



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia (MED-B60)

**RASTREIO DE MUTAÇÕES DO GENE *NKX2-5* EM
PACIENTES PORTADORES DE CARDIOPATIA
CONGÊNITA ASSOCIADA À DEFEITOS DE
MORFOGÊNESE OU FUNÇÃO TIREOIDIANA**

Yanne Rocha Ramos

Salvador (Bahia)
Janeiro, 2017.

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Ramos, Yanne
Rastreamento de mutações do gene NKX2-5 em pacientes portadores de cardiopatia congênita associadas a defeitos de morfogênese ou função tireoidiana / Yanne Ramos. -- Salvador, 2017.
37 f. : il

Orientador: Helton Ramos.
TCC (Graduação - Medicina) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, 2017.

1. NKX2-5. 2. Tireoide. 3. Cardiopatia congênita. 4. Mutações. I. Ramos, Helton. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia (MED-B60)

**RASTREIO DE MUTAÇÕES DO GENE *NKX2-5* EM
PACIENTES PORTADORES DE CARDIOPATIA
CONGÊNITA ASSOCIADA ÀS DEFECIÊNCIAS DE
MORFOGÊNESE OU FUNÇÃO TIREOIDIANA**

Yanne Rocha Ramos

Professor orientador: **Helton Estrela Ramos**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2016.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)

Janeiro, 2017.

Monografia: *Rastreamento de mutações do gene NKX2-5 em pacientes portadores de cardiopatia congênita associada a defeitos de morfogênese ou função tireoidiana*, de **YANNE ROCHA RAMOS**.

Professor orientador: **HELTON ESTRELA RAMOS**

COMISSÃO REVISORA

- **Helton Estrela Ramos**, Professor do Departamento de Bioregulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia
- **Maria Betânia PereiraTorales**, Professora do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia
- **Joaquim Custódio da Silva Júnior**, Professor Assistente do Departamento de Saúde da Família Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia

Membro suplente

Roque Aras, Professor do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Universidade Federal da Bahia

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ___ de _____ de 2017.

*“Coragem, meu bem, coragem
Se a tristeza agora te abate
A alegria não tarda
Como o sol que nunca falha.”
(Aurora Rocha)*

A todos os pacientes que estiveram dispostos
para que esse trabalho pudesse acontecer.

EQUIPE

- Yanne Rocha Ramos, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: yannerocha@gmail.com
- Helton Estrela Ramos, Instituto de Ciências da Saúde/UFBA. Correio-e: ramoshelton@gmail.com
- Taíse Lima de Oliveira Cerqueira, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz /FIOCRUZ. Correio-e: taisellima@hotmail.com
- Angelina Xavier Acosta, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: axacosta@hotmail.com
- Tatiana Amorim, Associação de Pais e Pais dos Excepcionais (APAE), Salvador. Correio-e: amorim.tatiana@uol.com.br
- Ney Cristian Amaral Boa Sorte, Universidade do Estado da Bahia e APAE Salvador. Correio-e: neyboasorte@gmail.com
- Vladimir Fernandes, Grupo Fleury. Correio-e: vladmed@msn.com
- Ana Marice Ladeia, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/EBMSP. Correio-e: analadeia@uol.com.br
- Anabel Goés Costa, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/EBMSP. Correio-e: anabelgc@terra.com.br
- Paula Carolina Salles Leite, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública/EBMSP. Correio-e: paulacsleite1@gmail.com

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)
- Instituto de Ciências da Saúde

HOSPITAL SANTA IZABEL

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

- Pós Graduação em Medicina e Saúde Humana
- Medicina e Saúde Humana

ASSOCIAÇÃO DE PAIS E AMIGOS DOS EXCEPCIONAIS

CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MUNIZ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA BAHIA

GRUPO FLEURY

FONTES DE FINANCIAMENTO

Este projeto é parte de grande projeto interinstitucional intitulado: Pesquisa de mutações de genes implicados na morfogênese tireoidiana e cardiovascular: “Estudo clínico e molecular em coortes de pacientes com disgenesia tireoidiana e cardiopatia congênita”. (EBMSP/UFBA/APAE/HSI), financiado pela FAPESB (termo de outorga RED 0014/2012) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ (Edital No 14/2012).

AGRADECIMENTOS

- ◆ Ao meu professor orientador, Doutor **Helton Estrela Ramos**, pela orientação em várias etapas da vida acadêmica.
- ◆ A Doutora **Táise Lima de Oliveira Cerqueira**, por toda paciência e constante disponibilidade em me auxiliar e pelas substanciais contribuições acadêmicas.
- ◆ Aos Doutores **Maria Betânia Toralles, Joaquim Custódio da Silva Júnior e Roque Aras**, membros da Comissão Revisora desta Monografia, pelas criteriosas colaborações na revisão desta.
- ◆ A **André Buranelli, Rayssa Rocha e Tayne Miranda**, pela contribuição em etapas fundamentais não só para a conclusão deste trabalho, como também com amor, companheirismo e amizade.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS	2
I. RESUMO	3
II. OBJETIVOS	4
III. JUSTIFICATIVA	5
IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
IV.1 Cardiopatia congênita	8
IV. 2 <i>NKX2-5</i>	9
V. MÉTODOS	12
V.1. Desenho	12
V.2. Amostra	12
V.3. Metodologia	12
V.3.1. Intervenções e Indicadores do estudo	14
V.3.2. DNA	14
V.3.3. Reação em Cadeira da Polimerase (PCR)	14
V.3.4. Sequenciamento	15
V.4. Aspectos éticos	15
VI. RESULTADOS	17
VII. DISCUSSÃO	22
VIII. CONCLUSÃO	26
IX. SUMMARY	27
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
XI. ANEXOS	31

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

TABELAS

TABELA 1. Classificação dos pacientes divididos de acordo com os níveis valores de TSH. 18

TABELA 2. Pacientes diagnosticados com demonstrados de acordo com a hipoplasia tireoidiana a partir do exame de ultrasonografia. 19

FIGURAS

FIGURA 1. Desenvolvimento da tireoide e expressão de marcadores tireoidianos em humanos. 6

FIGURA 2. A) Esquema demonstrando a formação primitiva dos tecidos tireoidianos e cardíacos e suas justaposições. B) Proximidade entre endoderma e mesoderma, que darão origem a tireoide e coração, respectivamente, e a sinalização celular existente entre eles. C) Proximidade entre a linha média de formação do broto tireoidiano e formação do tecido cardíaco. 8

FIGURA 3. Fluxograma demonstrando a metodologia do estudo. 13

FIGURA 4. Pacientes classificados quanto à Cardiopatia Congênita acianogênica e cianogênica no ambulatório Silva Lima – Hospital Santa Izabel. 17

FIGURA 5. Eletroferograma dos pacientes estudados para o gene *NKX2-5* demonstrando o polimorfismo p.Gln181 encontrado no éxon 2. 20

FIGURA 6. Eletroferograma dos pacientes estudados para o gene *NKX2-5* demonstrando o polimorfismo p.Glu21 encontrado no éxon 1. 21

