para os genes *DREAM* (quadrados) e *PTEN* (círculos) nas 60 amostras de bócio avaliadas. A hiperexpressão do *PTEN* ($RQ > 2$) foi observada em 58,3% dos casos enquanto a expressão do *DREAM* foi considerada normal ($2,0 \geq RQ \geq 0,5$) em 51,6%.

Figura 7: Frequência absoluta, em dados percentuais, dos níveis de expressão dos genes *DREAM* e *PTEN* observados nos 60 pacientes avaliados com BMN.

Os diferentes níveis de expressão dos genes *PTEN* e *DREAM* foram relacionados com as características clínicas e laboratoriais dos pacientes e também com o tipo de BMN observado (Tabela 5). Não foram observadas diferenças com significância estatística entre os grupos.

Tabela 5. Análise dos níveis de expressão do *PTEN* e do *DREAM* e sua relação com as características clínicas e hormonais dos pacientes com BMN.

	Nível de expressão do RNAm			
	Baixo	Normal	Alto	P
<i>PTEN</i>				
Sexo (F:M)	2:0	19:2	33:4	0,880
Idade (anos)	47,5 (± 21,9)	56,6 (± 13,6)	53,2 (± 14,5)	0,545
TSH (μU/mL)	1,82 (1,08-2,56)	1,20 (0,96-2,11)	1,07 (0,77-1,56)	0,400
T3 (ng/dL)	190,0 (190,0-190,0)	122,0 (110,0-761,2)	119,0 (105,0-148,5)	0,277
T4 livre (ng/dL)	1,15 (± 0,14)	1,11 (± 0,22)	1,07 (± 0,21)	0,711
Tamanho do bócio (g)	17,9 (9,4-26,4)	41,2 (17,2-128,7)	56,4 (25,6-107,9)	0,254
BA: BNA: BCN	1:0:1	8:2:11	12:5:20	0,952
<i>DREAM</i>				
Sexo (F:M)	8:1	27:3	19:2	0,992
Idade (anos)	60,0 (54,5-67,2)	57,0 (42,25-65,0)	49,5 (44,5-57,5)	0,095
TSH (μU/mL)	1,34 (0,98-2,43)	1,00 (0,72-1,69)	1,33 (1,04-2,23)	0,241
T3 (ng/dL)	107,1 (101,0-112,0)	127,0 (105,0-178,0)	123,0 (111,5-144,2)	0,262
T4 livre (ng/dL)	0,97 (± 0,13)	1,12 (± 0,21)	1,09 (± 0,24)	0,171
Tamanho do bócio (g)	58,0 (11,5-98,1)	68,5 (37,4-145,3)	27,15 (16,7-68,6)	0,055
BA: BNA: BCN	4:1:4	8:4:19	9:2:9	0,662

Variáveis nominais foram apresentadas como números absolutos, variáveis contínuas foram apresentadas como média ± desvio padrão ou mediana (percentis 25-75%) conforme a presença de distribuição paramétrica ou não, respectivamente.

F= Feminino; M= Masculino; BA – Bócio adenomatoso; BNA – Bócio nodular atóxico; BCN – Bócio colóide nodular.

Valores de referência: T3 (ng/dL): 12 a 20 anos: 72 a 214, 20 a 50 anos: 70 a 200, > 50 anos : 40 a 180; T4L (ng/dL): 0,70 a 1,50; TSH basal (μU/mL): 16 a 20 anos: 0,5 a 4,4, >20 anos: 0,4 a 4,5.

5. Discussão

A etiologia genética da forma atóxica do bócio multinodular (BMN) em humanos ainda é bastante desconhecida, postulando-se que seu surgimento seja devido a fatores intrínsecos a própria célula tireoidiana como observado em modelos animais (39, 48). Neste estudo, foi avaliada a presença de variantes gênicas no *PTEN* e no *DREAM*, bem como sua expressão a nível de RNAm, na tireoide hiperplásica de 60 pacientes com BMN a fim de se estudar a participação desses genes na bociogênese.

O *PTEN* é o maior regulador negativo da via proliferativa da PI3K cuja ativação nas células foliculares da tireoide, muitas vezes relacionadas a perda de expressão do *PTEN*, esta associada ao processo carcinogênico em humanos (23, 24). Em camundongos, a deleção seletiva deste gene nos tireócitos foi também relacionada ao desenvolvimento do BMN sem aumento na incidência de tumores da tireoide nesses animais (39). Em nosso estudo, nenhuma alteração genética com potencial patogênico no *PTEN*, germinativa ou somática, foi identificada em pacientes com BMN, apenas polimorfismos previamente descritos e com frequência semelhante a descrita nos bancos de dados públicos.

Em relação à sua expressão um aumento nos níveis de RNAm do *PTEN* foi observado em aproximadamente 62% dos pacientes com BMN. Cerca de 35% dos casos apresentaram expressão normal e em apenas 3,3% dos pacientes foi observada perda de expressão do *PTEN*. Assim, nossos achados, não corroboram com a hipótese de que a mutações inativadoras ou perda de expressão do *PTEN* pudessem estar relacionadas ao surgimento do bócio em humanos.