I. RESUMO

RASTREIO DE MUTAÇÕES DO GENE *NKX2-5* EM PACIENTES PORTADORES DE CARDIOPATIA CONGÊNITA ASSOCIADA ÀS DEFEITOS DE MORFOGÊNESE OU FUNÇÃO TIREOIDIANA. Estudos genéticos e moleculares sugerem o envolvimento essencial do fator de transcrição *NKX2-5* no desenvolvimento embrionário tireoidiano e cardíaco. Mutações nesse gene repercutem em falhas na organogênese cardíaca e, possivelmente, no primórdio tireoidiano, corroborando o maior achado de associação de cardiopatia congênita (CC) e Disgenesia Tireoidiana (DT). Objetivos: analisar alterações genéticas no gene *NKX2-5* em pacientes adultos com cardiopatia congênita associados a alterações morfológicas e/ou disfunção não-autoimune da tireoide. Metodologia: Análise de coorte de pacientes portadores de CC: a) ultrassonografia da tireoide; b) exames laboratoriais para avaliar função tireoidiana e presença de autoimunidade (ATPO e TSH). Determinação de peso, altura e Superfície Corporal [$SC(m^2) = peso(kg)^{0,425} \times altura(cm)^{0,725} \times 71,84 \times 10^{-4}$]. Avaliação genética: coleta 5ml de sangue total para extração de DNA genômico; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento direto da região codante do gene *NKX2.5*. Aspectos éticos: Esse estudo é um subprojeto de “Pesquisa de mutações de genes implicados na morfogênese tireoidiana e cardiovascular: estudo clínico e molecular em coortes de pacientes com disgenesia tireoidiana e cardiopatia congênita” financiado pela FAPESB (termo de outorga RED 0014/2012) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ (Edital No 14/2012) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Prof. Dr. Celso Figuerôa e pelo Comitê de Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos.

Palavras-chave: 1. Tireoide; 2. Fator de transcrição *NKX2-5*; 3. Cardiopatia congênita.

II. OBJETIVOS

§ Pesquisar mutações e/ou polimorfismos no gene *NKX2-5* em pacientes adultos com cardiopatia congênita associados a alterações morfológicas e/ou disfunção não-autoimune da tireoide acompanhados por ambulatório específico no Hospital Santa Izabel (HSI).

III. JUSTIFICATIVA

Apesar de alguns defeitos genéticos terem sido descritos em pacientes com DT, sua patogênese na maioria dos casos ainda precisa ser elucidada, bem como se a variabilidade clínica encontrada é causada por: mutações em diferentes genes, ou associadas (bigenismo) ou se um espectro fenotípico variando da atireose à hipoplasia pode ser causado pela mesma alteração genética.

A caracterização clínica e molecular pretendida através desse trabalho será ponto de partida primordial para um bom entendimento dos mecanismos morfogenéticos comuns da ontogênese cardíaca e tireoidiana.

Existe escasso conhecimento na temática. Este estudo, envolvendo pacientes adultos cardiopatas congênitos, pode trazer avanços na identificação de maior prevalência de patologia tireoidiana nesta coorte, possivelmente contribuindo para otimização no manejo da CC.

IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A tireoide é o primeiro órgão endócrino a se desenvolver. Microscopicamente, compõe-se de dois grupos celulares com origens embrionárias diferentes: células foliculares tireoidianas (CFT) e células parafoliculares (ou células C). O primórdio tireoidiano, que abriga as células foliculares tireoidianas (CFT) primordiais, é oriundo do espessamento do epitélio endodérmico no assoalho da linha média da faringe embrionária, correspondendo à base da língua. Este primórdio pode ser observado por volta 20-22º dia embrionário em humanos¹.

As CFT primordiais, nesse momento, já possuem um traço molecular peculiar – a coexpressão única de quatro fatores de transcrição: *HHEX*, *TITF1*, *PAX8* e *FOXE1* – que as distingue de outras células endodérmicas adjacentes². Tal processo de diferenciação morfológica e molecular das células primordiais é denominado de especificação ou determinação³, que não se conhece o mecanismo controlador, mas há hipótese de possível sinalização advinda do mesênquima vizinho ou do endotélio do saco aórtico primitivo¹ (Figura 1). Seguindo a etapa de especificação, tem-se a formação do broto tireoidiano embrionário e a migração do primórdio, quando a tireoide primitiva alcança sua posição final, anterior à traqueia, ao nível do segundo e terceiro anel traqueal, abaixo da cartilagem cricóide³.

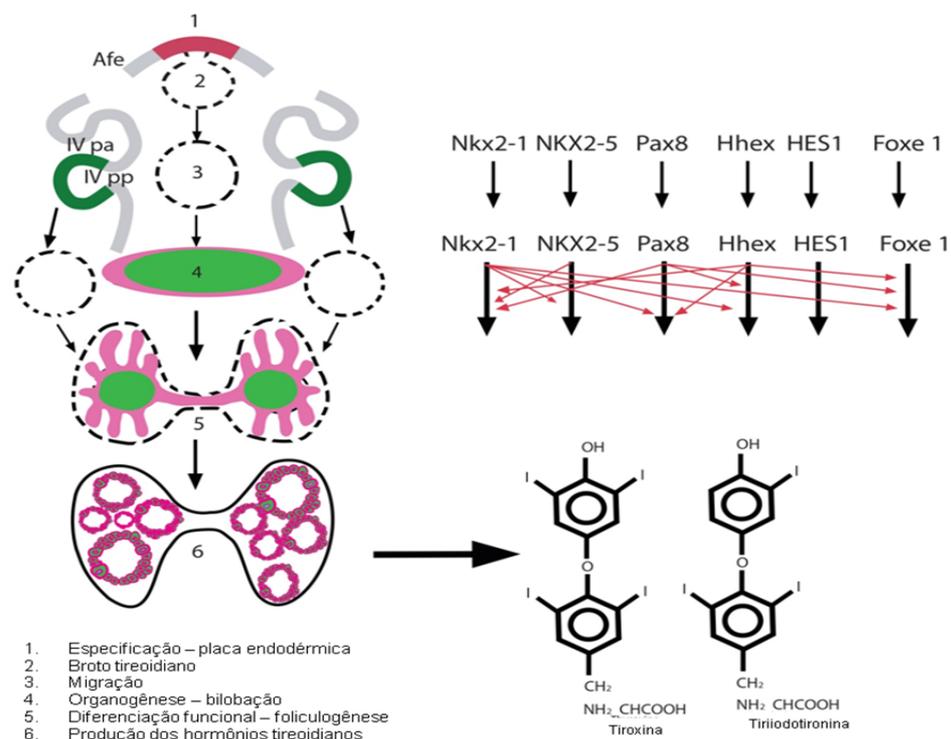


Figura 1. Desenvolvimento da tireoide e expressão de marcadores tireoidianos em humanos. Fonte: Arquivo de imagens do Laboratório de Estudo da Tireoide da Universidade Federal da Bahia.

Seguindo o processo de morfogênese, há a lobulação e foliculogênese, etapas cruciais ao desenvolvimento da glândula, sendo que a primeira está diretamente relacionado à formação macroscópica glandular: dois lobos conectados por um istmo estreito. Já a foliculogênese, refere-se à construção do arcabouço funcional da tireoide, o foliculo, a unidade que compõe os lobos tireoidianos e delimita o depósito central de coloide⁴. O coloide, composto principalmente por tireoglobulina, é fundamental para síntese dos hormônios tireoidianos: triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), essenciais para a regulação do consumo energético, desenvolvimento e crescimento².

Apesar da organogênese tireoidiana ainda não estar completamente desvendada, sabe-se que a embriogênese da tireoide é controlada por pelo menos três fatores de transcrição, *TITF1*, *FOXE1* e *PAX8*, que regulam desde a invaginação do endoderma à diferenciação e proliferação celular. Estes fatores de transcrição são genes-candidatos óbvios para as disgenesias tireoidianas (DT), que podem ser compreendidas como agenesia, ectopia ou hipoplasia. Além destes genes citados, o do receptor do TSH é também um gene-candidato. Recentemente, outro fator de transcrição, importante para a morfogênese cardíaca, *NKX2-5*, foi também relacionado à etiologia da DT². O papel desempenhado pelo *NKX2-5* ocorre no desenvolvimento do embrião durante o período inicial de organogênese³ (Figura 2).