Contudo, a observação do aumento de expressão do *PTEN* em BMN é consistente com os estudos de expressão desse gene em outras hiperplasias. TANTBIROJN *et al.* (50) e SARMADI *et al.* (51) realizaram dois estudos distintos onde investigaram a expressão

proteica do PTEN em adenocarcinomas e hiperplasias endometriais típicas e atípicas. Interessantemente, esses autores foram capazes de demonstrar uma diferença de expressão do PTEN significativa entre endométrio proliferativo, hiperplásico e canceroso, sendo a perda de expressão mais comum neste último e em hiperplasias atípicas. Ainda, a maioria dos casos pertencentes ao grupo de hiperplasia típicas apresentava moderada ou alta expressão do PTEN (50).

A avaliação da expressão gênica de *PTEN* em tecidos endometriais foi também realizada no trabalho de LEE *et al.* (56) no qual a baixa expressão foi frequentemente observada em tecidos cancerosos e com hiperplasia atípica e em apenas 24% dos tecidos com hiperplasia simples (52). Outros trabalhos confirmaram que a perda da expressão do PTEN é característica apenas de cânceres endometriais e hiperplasias atípicas de importância clínica (53) e que a manutenção de sua expressão é capaz de predizer um prognóstico benigno dessas lesões (54).

O BMN está entre as lesões nodulares da tireoide que apresenta menor potencial de malignização (55). De forma semelhante, é possível que a perda de expressão do PTEN possa ser característica apenas das lesões malignas da tireoide e o estudo de sua expressão nesses cânceres e outras doenças benignas desta glândula é de suma importância para o esclarecimento dessa questão.

Do nosso conhecimento, um único estudo avaliou a expressão do PTEN em lesões benignas e cânceres da tireoide e esta avaliação foi feita por imunohistoquímica para detecção da proteína (56). Consistente com nossos resultados, Di LORETO *et al.* (56) observaram que a expressão da proteína PTEN apresentava um significativo decréscimo na marcação celular em carcinomas foliculares e não-diferenciados, enquanto a expressão

foi positiva e com média similar nos tecidos de hiperplasia nodular, adenomas e carcinomas papilíferos bem-diferenciados (63).

Uma hipótese alternativa é que o aumento da expressão do PTEN possa ser o mecanismo responsável pelo desenvolvimento do bócio. FERNANDEZ *et al.* (57) estudaram o papel de uma mutação do *PTEN* frequentemente encontrada em gliomas. Tal mutação está localizada numa região completamente independente da função fosfatase do PTEN e leva ao ganho de função da proteína, causando a ativação de um fator de transcrição superexpresso nesses tumores (57). De maneira interessante, um dos efeitos dessa mutação inclui o estímulo da síntese de IGF-1, existindo evidências de que esse fator, em conjunto com o TSH, pode ser causa de crescimento da tireoide (58). Ganho de função em camundongos *knockin* também foi observado em uma importante mutação (*Pten*^{G129E/+}) no *PTEN* envolvida com a síndrome de Cowden(59).

Em relação ao gene *DREAM*, nosso estudo não evidenciou alterações em sua sequência gênica no tecido hiperplásico de pacientes portadores de BMN e o estudo da expressão do RNAm do *DREAM* mostrou que apenas 35,0% dos casos apresentavam hiperexpressão. Dessa forma, nossos achados também não corroboram com a hipótese levantada no estudo de RIVAS *et al.* (48), no qual foi sugerido, pelo estudo em modelos animais e de expressão da proteína DREAM em pacientes com bócio, que a alta expressão da DREAM pudesse estar relacionada a bociogênese (48).

6. Conclusões

1. Não foram identificadas variantes genéticas germinativas ou somáticas com potencial patogênico na região codificante do gene *PTEN* nos pacientes com BMN avaliados.
2. A hiperexpressão ou a expressão normal do *PTEN* foram observadas na grande maioria desses casos, sugerindo que o aumento ou a manutenção da função deste gene possa ter um papel protetor na progressão dessas lesões para a malignidade.
3. Não foram identificadas variantes genéticas somáticas com potencial patogênico na região codificante do gene *DREAM* nos pacientes com BMN avaliados e
4. O aumento da expressão do *DREAM* não foi observado em uma parcela significativa desses casos, sugerindo que este gene não esteja envolvido no mecanismo patogênico do BMN em nossa coorte de pacientes.

7. Anexos

Anexo 1. Características clínicas e hormonais dos 60 pacientes com BMN avaliados.

Amostra	Sexo	Idade (anos)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/dL)	T4 livre (ng/dL)	antiTPO (U/mL)	antiTG (U/mL)	TRAb	Diagnóstico	Tamanho do bócio (g)
1	F	65	4,06	153	0,89	< 35	<35	n.d.	BA	40,95
2	F	28	1,54	117	1,68	<2,0	<4,0	0,43 *	BCN	20,8
3	M	25	1,36	246	1,06	< 35	<35	0,50 *	BNA	22,75
4	M	75	0,68	122	1,20	< 35	<35	<0,300 *	BCN	153,2
5	F	46	0,67	n.d.	1,50	< 35	<35	0,71 *	BCN	36,7
6	F	50	0,89	107	1,30	< 35	<35	0,70 *	BCN	75,1
7	F	24	1,27	n.d.	1,29	< 35	<35	< 8 **	BCN	41,2
8	F	50	0,90	95	1,20	< 35	<35	<0,300 *	BCN	18,2
9	F	53	1,38	160	0,85	< 35	<35	n.d.	BCN	58
10	F	66	0,71	98	1,42	< 35	<35	0,45 *	BCN	68,5
11	F	85	0,79	165	0,95	< 35	<35	n.d.	BNA	45,8
12	F	76	1,08	n.d.	1,03	3	5	n.d.	BCN	8,2
13	F	66	1,17	n.d.	0,88	< 35	<35	n.d.	BCN	42,5
14	F	65	0,95	n.d.	1,14	< 35	<35	<8 **	BCN	484,4
15	F	62	2,04	138	0,93	< 35	<35	n.d.	BA	41,8
16	M	81	1,79	105	1,09	< 35	<20,0	<8 **	BNA	39,5
17	M	85	0,47	n.d.	0,98	< 35	<35	<8 **	BCN	56,4
18	F	37	0,57	152	0,95	< 35	<35	<8 **	BA	103,7
19	F	64	1,07	n.d.	1,21	<2,0	<4,0	<0,300 *	BCN	6,7
20	F	47	1,02	81	1,25	< 35	<35	<8 **	BCN	28,3
21	F	52	1,20	98	1,35	n.d.	n.d.	n.d.	BCN	8,2
22	F	46	1,32	106	1,48	< 35	<35	n.d.	BA	22,1
23	F	60	2,10	140	1,10	< 35	<35	<8 **	BCN	89,3
24	F	62	0,89	112	0,95	< 35	<35	<8 **	BCN	135,1
25	F	55	0,99	164	1,09	< 35	<35	1,55 *	BCN	126,6
26	F	34	0,72	137	1,38	< 35	<35	n.d.	BNA	73,8
27	F	42	0,91	112	1,07	< 35	<35	n.d.	BCN	163,7
28	F	59	0,54	186	0,63	< 35	<20	n.d.	BA	148,7
29	F	41	2,47	181	1,11	< 35	<35	<8 **	BCN	151,6
30	F	61	0,74	143	0,84	< 35	<35	0,49 *	BCN	74,8
31	F	49	2,47	51	0,86	< 35	<35	n.d.	BCN	6,2
32	F	49	1,07	129	1,04	< 35	<35	n.d.	BNA	209
33	F	38	1,40	119	0,91	< 35	<35	n.d.	BA	14,2
34	F	44	0,66	178	0,82	< 35	<35	<8 **	BA	53,2
35	F	60	0,43	104	1,25	< 35	<35	n.d.	BA	12,6
36	F	54	1,74	n.d.	1,19	n.d.	n.d.	n.d.	BA	9,9
37	F	62	1,18	113	0,71	< 35	<35	<0,300 *	BCN	347,6
38	F	55	1,95	99	1,07	<2,0	<4,0	0,36 *	BNA	58
39	F	69	1,06	164	1,39	<2,0	<4,0	0,79 *	BCN	28,6
40	F	27	0,51	106	0,85	<2,0	<4,0	0,45 *	BCN	178,4
41	F	47	1,34	103	1,07	6	<4,0	0,31 *	BA	120,1
42	F	70	2,80	123	1,20	<2,0	<4,0	0,74 *	BA	324,3

Anexo 1. continuação.

Amostra	Sexo	Idade (anos)	TSH (μU/mL)	T3 (ng/dL)	T4 livre (ng/dL)	antiTPO (U/mL)	antiTG (U/mL)	TRAb	Diagnóstico	Tamanho do bócio (g)
43	F	63	0,65	n.d.	1,24	<35	<35	0,34 *	BA	30
44	F	32	1,08	190	1,26	<2,0	<4,0	<0,300 *	BA	9,4
45	F	31	1,00	113	1,05	<2,0	<35	n.d.	BA	268
46	F	52	0,62	120	0,90	<2,0	<4,0	<0,300 *	BA	26
47	F	68	3,90	101	0,84	< 35	<35	<0,300 *	BA	85,8
48	F	42	1,50	119	1,59	< 35	<35	0,44 *	BCN	15
49	F	65	1,96	148	1,30	< 35	<35	n.d.	BA	44,1
50	F	46	0,97	n.d.	1,04	n.d.	n.d.	n.d.	BCN	31,2
51	F	57	1,08	n.d.	1,24	< 35	<2,0	0,41 *	BCN	69,2
52	F	50	3,18	n.d.	0,97	n.d.	<4,0	<0,300 *	BNA	71,1
53	M	51	1,02	n.d.	0,91	<2,0	<4,0	n.d.	BCN	175,5
54	F	54	1,36	105	0,95	<2,0	<4,0	n.d.	BCN	66,1
55	F	58	4,43	n.d.	0,96	<2,0	<4,0	n.d.	BA	8,1
56	F	65	3,73	407	0,98	< 35	<35	1,22 *	BCN	24,7
57	F	45	2,74	150	1,00	< 35	<35	8 **	BA	363,7
58	F	67	1,34	110	0,88	<2,0	<4,0	0,52 *	BA	13,9
59	F	63	2,56	n.d.	1,05	< 35	<35	n.d.	BCN	26,4
60	M	56	1,99	134	1,09	< 35	<20	n.d.	BA	18,4