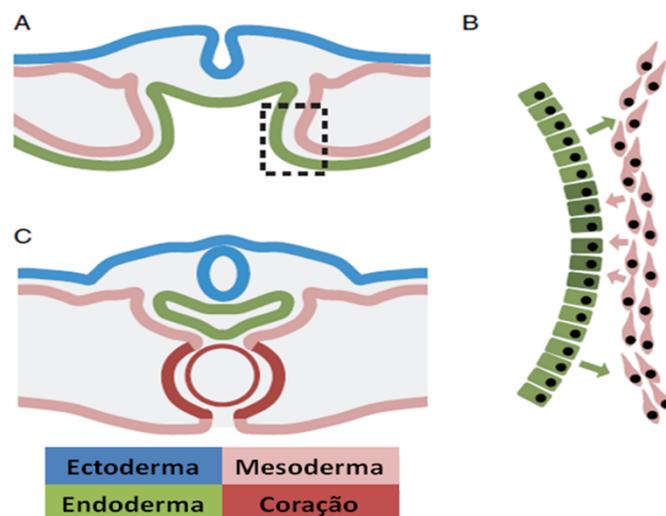


Figura 2: A) Esquema demonstrando a formação primitiva dos tecidos tireoidianos e cardíacos e suas justaposições. B) Proximidade entre endoderma e mesoderma, que darão origem a tireoide e coração respectivamente, e a sinalização celular existente entre eles. C) Proximidade entre a linha média de formação do broto tireoidiano e formação do tecido cardíaco⁵.

Estudos genéticos e moleculares sugerem o envolvimento essencial do fator de transcrição *NKX2-5* no desenvolvimento embrionário tireoidiano e cardíaco². Mutações nesse gene repercutem em falhas na organogênese cardíaca, especificamente na ventricular e, possivelmente, no primórdio tireoidiano, corroborando a suspeita de interação entre os pacientes com cardiopatia congênita (CC) e Disgenesia Tireoidiana (DT)¹.

IV.1 Cardiopatia Congênita

A cardiopatia congênita é uma anormalidade estrutural do coração ou dos grandes vasos, que interfere de modo direto no seu funcionamento de modo significativo. São as alterações congênitas mais prevalentes, sendo estimados 9 a cada 1000 nascidos vivos⁶. Essas anormalidades congênitas ainda estão associadas a outras malformações extra cardíacas, como as abdominais, síndromes genéticas, acrescentando um risco ainda maior de comorbidade e mortalidade⁷. Devido aos pontos elencados, é crucial o diagnóstico precoce para manejo e tratamento da doença adequados a cada paciente⁸.

A etiologia das alterações é ainda, na maioria das vezes, desconhecida. Entretanto, sabe-se que genes candidatos e exposições químicas durante a gravidez podem resultar em complicações, elementos dentre os quais, estudos tem tentado relacionar gene-ambiente¹⁰. Quanto ao diagnóstico, é essencial que um exame clínico apurado seja primeiro passo para a suspeita como diagnóstico clínico já no período neonatal, podendo ter como achados uma tétrede: sopro cardíaco, cianose, taquipneia e arritmia cardíaca¹¹, porém o diagnóstico da CC, geralmente, é consolidado com a utilização do ecocardiograma¹². Em relação a abordagem terapêutica, essa pode variar de acordo com a extensão da malformação cardíaca, tendo como possibilidade até a abordagem cirúrgica a depender do prognóstico do paciente¹³.

O espectro clínico da CC é bastante diverso, podendo apresentar-se como sintomático ou assintomático. É comum uma classificação quanto a cianose – cardiopatia congênita

acianogênica e cianogênica. Por definição, a cardiopatia congênita cianogênica (CCC), há uma falha no coração que ocasiona uma diminuição do fluxo sanguíneo para os pulmões ou estreitamento das válvulas cardíacas, dificultando a passagem do sangue. A principal manifestação clínica é a cianose (cor cinza-violeta) nas extremidades¹⁴. As cardiopatias congênitas acianóticas (CCA) são defeitos cardíacos de correção mais simples e cursam com dispneia, sopro cardíaco e pulso fraco¹¹.

As cardiopatias acianóticas são mais frequentes e, normalmente, menos graves. As CCA mais comuns são: comunicação interventricular (CIV), comunicação interatrial (CIA), persistência do canal arterial (PCA), estenose aórtica (EA), estenose pulmonar (EP) e coarctação da aorta (CoA). A frequência das CCC é distribuída em: Tetralogia de Fallot (T4F), atresia de válvula pulmonar (AP), transposição de grandes vasos (TGA), atresia tricúspide, retorno venoso anômalo, Truncus Arterious (TA), e coração esquerdo hipoplásico¹⁵.

Na 32ª Conferência de Bethesda, realizada no ano de 2000, foram discutidos os cuidados com o adulto cardiopata congênito, atentando-se à estimativa do número de pacientes, fundamental para o planejamento de programas e manejo de recurso. Nesse contexto, foi estabelecida uma classificação das lesões, as quais foram agrupadas em: complexas, moderadas e leves⁶.

As lesões consideradas leves são aquelas em que não há grandes repercussões hemodinâmicas (defeitos no septo atrial pequeno ou forame oval patente, ou as reparadas espontaneamente, ou os defeitos no septo atrial ou desvio no septo ventricular reparados). Dentre as moderadas, estão incluídos os defeitos de septo atrioventricular, coarctação da aorta, anomalia de Ebstein, defeito do septo ventricular (DSV) com lesão associada, tronco arterial patente, Tetralogia de Fallot, dentre outros. Por fim, estão as complexas, nas quais se encontram todas as formas de cardiopatia congênita cianóticas e Síndrome de Eisenmenger, essas são as que apresentam um pior prognóstico, maior taxa de mortalidade e maiores complicações pós-operatórias. Desse modo, os pacientes devem ser acompanhados regularmente em centros especializados⁶.

Entretanto, essa classificação não é soberana e por isso, cada paciente deve ser avaliado individualmente, considerando a presença ou não de sintomas durante a realização de atividades físicas e outros parâmetros para determinar o tipo e estágio da doença⁶.

Anomalias cardíacas podem se mostrar, minoritariamente, como parte de uma síndrome cromossômica (5 a 10%) ou genética (3 a 5%)⁶, bem como associadas a outras condições, como resultados de fatores ambientais, infecciosos ou outros. Ocorrendo de forma isolada, a hereditariedade é, majoritariamente, multifatorial ou poligênica¹⁶. Vários genes diferentes têm sido propostos no desenvolvimento de diversas doenças cardíacas e é nesse contexto que se destaca o *NKX2-5*.

IV.2 *NKX2-5*

A associação entre malformação cardíaca e tireoidiana, levanta a hipótese de defeitos em genes comuns para a embriogênese de ambos órgãos. Uma relação estreita entre o endoderma faríngeo e o mesoderma cardíaco, bem como a dependência de sinalizações recíprocas não só sustenta a ideia de associação entre os tecidos, mas também sugere que há mecanismos patogênicos comuns na má formação cardíaca e tireoidiana. No cenário molecular, o gene *NKX2-5* é um fator de transcrição candidato para avaliação em pacientes com Cardiopatia Congênita (CC) e/ou Disgenesia Tireoidiana (DT), já aponta para uma possível ligação entre essas desordens².