n.d., informação não disponível.

* UI/L, unidade de medida.

** %, unidade de medida.

BA – Bócio Adenomatoso, BNA – Bócio Nodular Atóxico; BCN – Bócio Colóide Nodular.

Valores de referência:

TSH: BASAL: Até 7 dias: 15,0 μU/mL
8 dias a 11 meses: 0,8 a 6,3 μU/mL
1 a 5 anos: 0,7 a 6,0 μU/mL
6 a 10 anos: 0,6 a 5,4 μU/mL
11 a 15 anos: 0,5 a 4,9 μU/mL
16 a 20 anos: 0,5 a 4,4 μU/mL
>20 anos: 0,4 a 4,5 μU/mL

T3: Até 5 anos: 105 a 269 ng/dL
5 a 12 anos: 94 a 241 ng/dL
12 a 20 anos: 72 a 214 ng/dL
20 a 50 anos: 70 a 200 ng/dL
> 50 anos: 40 a 180 ng/dL

T4L: 0,70 a 1,50 ng/dL
PICO PÓS-TRH: Incremento mínimo de 5 μU/mL sobre o valor basal.

AntiTPO: <35 U/mL

AntiTG: <35 U/mL

TRAb: até 1,75 UI/L ou <8%

Anexo 2. Genótipos dos polimorfismos intrônicos encontrados nos genes *PTEN* e *DREAM* de cada paciente estudado.

Amostra	<i>PTEN</i>		<i>DREAM</i>	
	rs1903858	rs555895	rs2248415	rs117109173
1	A/G	T/G	G	C
2	A	T	G	C
3	G	G	G	C
4	A/G	T/G	G	C
5	A/G	T/G	C/G	C
6	A/G	T/G	C/G	C
7	A/G	T/G	G	C
8	A/G	T/G	G	C
9	A	T	G	C
10	A	T	G	C
11	A	T	G	C
12	A/G	T/G	C/G	C
13	A	T	G	C
14	A/G	T/G	C/G	C/G
15	A/G	T/G	C/G	C
16	G	G	C	C/G
17	A	T	G	C
18	A/G	T/G	C	C/G
19	A/G	T/G	C/G	C
20	A	T	C/G	C
21	A	T	G	C
22	G	G	G	C
23	A/G	T/G	G	C
24	G	G	C/G	C/G
25	G	T/G	C/G	C/G
26	A/G	T/G	C/G	C
27	A	T	G	C
28	A	T	C/G	C/G
29	G	G	G	C
30	G	G	C/G	C
31	A/G	T/G	G	C
32	G	G	G	C
33	G	G	G	C
34	G	G	G	C
35	A	T	G	C
36	A/G	T/G	G	C
37	A	T	G	C
38	A/G	T/G	C/G	C
39	A/G	G	C/G	C/G
40	A/G	T/G	C/G	C
41	A	T	G	C
42	A/G	T/G	C/G	C
43	A/G	T/G	C/G	C

Anexo 2. continuação.

	<i>PTEN</i>		<i>DREAM</i>	
	rs1903858	rs555895	rs2248415	rs117109173
44	A	T/G	C/G	C
45	A	T	G	C/G
46	A	T	G	C
47	A	T	C	C
48	G	G	G	C
49	A/G	T/G	G	C
50	G	G	G	C
51	A/G	T/G	G	C
52	A/G	T/G	C/G	C
53	A	T	G	C
54	A/G	T/G	G	C
55	A	T	C/G	C
56	A/G	T/G	G	C
57	G	G	G	C
58	G	G	C/G	C/G
59	A	T	C/G	C/G
60	A/G	T/G	G	C

Obs: para o gene *PTEN* foi o mesmo genótipo observado em tecido sanguíneo e somático.

Anexo 3. Dados da PCR em tempo real observados na análise do gene *PTEN*.