Não seria surpreendente que pacientes com CC, pouco avaliados do ponto de vista clínico e anatômicos em relação à tireoide, possam apresentar algumas das mais diversas formas de alterações morfológicas e funcionais subclínicas da glândula (hemiagenesia, presença de lobo piramidal, lobo tireoidiano assimétrico, tireóide ectópica sublingual, glândula hipoplásica, implantação cervical alta da glândula persistência do ducto tireoglossos e hipotireoidismo subclínico não auto-imune)¹.

Entretanto, esta associação ainda não foi sistematicamente explorada em estudo populacional envolvendo pacientes adultos com CC, apesar de existir dados que apontem maior prevalência de DT em pacientes com CC pediátrica do que na população geral¹⁷. Logo, um estudo envolvendo pacientes adultos cardiopatas congênitos, acompanhados em um ambulatório especializado, representa uma fonte específica de aprofundamento na temática, visando elucidar e oferecer achados clínicos e moleculares que possam elucidar os mecanismos ontogênicos compartilhados entre a tireoide e coração.

O *NK-2* é uma classe de genes *homeobox*, que nos vertebrados, corresponde ao *NKX2-5*, o qual parece desempenhar importante função na organogênese embrionária. O gene que

codifica *NKX2-5* localiza-se no cromossomo 5q34, o qual é fundamental para a morfogênese cardíaca, sendo também expresso transitório e precocemente no primórdio tireoidiano¹⁸. Esse fator de transcrição é essencial na morfogênese cardíaca, principalmente ventricular, além da miogênese e fisiologia¹⁶. Mutações inativadoras do fator de transcrição citado foram descritas em pacientes com cardiopatia congênita, sendo os mais comuns defeitos de septo e distúrbios de condução¹⁹. Já as alterações tireoidianas encontradas incluem ectopia e agenesia².

No broto tireoidiano, em estudos *in vitro*, o *NKX2-5* parece induzir fortemente o simportador sódio-iodeto (NIS) e agir sinergicamente ao lado do TITF-1, podendo influenciar na expressão de genes de suma importância, como a tireoglobulina e pendrina²⁰.

O interesse clínico no *NKX2-5* foi ampliado a partir da identificação de mutações heterozigóticas envolvendo a patogênese da disgenesia tireoidiana. Um rastreio populacional realizado na Itália, incluindo 241 pacientes com DT, identificou 3 mutações em 4 casos² e, recentemente, foi evidenciada a associação entre a mutação do *NKX2.5* à alteração da região promotora do *PAX8* em um caso de DT²¹.

O espectro do gene *NKX2-5* é muito diversificado em relação aos tipos de mutações, posição do aminoácido afetado e efeito direto na alteração das propriedades de interações com outras proteínas²¹. Além disso, estudos recentes demonstraram que embriões de animais *NKX2-5^{-/-}* apresentam menor crescimento do broto endodérmico, sugerindo que esse fator de transcrição desempenha participação no controle genético do complexo desenvolvimento tireoidiano².

O desempenho do *NKX2-5* relaciona-se não só a morfogênese tireoidiana, mas abre o questionamento de que esse fator de transcrição também pode estar associado à fisiologia da glândula, remetendo assim à disormonogênese. Na literatura, há achados que corroboram a sugestão de uma possível associação entre CC e DT, demonstrando que pacientes com hipotireoidismo congênito possuem frequência aumentada de cardiopatia congênita do que a população em geral²¹. Adicionalmente, são crescentes os interesses clínicos nesse fator de transcrição, visto que em um estudo italiano buscando a patogênese da disgenesia tireoidiana, foram identificadas mutações nesse gene candidato².

Considerando os genes previamente citados, *PAX 8* e *NKX2-5* são fatores diretamente relacionados ao desenvolvimento da glândula tireoidiana, participando da formação,

migração, diferenciação e proliferação. Portanto, estudar o *NKX2-5* em pacientes com disgenesia tireoidiana estaria justificado em virtude da participação na via¹⁸.

V. MÉTODOS

V.1. DESENHO DO ESTUDO

Estudo de corte transversal descritivo.

V.2. AMOSTRA

População do estudo

Pacientes portadores de cardiopatia congênita, acompanhados no Ambulatório Silva Lima de Cardiopatia Congênita no Adulto, Hospital Santa Izabel, Salvador, Bahia, Brasil.

Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão a serem atendidos foram: diagnóstico clínico de cardiopatia congênita; disponibilidade de prontuário para coleta de dados clínico; registro de alteração prévia dos níveis de TSH, mesmo sem alteração morfológica da tireoide; alteração morfológica da tireoide observada em ultrassonografia, mesmo sem alteração de TSH/ATPO; aceitação do(a) paciente em participar do estudo, mediante assinatura de TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Os pacientes com formas sindrômicas e alterações em quaisquer outros sistemas também foram convidados a participar do estudo sendo submetidos ao mesmo seguimento (assinatura de TCLE, coleta de sangue, etc.) citado anteriormente.

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: indisponibilidade do prontuário para coleta retrospectiva dos dados clínicos; pacientes com idade ≤ 18 anos; tireoide morfológicamente normal na ultrassonografia de tireoide ou com volume tireoidiano aumentado (acima do valor de referência) e resultados de TSH/ATPO normais.

V.3. METODOLOGIA

Os pacientes previamente diagnosticados como portadores das diversas CC em tratamento foram convidados a participar do estudo para avaliação da função e morfogênese da tireoide seguindo o fluxograma (Figura 3). O rastreio foi realizado através de análise bioquímica no laboratório do Hospital Santa Isabel (dosagem de TSH e ATPO, sendo valores

de referência 4,0 $\mu\text{UI/mL}$ e 35,0 $\mu\text{UI/mL}$, respectivamente) e ultrassonografia da tireoide realizada por radiologista para avaliação morfológica em: a) anormalidade de posicionamento glandular; b) hemiagenesia; d) presença de lobo piramidal; d) alteração de volume glandular (hipoplasia ou bócio); e) presença de lesões nodulares ou cistos rudimentares; g) existência de lobo piramidal ou persistência do ducto tireoglosso, utilizando-se aparelho Mindray portátil DP-4900. Além disso, foram coletadas medidas antropométricas peso, altura, relacionadas na fórmula de Superfície Corporal [$SC(m^2) = \text{peso}(kg)^{0,425} \times \text{altura}(cm)^{0,725} \times 71,84 \times 10^{-4}$], utilizadas para o estabelecer o parâmetro determinante para hipoplasia: $<5 \text{ mm}^3$ para mulheres e $<7 \text{ mm}^3$ para homens.

As variáveis do estudo foram: sexo, idade, presença de alterações da morfogênese tireoidiana (agenesia, hemiagenesia, ectopia, hipoplasia, tireoide tópica com assimetria lobar) e/ou outras alterações tireoidianas (nódulos ou cistos, presença de lobo piramidal ou ducto tireoglosso), presença de alterações funcionais (hipotireoidismo clínico ou subclínico) de origem não autoimune e tipo de cardiopatia congênita.