Amostra	Ct médio	ΔCt Médio	ΔCt SE	$\Delta \Delta Ct$	RQ
1	27,3	11	0,1	-0,31	1,24
2	27,55	10,43	0,11	-0,88	1,84
3	32,05	12,07	0,08	-1,70	3,25
4	29,33	10,86	0,16	-0,45	1,37
5	31,71	11,40	0,10	-2,38	5,18
6	28,39	9,32	0,07	-1,99	3,97
7	28,56	10,58	0,22	-0,72	1,65
8	29,4	9,43	0,34	-1,88	3,68
9	26,81	7,26	0,21	-2,09	4,25
10	27,71	6,66	0,28	-2,68	6,42
11	25,87	7,92	0,09	-1,42	2,68
12	28,08	9,28	0,15	-0,06	1,05
13	27,71	7,58	0,31	-1,77	3,4
14	27,21	7,93	0,16	-1,42	2,67
15	30,82	11,84	0,04	-1,93	3,81
16	28,74	7,12	0,12	-3,74	13,37
17	29,95	11,58	0,11	-2,20	4,58
18	22,15	3,87	0,21	-1,46	2,76
19	29,72	11,32	0,25	-2,45	5,46
20	24,73	3,71	0,15	-1,63	3,09
21	31,58	13,60	0,14	-0,17	1,12
22	31,12	12,72	0,09	-1,05	2,07
23	23,62	4,21	0,19	-1,13	2,18
24	33,04	14,13	0,14	0,36	0,78
25	22,92	4,57	0,24	-0,77	1,7
26	22,98	4,14	0,01	-1,2	2,29
27	29,82	11,59	0,13	-0,99	1,99
28	31,25	11,01	0,10	-1,58	2,98
29	33,27	13,55	0,05	-0,51	1,42
30	31,26	12,56	0,04	-1,5	2,82
31	32,82	12,75	0,2	-1,3	2,47
32	31,34	12,15	0,10	-1,62	3,07
33	31,89	10,89	0,10	-1,69	3,22
34	24,12	7,53	0,2	-0,58	1,49
35	25,14	8,67	0,5	0,56	0,68
36	31,80	11,22	0,22	-1,36	2,57
37	26,13	7,79	0,29	-0,32	1,24
38	24,9	7,55	0,33	-0,55	1,47
39	26,23	8,19	0,01	0,08	0,94
40	30,49	10,76	0,10	-1,83	3,54
41	32,57	11,29	0,31	-1,29	2,45
42	31,67	12,72	0,12	0,14	0,91
43	27,5	7,39	0,15	-0,71	1,64
44	27,94	10,01	0,03	1,91	0,27
45	28,09	6,06	0,16	-2,74	6,69

Anexo 3. continuação.

Amostra	C _T médio	ΔC_T Médio	ΔC_T SE	$\Delta\Delta C_T$	RQ
46	25,46	7,13	0,16	-1,67	3,18
47	30,54	12,49	0,33	-0,09	1,06
48	30,96	12,20	0,05	-1,57	2,97
49	31,39	12,61	0,08	-1,16	2,23
50	31,32	12,37	0,10	-1,40	2,63
51	25,81	8,19	0,06	-0,61	1,52
52	31,26	13,03	0,13	-0,75	1,67
53	31,14	12,63	0,07	-1,14	2,2
54	33,65	13,60	0,08	-2,28	4,85
55	31,74	15,32	0,01	-0,56	1,47
56	32,07	12,72	0,11	-3,15	8,9
57	31,89	13,62	0,04	-2,25	4,76
58	32,41	15,30	0,28	-0,57	1,48
59	34,07	17,17	0,09	1,29	0,4
60	33,96	15,67	0,01	-0,20	1,14

C_T, ciclo do limiar (*threshold cycle*); SE, erro padrão (*standard error*); RQ, quantificação relativa (*relative quantification*).

Anexo 4. Dados da PCR em tempo real observados na análise do gene *DREAM*.