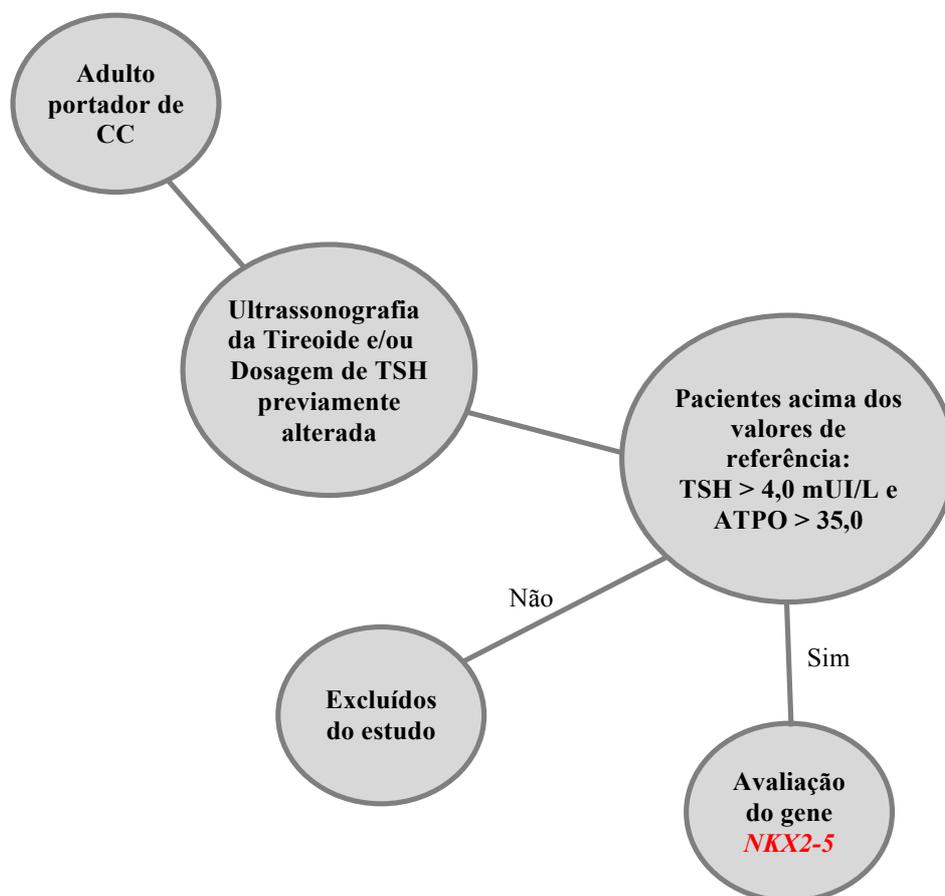


Figura 3: Fluxograma demonstrando a metodologia do estudo

V.3.1 Intervenções e Indicadores do estudo

Durante o atendimento ambulatorial, os indivíduos que, segundo análise prévia dos prontuários, elegíveis para inclusão na pesquisa foram convidados a participar da mesma e depois de obtida assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 3), foram coletados 5ml de sangue em tubo de ensaio contendo EDTA, do qual foi sendo extraído o DNA para o estudo genético. O material está armazenado no Laboratório da Tireoide, no Departamento de Bio-regulação do Instituto de Ciências da Saúde/UFBA (Universidade Federal da Bahia), em freezer -20°C.

A investigação do gene *NKX2-5* foi realizada em: a) todos pacientes portadores de DT associado à CC, b) em pacientes com DT isolada, c) em pacientes com CC associado à malformações tireoidianas clinicamente significativa ou subclínica. Os pacientes portadores de CC sem registro de diagnóstico de malformação tireoidiana, também serão submetidos às dosagens de TSH e ATPO e ecografia da tireoide.

V.3.2 DNA

A coleta de sangue total, para extração de DNA genômico a partir de leucócitos periféricos foi realizada com utilização do reagente Puregene® DNA isolation kit (Gentra Systems). Dois microlitros da amostra foram utilizados para determinação da pureza (A260/A280) e concentração de DNA utilizando Nano Espectrofotômetro (Curitiba, KASVI). As amostras de DNA foram estocadas em freezer a -20°C até o início da análise molecular.

V.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação por PCR foram utilizados “primers” específicos para o gene *NKX2-5*. Para cada reação de PCR foram utilizados: tampão de reação 10X (10mM tris-HCl pH 8,5, 50mM KCl, 1,5mM MgSO₄ 0,01%), 200mM de cada dNTP, 0,25mM de cada primer, 1U de TaqDNA polimerase e 100ng de DNA. O gene possui dois éxons que foram amplificados por um total de 3 PCRs utilizando-se os seguintes pares de primers para o exon 1: 1F 5'- CTT GTG CTC AGC GCT ACC T; 1R 5'- CTC CTG GCC CTG AGT TTC TT gerando um fragmento de 523 pares de bases. Para o exon 2: 2AF 5'- GCGCTCCGTAGGTCAAGC-3', 2AR 5'-TAGGGATTGAGGCCACG-3', 2BF 5'- CAGACTCTGGAGCTGGTGG-3' e 2BR 5'-CCCGAGAGTCAGGGA-3' gerando

fragmentos de 469 pares e 440 bases, respectivamente. A reação do exon 1 inicia-se com cinco minutos à 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 56°C e 30 segundos à 72°C, terminando com um período de extensão de 10 minutos à 72°C. Para o exon 2, todas as reações começam com 2 minutos à 95°C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos à 95°C, 30 segundos à 59°C ou 60°C e 45 segundos à 72°C e terminando com um período de extensão de 10 minutos à 72°C. DMSO (0.2 mL/20- μ L reação) foi adicionada aos reagentes para as reações dos exons 1 e 2A. A amplificação foi realizada em termociclador Verity (Byosystems) e programado especificamente para cada reação. Depois de amplificados pela PCR os fragmentos foram visualizados em gel de agarose para verificação do tamanho do fragmento amplificado comparando-o com marcador de peso molecular. A visualização foi realizada através da coloração com *blue-juice* utilizando-se transiluminador com luz ultravioleta (UV) para a visualização dos fragmentos.

V.3.4 Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados com PureLink Quick PCR Purification kit (INVITROGEN, Germany) e sequenciados usando o ABI PRISM Dye Terminator cycle sequencing Ready Reaction kit (PE Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante. O sequenciamento bidirecional foi realizado pelo sequenciamento automático ABI3100 genetic analyzer. As alterações de sequência foram examinadas pelo software Bioedit Sequence Alignment Editor, Versão 7.2.5.0. A similaridade da sequência foi sempre confirmada utilizando o Programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

V.4. Aspectos éticos e Financiamento

Trata-se de um subprojeto do estudo “Pesquisa de mutações de genes implicados na morfogênese tireoidiana e cardiovascular: estudo clínico e molecular em coortes de pacientes com disgenesia tireoidiana e cardiopatia congênita”, financiado pela FAPESB (termo de outorga RED 0014/2012) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPQ (Edital No 14/2012). Este trabalho está sendo desenvolvido em dois núcleos de pesquisa: na APAE/Salvador-BA, onde é realizada triagem neonatal de portadores de hipotireoidismo congênito, e no Ambulatório de Cardiopatia Congênita no Adulto do Hospital Santa Izabel, o qual é referência terciária em cardiologia na Bahia.

O estudo citado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Prof. Dr. Celso Figuerôa e pelo Comitê de Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (ANEXOS 1 e 2) e é desenvolvido pelo professor Helton Estrela Ramos e pela doutora do

Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (FIOCRUZ) Taíse Lima de Oliveira Cerqueira em parceria com uma equipe executora, composta por:

- Prof. Dra. Angelina Xavier A. Costa – Chefe do Serviço de Genética Médica do COM-HUPES/Universidade Federal da Bahia, BA.

- Dra. Tatiana Amorim – Pediatra e Geneticista do Serviço de Referência em Triagem Neonatal – SRTN, Coordenadora do Núcleo de Pesquisa Científica – NUPEC – Centro de Diagnóstico e Pesquisa – APAE Salvador.