Amostra	Ct médio	ΔCt Médio	ΔCt SE	$\Delta\Delta Ct$	RQ
1	27,29	10,98	0,14	-1,66	3,17
2	30,13	13,00	0,14	0,36	0,78
3	30,28	10,31	0,03	-3,52	11,44
4	31,11	12,64	0,23	0	1,00
5	35,00	14,69	0,08	0,87	0,54
6	31,47	12,40	0,11	-0,25	1,18
7	30,26	12,29	0,18	-0,36	1,28
8	33,29	13,33	0,35	0,68	0,62
9	31,18	11,63	0,23	1,44	0,37
10	31,21	10,16	0,28	-0,03	1,02
11	28,17	10,22	0,07	0,03	0,98
12	30,23	11,43	0,21	1,23	0,43
13	30,02	9,88	0,29	-0,31	1,24
14	29,81	10,53	0,28	0,34	0,79
15	32,85	13,87	0,04	0,05	0,96
16	33,63	12,00	0,09	0,88	0,54
17	32,03	13,66	0,10	-0,16	1,11
18	29,76	11,48	0,04	-0,49	1,40
19	29,59	11,20	0,21	-2,62	6,16
20	31,50	10,48	0,08	-1,48	2,80
21	30,16	12,18	0,09	-1,64	3,11
22	29,42	11,03	0,03	-2,79	6,92
23	31,02	11,62	0,08	-0,35	1,28
24	34,70	15,80	0,04	1,97	0,25
25	30,48	12,13	0,05	0,16	0,89
26	30,06	11,22	0,10	-0,75	1,68
27	30,46	12,94	0,21	-1,04	2,05
28	30,52	11,20	0,13	-2,77	6,84
29	33,13	13,4	0,11	-0,57	1,49
30	30,68	12,91	0,16	-0,79	1,72
31	30,31	11,74	0,08	-1,95	3,87
32	32,24	13,06	0,01	-0,76	1,69
33	34,62	13,70	0,17	-0,28	1,21
34	23,88	7,29	0,13	-3,47	11,1
35	29,97	13,5	0,16	2,74	0,15
36	30,97	10,64	0,14	-0,12	1,08
37	28,16	9,82	0,19	-0,94	1,91
38	29,42	12,07	0,25	1,31	0,40
39	27,25	9,21	0,05	-1,55	2,93
40	30,42	10,48	0,13	-0,28	1,21
41	27,55	7,75	0,01	-3,01	8,03
42	27,9	9,95	0,14	-0,81	1,76
43	31,74	11,63	0,14	0,87	0,55
44	26,88	8,95	0,08	-1,81	3,51

Anexo 4. continuação.

Amostra	C _T médio	Δ C _T Médio	Δ C _T SE	$\Delta\Delta$ C _T	RQ
45	32,56	10,53	0,10	-0,63	1,55
46	24,91	6,59	0,13	-4,58	23,85
47	32,80	13,79	0,10	2,63	0,16
48	30,74	11,97	0,08	-1,85	3,59
49	32,14	13,36	0,11	-0,46	1,37
50	32,80	13,86	0,01	0,04	0,97
51	32,80	13,86	0,20	0,04	0,97
52	29,88	11,65	0,11	-2,18	4,51
53	34,28	15,77	0,07	1,95	0,25
54	32,79	12,74	0,16	-1,33	2,51
55	31,99	15,56	0,20	1,49	0,35
56	30,43	11,08	0,06	-2,99	7,95
57	30,69	12,42	0,01	-1,65	3,13
58	32,88	15,78	0,10	1,71	0,30
59	31,53	14,62	0,06	0,55	0,68
60	30,37	12,09	0,01	-1,98	3,95

C_T, ciclo do limiar (*threshold cycle*); SE, erro padrão (*standard error*); RQ, quantificação relativa (*relative quantification*).

8. Referências

1. de Escobar GM, Obregón MJ, del Rey FE. Iodine deficiency and brain development in the first half of pregnancy. *Public Health Nutr.* 2007;10(12A):1554-70.
2. Saad MJA, Maciel RMB, Mendonça BB. Tireoide. In: Atheneu, editor. *Endocrinologia*. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 1251.
3. Junqueira LC, Carneiro J. Glândulas Endócrinas. In: Koogan G, editor. *Histologia básica*. 11º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 524.
4. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. Fisiologia da tireoide e avaliação diagnóstica de pacientes com doenças tireoidianas. In: Elsevier, editor. *Williams Tratado de endocrinologia*. 11º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. p. 1532.
5. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. A glândula tireoide. In: Elsevier, editor. *Fisiologia*. 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p. 1082.
6. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):292-306.
7. Derwahl M, Studer H. Pathogenesis and treatment of multinodular goiter. In: US S, editor. *Thyroid cancer*. Boston 1998. p. 155-86.
8. Cotran RS, Robbins SL. O sistema endócrino. In: Koogan G, editor. *Patologia estrutural e funcional*. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 1251.
9. Medeiros-Neto G. Multinodular goiter. 2011. In: *Thyroid disease manager* [Internet].
10. Huysmans HA, Werner D. Pathogenesis of nontoxic diffuse and nodular goiter. In: Braverman L, Utiger, RD, editor. *The thyroid a fundamental and clinical text*. 8º ed. Philadelphia 2000. p. 861-5.
11. Wang C, Crapo LM. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1997;26(1):189-218.
12. Pinchera A, Aghini-Lombardi F, Antonangeli L, Vitti P. [Multinodular goiter. Epidemiology and prevention]. *Ann Ital Chir*. 1996;67(3):317-25.
13. Tonacchera M, Pinchera A, Vitti P. Assessment of nodular goitre. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(1):51-61.
14. Paschke R. Nodulogenesis and goitrogenesis. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2011;72(2):117-9.
15. Singer J, Eszlinger M, Wicht J, Paschke R. Evidence for a more pronounced effect of genetic predisposition than environmental factors on goitrogenesis by a case control study in an area with low normal iodine supply. *Horm Metab Res*. 2011;43(5):349-54.
16. Bignell GR, Canzian F, Shayeghi M, Stark M, Shugart YY, Biggs P, et al. Familial nontoxic multinodular thyroid goiter locus maps to chromosome 14q but does not account for familial nonmedullary thyroid cancer. *Am J Hum Genet*. 1997;61(5):1123-30.
17. Neumann S, Willgerodt H, Ackermann F, Reske A, Jung M, Reis A, et al. Linkage of familial euthyroid goiter to the multinodular goiter-1 locus and exclusion of the candidate genes thyroglobulin, thyroperoxidase, and Na⁺/I⁻ symporter. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3750-6.
18. Capon F, Tacconelli A, Giardina E, Sciacchitano S, Bruno R, Tassi V, et al. Mapping a dominant form of multinodular goiter to chromosome Xp22. *Am J Hum Genet*. 2000;67(4):1004-7.
19. Bayer Y, Neumann S, Meyer B, Rüschendorf F, Reske A, Brix T, et al. Genome-wide linkage analysis reveals evidence for four new susceptibility loci for familial euthyroid goiter. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):4044-52.