- Prof. Dr. Ney Cristian Amaral Boa Sorte – Pediatra e Pesquisador do Centro de Pesquisas Fima Lifshitz da Universidade Federal da Bahia, Professor Adjunto do curso de Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Professor Auxiliar Doutor da Universidade do Estado da Bahia e Assessor Científico no Núcleo de Pesquisa Científica da APAE Salvador.

- Dr. Vladimir Fernandes – Radiologista e coordenador da DIAGNOSON.

- Prof. Dra. Ana Marice Ladeia – Pesquisadora e Professora Adjunta da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Fundação para o Desenvolvimento das Ciências.

- Dra. Anabel Goés Costa – Cardiologista, Pesquisadora e Chefe do Serviço de Cardiopediatria e do Ambulatório de Cardiopatia Congênita em Adultos, Hospital Santa Izabel; Mestranda Curso de Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

- Paula Carolina Salles Leite – estudante de iniciação científica da Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

- Yanne Rocha Ramos – estudante de iniciação científica da Faculdade de Medicina da Bahia.

VI. RESULTADOS

Cento e vinte (120) pacientes oriundos da coleta de dados, possuindo resultados prévios e atualizados de TSH, foram coletados, dentre os quais, 70 do sexo feminino (58,3%) e 50, sexo masculino (41,7%).

Entretanto, apenas 114 foram identificados quanto à cardiopatia congênita, sendo 79 (65,8%) pacientes portadores de cardiopatia acianogênica (Comunicação Interventricular, Comunicação Interatrial, Estenose Pulmonar e outros) e 35 pacientes (29,1%) detectados como cardiopatas congênitos cianogênicos (Tetralogia de Fallot, Atresia de Tricúspide, Transposição das Grandes Artérias), outros (1) e 5 pacientes sem diagnóstico identificado no prontuário demonstrados abaixo.

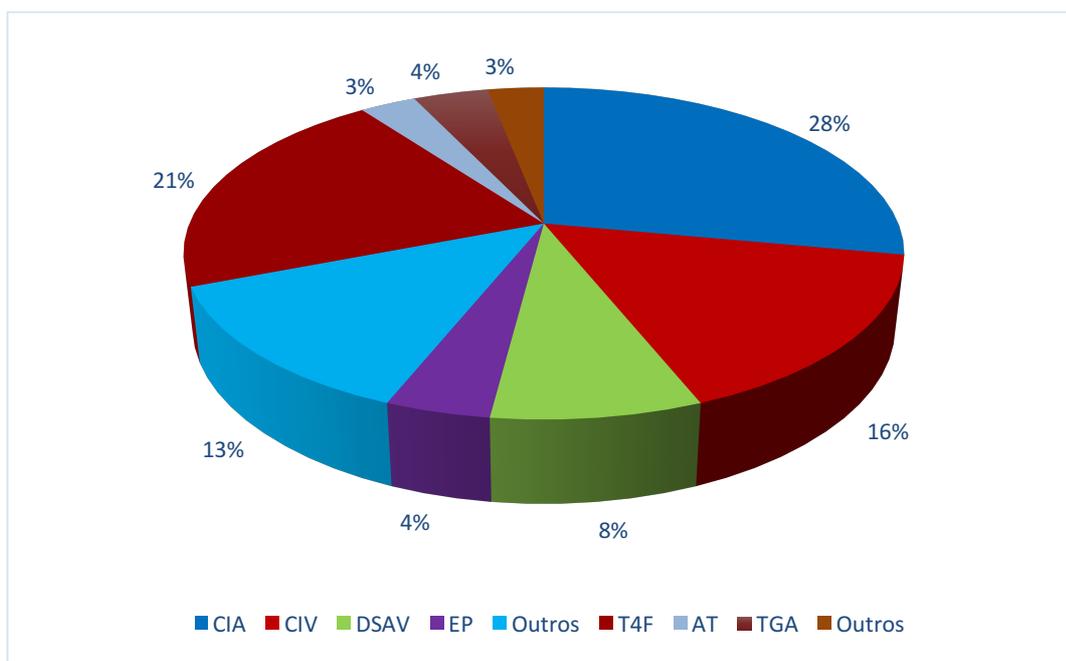


Figura 4: Pacientes classificados quanto à Cardiopatia Congênita acianogênica e cianogênica no ambulatório Silva Lima – Hospital Santa Izabel. (CIA: comunicação interarterial; CIV: comunicação interventricular; DSAV: defeito do septo atrioventricular; EP: estenose pulmonar; T4F: Tetralogia de Fallot; AT: atresia tricúspide; TGA: transposição das grandes artérias).

A coleta dos mesmos dados antropométricos (altura, peso, idade, superfície corpórea) foi parcial, devido à falta de registro dos mesmos nos prontuários. Tal falta de registros representa significativa perda de dados que impossibilita a análise completa, por não atender os critérios de inclusão, e seguimento do fluxograma (Figura 3). Em decorrência disso, a descrição dos resultados levará em conta apenas aqueles que preencherem os critérios necessários para o rastreamento genético do fator de transcrição *NKX2-5*.

Dos cinquenta (50) pacientes do sexo masculino, apenas 48 apresentavam dados completos, a média de idade foi de 31 anos, mediana 31, desvio padrão de 10 e os valores médios de TSH para tais pacientes foi de 2,81 $\mu\text{UI/mL}$, sendo que 11 pacientes apresentaram-se acima do valor de referência do TSH (4,0 $\mu\text{UI/mL}$) (Tabela 1). Três pacientes possuíam diagnóstico de hipotireoidismo obtidos previamente. Apenas um paciente do sexo masculino não apresentou valor positivo de Anti-TPO e quatro deles estavam acima do valor de referência para auto-imunidade (<35 $\mu\text{UI/mL}$).

Dentre os pacientes do sexo masculino (24), foram realizadas ultrassonografias, sendo detectados 7 pacientes com hipoplasia (Tabela 2), considerando o valor de referência para o volume da glândula tireoidiana, em homens, 7 cm^3 . Foram descritos pelo operador, pacientes com assimetria lobar, sendo que dois exibiam redução volumétrica em lobo esquerdo. A avaliação laboratorial baseado nos valores do hormônio tireotrópico (TSH) encontrou resultados expressos abaixo.

Tabela 1: Classificação dos pacientes divididos de acordo com os níveis valores de TSH.

Valores de TSH	N (%)	Sexo
< 4mUI/L	101 (84,1)	63F/38M
(1) 4,0 – 6,0 UI/L	9 (7,5)	4F/5M
(2) 6,0 – 9,0 UI/L	6 (5)	3F/3M
(3) \geq 9 UI/L	4 (3,3)	1F/3M

Entre os valores de TSH fora do padrão de referência, houve 19 pacientes (11 homens e 8 mulheres) relacionados a tal alteração. Entretanto, nesse grupo, apenas 15 estariam com valores de TSH entre 4,0 $\mu\text{UI/mL}$ e 10,0 $\mu\text{UI/mL}$, podendo ser diagnosticados como hipotireoidismo subclínico.

Tabela 2: Pacientes diagnosticados com demonstrados de acordo com a hipoplasia tireoidiana a partir do exame de ultrassonografia.