20. Brix TH, Hegedüs L. Genetic and environmental factors in the aetiology of simple goitre. *Ann Med*. 2000;32(3):153-6.
21. Yan J, Takahashi T, Ohura T, Adachi H, Takahashi I, Ogawa E, et al. Combined linkage analysis and exome sequencing identifies novel genes for familial goiter. *J Hum Genet*. 2013;58(6):366-77.
22. Motti ML, Califano D, Troncone G, De Marco C, Migliaccio I, Palmieri E, et al. Complex regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in thyroid cancer cells by the PI3K/AKT pathway: regulation of p27kip1 expression and localization. *Am J Pathol*. 2005;166(3):737-49.
23. Eng C. Role of PTEN, a lipid phosphatase upstream effector of protein kinase B, in epithelial thyroid carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;968:213-21.
24. Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer*. 2010;1(12):1170-7.
25. Dahia PL, Marsh DJ, Zheng Z, Zedenius J, Komminoth P, Frisk T, et al. Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. *Cancer Res*. 1997;57(21):4710-3.
26. Dahia PL, FitzGerald MG, Zhang X, Marsh DJ, Zheng Z, Pietsch T, et al. A highly conserved processed PTEN pseudogene is located on chromosome band 9p21. *Oncogene*. 1998;16(18):2403-6.
27. Gimm O, Attié-Bitach T, Lees JA, Vekemans M, Eng C. Expression of the PTEN tumour suppressor protein during human development. *Hum Mol Genet*. 2000;9(11):1633-9.
28. Halachmi N, Halachmi S, Evron E, Cairns P, Okami K, Saji M, et al. Somatic mutations of the PTEN tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998;23(3):239-43.
29. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*. 2000;100(4):387-90.
30. Porto AC, Roider E, Ruzicka T. Cowden Syndrome: report of a case and brief review of literature. *An Bras Dermatol*. 2013;88(6 Suppl 1):52-5.
31. Paes JE, Ringel MD. Dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(2):375-87, viii-ix.
32. Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, et al. Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet*. 1997;6(8):1383-7.
33. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet*. 1997;16(1):64-7.
34. Bussaglia E, Pujol RM, Gil MJ, Martí RM, Tuneu A, Febrer MI, et al. PTEN mutations in eight Spanish families and one Brazilian family with Cowden syndrome. *J Invest Dermatol*. 2002;118(4):639-44.
35. Riegert-Johnson DL, Gleeson FC, Roberts M, Tholen K, Youngborg L, Bullock M, et al. Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. *Hered Cancer Clin Pract*. 2010;8(1):6.
36. Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res*. 2012;18(2):400-7.
37. Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, et al. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008;83(4):511-9.

38. Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, et al. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4512-7.
39. Yeager N, Klein-Szanto A, Kimura S, Di Cristofano A. Pten loss in the mouse thyroid causes goiter and follicular adenomas: insights into thyroid function and Cowden disease pathogenesis. *Cancer Res*. 2007;67(3):959-66.
40. Dremier S, Coulonval K, Perpete S, Vandeput F, Fortemaison N, Van Keymeulen A, et al. The role of cyclic AMP and its effect on protein kinase A in the mitogenic action of thyrotropin on the thyroid cell. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;968:106-21.
41. Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev*. 2001;22(5):631-56.
42. Bidey SP, Hill DJ, Eggo MC. Growth factors and goitrogenesis. *J Endocrinol*. 1999;160(3):321-32.
43. Kakinuma A, Chazenbalk G, Filetti S, McLachlan SM, Rapoport B. Both the 5' and 3' noncoding regions of the thyrotropin receptor messenger ribonucleic acid influence the level of receptor protein expression in transfected mamalian cells. *Endocrinology*. 1996;137(7):2664-9.
44. Savignac M, Mellström B, Bébin AG, Oliveros JC, Delpy L, Pinaud E, et al. Increased B cell proliferation and reduced Ig production in DREAM transgenic mice. *J Immunol*. 2010;185(12):7527-36.
45. Carrión AM, Link WA, Ledo F, Mellström B, Naranjo JR. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature*. 1999;398(6722):80-4.
46. Buxbaum JD, Choi EK, Luo Y, Lilliehook C, Crowley AC, Merriam DE, et al. Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat Med*. 1998;4(10):1177-81.
47. Matsuda M, Yamamoto TA, Hirata M. Ca²⁺-dependent regulation of calcitonin gene expression by the transcriptional repressor DREAM. *Endocrinology*. 2006;147(10):4608-17.
48. Rivas M, Mellström B, Torres B, Cali G, Ferrara AM, Terracciano D, et al. The DREAM protein is associated with thyroid enlargement and nodular development. *Mol Endocrinol*. 2009;23(6):862-70.
49. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
50. Tantbirojn P, Triratanachai S, Trivijitsilp P, Niruthisard S. Detection of PTEN immunoreactivity in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *J Med Assoc Thai*. 2008;91(8):1161-5.
51. Sarmadi S, Izadi-Mood N, Sotoudeh K, Tavangar SM. Altered PTEN expression; a diagnostic marker for differentiating normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Diagn Pathol*. 2009;4:41.
52. Lee H, Choi HJ, Kang CS, Lee HJ, Lee WS, Park CS. Expression of miRNAs and PTEN in endometrial specimens ranging from histologically normal to hyperplasia and endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2012;25(11):1508-15.
53. Hecht JL, Pinkus JL, Pinkus GS. Enhanced detection of atypical hyperplasia in endometrial polyps by PTEN expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12(1):36-9.

54. Quddus MR, Ologun BA, Sung CJ, Steinhoff MM, Lawrence WD. Utility of PTEN expression of endometrial "surface epithelial changes" and underlying atypical endometrial hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2009;28(5):471-6.
55. Brito JP, Yarur AJ, Prokop LJ, McIver B, Murad MH, Montori VM. Prevalence of thyroid cancer in multinodular goiter versus single nodule: a systematic review and meta-analysis. *Thyroid*. 2013;23(4):449-55.
56. Di Loreto C, Tell G, Pestrin M, Pandolfi M, Damante G, Puglisi F. PTEN and Egr-1 expression in thyroid proliferative lesions. *Cancer Lett*. 2005;224(1):105-9.
57. Fernández S, Genis L, Torres-Alemán I. A phosphatase-independent gain-of-function mutation in PTEN triggers aberrant cell growth in astrocytes through an autocrine IGF-1 loop. *Oncogene*. 2014;33(32):4114-22.
58. Medeiros-Neto G. Bócio multinodular. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* [Internet]. 1998; 42:[286-91 pp.].
59. Wang H, Karikomi M, Naidu S, Rajmohan R, Caserta E, Chen HZ, et al. Allele-specific tumor spectrum in pten knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):5142-7.

9. Apêndice

Termo de consentimento livre e esclarecido.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE:

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Investigação Molecular dos Genes *PTEN* e *DREAM* em Pacientes Portadores de Bócio Multinodular

1. PESQUISADOR :Ericka Barbosa Trarbach

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador Científico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL CRBio
Nº 4326/01D

UNIDADE: Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM-25/FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

O objetivo deste estudo é pesquisar as alterações na estrutura dos genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) envolvidos no crescimento anormal da glândula tireoide.

Para que seja feita a avaliação gênica, será necessária a coleta do nódulo da tireoide obtido durante o tratamento cirúrgico (retirada do nódulo) e de amostra de sangue. Não serão realizados procedimentos de rotina para o projeto, já que este é baseado no estudo dos genes do material extraído em cirurgia e de sangue coletado durante os exames. O material será mantido em nitrogênio líquido e todo ele (tanto o material cirúrgico quanto o sangue coletado) será utilizado na extração de ácidos nucleicos. Esse procedimento não levará a nenhum risco ou desconforto para o paciente, já que a coleta de um fragmento pequeno do nódulo será realizada durante a cirurgia, não havendo necessidade de submeter o paciente a nenhum procedimento adicional além daquele indicado para o tratamento.

Não existe benefício direto para o paciente ao participar desse estudo. Contudo, a descoberta dos defeitos nos genes responsáveis pelo crescimento anormal do tecido tireoidiano é de grande importância no desenvolvimento futuro de novos métodos de diagnóstico e também de novas terapias.

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Ericka B. Trarbach que pode ser encontrada no endereço Rua Dr. Arnaldo nº 455 - 4º andar Sala 4305 - Lab. de Endo. Mol. Cel. Telefone (11) 3061.8458. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

O paciente terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Investigação Molecular dos Genes *PTEN* e *DREAM* em Pacientes Portadores de Bócio Multinodular”. Eu discuti com o Dra Ericka B. Trarbach sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/ representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____