Paciente	Sexo	CC	TSH	AATPO	Volume
HT1	M	CCC	3,00	-	5,59
HT2	M	CCA	1,56	-	3,19
HT3	M	CCC	1,17	-	6,68
HT4	F	CCC	1,49	-	4,85
HT5	M	CCC	5,14	-	4,34
HT6	M	CCA	3,98	-	5,32
HT7	M	CCA	2,39	-	6,74
HT8	M	CCA	6,17	NA	6,2
HT9	F	CCA	0,00	+	0

Pacientes do sexo feminino (70), apenas 67 apresentaram dados de idade, sendo a média de 35 anos, mediana 32 e desvio padrão, 14. Os valores médios de TSH obtidos foram de 2,74 $\mu\text{UI/mL}$, dentre os quais 8 pacientes estavam acima do valor de referência hormonal previamente citado (Tabela 1). Houve perda do resultado de anti-TPO de 2 pacientes. Seis (6) pacientes foram detectadas com autoimunidade, visto que apresentavam acima do valor de referência para o ATPO.

Realizou-se ultrassonografia em 43 pacientes do sexo feminino. Apenas 2 pacientes apresentaram volume da glândula abaixo do valor de referência de 5 cm^3 , sendo consideradas hipoplásicas e foi detectada 1 paciente com agenesia, cuja paciente já possuía diagnóstico prévio. Nesse grupo, apenas uma paciente tinha diagnóstico prévio de hipertireoidismo (Tabela 2).

Em relação aos pacientes descritos quanto a hipoplasia (Tabela 2), pode-se correlacionar que dentre os homens, 3 apresentam cardiopatia congênita cianogênica e 4,

cardiopatía congênita acianogênica. Nas mulheres, uma possui cardiopatía cianogênica e a outra, acianogênica. Além disso, há 1/9 pacientes hipoplásicos (HT5) que pode ser diagnosticado como portador de hipotireoidismo subclínico, em decorrência do valor de TSH ($> 4,0 \mu\text{UI/mL}$ e $< 10,0 \mu\text{UI/mL}$) e ATPO negativo. O paciente (HT8) não pode ser avaliado quanto ao hipotireoidismo subclínico por causa da ausência do valor de ATPO (Tabela 2).

De acordo com os resultados laboratoriais prévios e da coleta de dados alterados, apenas $n=16$ apresentaram todos os dados necessários para realização do estudo genético (pacientes com TSH prévio alterado e pacientes com TSH alterados durante a triagem do estudo). Dentre os 16 pacientes, 9 (3M/6F) foram avaliados por meio de ultrassonografia, os outros 7 (4M/3F) pacientes apesar de não retornarem ao serviço para a avaliação ultrassonográfica, já possuíam resultados anteriores de dosagem de TSH alterado e desta forma foram investigados geneticamente.

Quanto ao tipo de CC destes pacientes: 6 apresentam cardiopatias congênitas cianogênicas, como: Tetralogia de Fallot, Truncus, Eisenmenger e Anomalia de Ebstein; e 10 pacientes portadores de cardiopatía congênita acianogênica, como: comunicação interventricular, comunicação interatrial, defeito do septo atrioventricular, coarctação de aorta e estenose pulmonar.

Em relação as ultrassonografias realizadas, nenhum dos 9 pacientes apresentou alteração quanto ao volume, textura ou posição. O volume médio da tireoide nos pacientes do sexo masculino foi de $10,06 \text{ cm}^3$. Para as mulheres submetidas a essa avaliação, o volume médio foi de $6,84 \text{ cm}^3$.

Quanto ao rastreio do gene *NKX2-5*, foram encontrados dois polimorfismos, previamente descritos na literatura, em 12 dos 16 pacientes estudados. O polimorfismo p.Gln181 (c.541G>A) descrito no éxon 2, foi encontrado em heterozigose em apenas 1 paciente do sexo masculino (Figura 5).

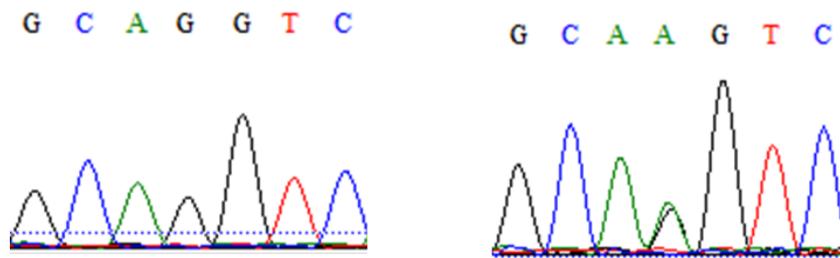


Figura 5: Eletroferograma dos pacientes estudados para o gene *NKX2-5* demonstrando o polimorfismo p.Gln181 encontrado no éxon 2.

Um segundo polimorfismo, p.Glu21 (c.53A>G) também relatado na literatura, foi encontrado em 11 dos 16 pacientes, 8 em heterozigose e 4 em homozigose (Figura 6).

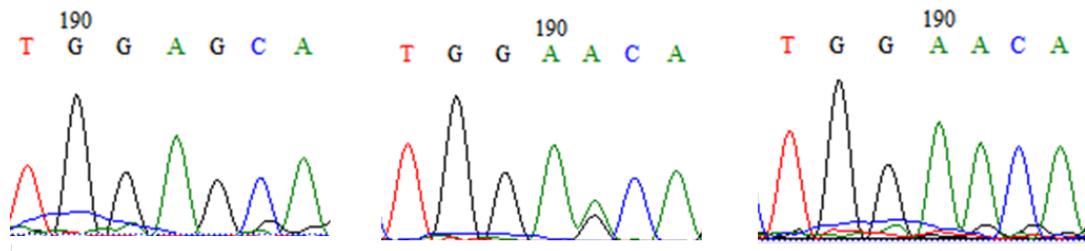


Figura 6: Eletroferograma dos pacientes estudados para o gene *NKX2-5* demonstrando o polimorfismo p.Glu21 encontrado no éxon 1.

VII. DISCUSSÃO

Esse é um estudo clínico-genético realizado em pacientes com cardiopatia congênita com a finalidade de pesquisar, além das características clínicas da cardiopatia congênita, a sua correlação com o gene candidato *NKX2-5* e a função tiroeoidiana destes pacientes.

A cardiopatia congênita é uma doença congênita muito prevalente, cerca de 9 a cada 100 nascidos vivos no mundo. Atualmente, 90% das crianças portadoras de cardiopatia congênita atingem a idade adulta e graças ao diagnóstico precoce, técnicas cirúrgicas e cuidado intensivo, o número de adultos portadores da doença tem sido crescente ao longo dos últimos 50 anos⁵. Na Bahia, um estudo em uma maternidade de referência em Salvador em 2013, apontou como 5,98% a prevalência dessa cardiopatia em recém-nascidos²³. Há escassos dados que possibilitem precisar quanto à prevalência de adultos portadores de cardiopatia congênita.

A proporção de 70 mulheres CC: 50 homens CC é discordante do que foi demonstrado na literatura e citado previamente²⁰, já que há uma prevalência de 56,1% do sexo masculino. Quanto aos tipos de cardiopatias, 79 CC acianogênicas (CIV, CIA, PCA, Coarctação de Aorta, Defeito do septo Atrioventricular, Estenose Aórtica) e 39 CC acianogênicas (Tetralogia de Fallot, Atresia de Tricúspide, Transposição das Grandes Artérias, Truncus Arteriosus) houve concordância de prevalência entre os encontrados e aqueles demonstrados na literatura²³.

Em relação aos achados de imagem, 67 pacientes (43F/24M) realizaram a ultrassonografia. Destaca-se a prevalência do sexo masculino diante das alterações em relação ao volume da glândula, tendo sido considerado que 10,44% (7/67) dos homens apresentavam uma glândula hipoplásica. Tal achado é inesperado em relação à literatura, já que, por exemplo, em um estudo prévio no Sudeste do Brasil com crianças portadoras de hipotireoidismo congênito, foi elencado que o sexo feminino estaria relacionado à ectopia, mas não à hipoplasia de forma estatisticamente significativa²⁹.

Em relação as alterações tiroeoidianas, destacam-se as deficiências hormonais, dentre as quais, o hipotireoidismo é a mais comum. A definição de hipotireoidismo envolve um estado clínico causado por quantidade insuficiente de hormônios circulantes provenientes da tireoide, não atendendo assim, a função orgânica normal. A forma mais prevalente é a doença

tireoidiana primária, em que a falha ocorre na própria glândula, mas também pode ocorrer em função de disfunção hipotalâmica ou hipofisária (hipotireoidismo central)²⁴. Os efeitos são bastante diversos e variam desde indivíduos assintomáticos até coma com falha multisistêmica, por isso pode ser classificado de acordo com critérios relativos à: idade do início da doença (congenita ou adquirida); o nível de disfunção endócrina responsável (primária ou secundária) e a gravidade (clínico e subclínico)²⁵.

Analisando os resultados obtidos, constata-se que 19 pacientes (11 homens e 8 mulheres) apresentaram elevação do TSH, podendo diagnosticá-los como pacientes com hipotireoidismo subclínico (HSC). Tal resultado é discordante dos achados da literatura que mostra uma prevalência na população geral de 4% a 10%, sendo maior no sexo feminino, em idosos e inversamente proporcional a quantidade de iodo na dieta. Em amostras obtidas no Rio de Janeiro, Brasil, houve prevalência do sexo feminino foi de 12,3% e em mulheres de 70 anos, 19,1%. A importância do diagnóstico e tratamento do hipotireoidismo subclínico deve-se ao fato do número crescente de estudos que associam o HSC com maior risco de doença arterial coronariana e mortalidade²⁶.

Em uma coorte de pacientes cardiopatas congênitos, fica explicitado a importância de tal diagnóstico, visto que pode proporcionar melhor manejo e sobrevida dos pacientes. Mesmo sendo um comum e potencialmente crítico, o hipotireoidismo é frequentemente negligenciado, apesar de ser facilmente detectado por meio de exames laboratoriais. A definição de hipotireoidismo envolve um estado clínico causado por quantidade insuficiente de hormônios circulantes provenientes da tireoide, não atendendo assim, a função orgânica normal. A forma mais prevalente é a doença tireoidiana primária, em que a falha ocorre na própria glândula, mas também pode ocorrer em função de disfunção hipotalâmica ou hipofisária (hipotireoidismo central)²⁴.

A redução da atividade metabólica é marco importante na fisiopatologia da doença, sendo evidenciada por manifestações clínicas clássicas: mialgia, pele seca, unhas quebradiças, artralgia, constipação, cabelos finos, palidez, bradicardia, menorragia, entre outros. Apesar de serem sintomas inespecíficos, outra característica do hipotireoidismo é o depósito de glicosaminoglicanos, levando à macroglossia e ao atraso da fase de relaxamento dos reflexos²⁴. Quando o quadro torna-se mais acentuado, destaca-se o edema periférico particular, constipação, ganho de peso e dispneia. Outras manifestações mais raras, porém de

preocupação considerável abarcam derrame pericárdico, ascite, diminuição na acuidade auditiva e, até mesmo, hipertensão diastólica²⁷.

A suspeita diagnóstica de hipotireoidismo é feita com subsídio nas manifestações clínicas, mas exames laboratoriais são fundamentais para o estabelecimento do diagnóstico, dentre os quais, pode-se apontar a dosagem sérica de hormônio tireoide estimulante (TSH) como padrão ouro para o hipotireoidismo primário²⁷. Numa investigação clínica, ainda é possível encontrar hipotireoidismo subclínico (HSC), definido como elevados níveis séricos de TSH associados a níveis normais de T4 livre. Essa elevação não é comumente acompanhada por manifestações clínicas, apesar de estudos demonstrarem um aumento do risco de doenças cardiovasculares e pior desempenho cardíaco funcional em pacientes com TSH anormalmente elevado²⁴.

Apesar do pouco impacto clínico, o HSC deveria ser investigado rotineiramente em pacientes com CC devido a alta prevalência na população geral 3% a 12%²⁸ e possível associação de CC com doença tireoidiana subclínica não diagnosticada²⁷.

Em relação aos casos estudados no Hospital Santa Izabel, os pacientes em acompanhamento são de cidades do interior o que dificultou a manutenção dos pacientes na pesquisa. Além disso, a falta de dados completos (antropométricos e classificação da cardiopatia congênita) nos prontuários dos pacientes levou a um tamanho amostral reduzido.

Em relação as alterações tireoidianas, houve conformidade em relação à literatura (incidência é de 2:1 no sexo feminino), os resultados trouxeram uma predominância de mulheres com TSH prévio alterado 4F:1M, entretanto, discordantes quanto ao TSH alterado durante a triagem 5M:4M²⁶.

Foram encontrados dois polimorfismos já descritos na literatura. Relatos de literatura demonstram que mutações no *NKX2-5* em várias linhagens heterozigotas tem sido identificadas em pacientes cardiopatas, portadores de defeito atrial com ou sem bloqueio atrioventricular, embora haja registro de outros tipos de CC. Então, o espectro de mutações do *NKX2-5* é bastante variado em relação ao tipo da mutação, posição do aminoácido afetado e impacto previsto na interação proteína-proteína. Sabendo que o *NKX2-5* está relacionado com doenças cardíacas complexas, pode-se inferir que há tipicamente a possibilidade de mutações múltiplas²⁸.

Em um estudo populacional de coorte na República Checa com 170 portadores de hipotireoidismo congênito, sendo 15 cardiopatas congênitos, não foi encontrado nenhuma mutação no gene *NKX2-5*²⁸, bem como em um estudo italiano previamente citado. Há, portanto, a sugestão de que essas variações podem não ser causas da doença, mas possam significar predisposição².

Outro estudo brasileiro, incluindo 27 pacientes, sugere que se inclua em tais questionamentos, mecanismos epigenéticos ou mudanças somáticas como possíveis inativadores do fator de transcrição em questão. Ademais, ainda não há consenso se a mutação do *NKX2-5* são de natureza somática ou em mosaico, visto que há discordância de resultados oriundos de amostras obtidas por diferentes preparos (tecido congelado ou fresco)¹⁷.

Desta forma, observa-se que o espectro de mutações do *NKX2-5* é bastante variado em relação ao tipo da mutação, posição do aminoácido afetado e impacto previsto na interação proteína-proteína. Sabendo que o *NKX2-5* está relacionado com doenças cardíacas complexas, pode-se inferir que há tipicamente a possibilidade de mutações múltiplas¹⁷. Como a patogênese da DT ainda não está elucidada, há a probabilidade da disgenesia tireoidiana ser de origem poligênica e, por isso, de complexo rastreamento nos casos de defeitos dessa via²².

Apesar dos estudos sobre desenvolvimento da organogênese terem sido bastante investigados, sugere-se que há presença de fatores desconhecidos e mecanismos não completamente elucidados envolvidos com o *NKX2-5*. Alguns fatores que em hipótese poderiam interferir são mecanismos epigenéticos ou mudanças somáticas, sugerindo portanto um aprofundamento maior para desvendar quais alterações estariam de fato relacionadas à esse gene¹⁷.

VIII. CONCLUSÕES

1. Ausência de descrição de dados antropométricos e descrição do diagnóstico da cardiopatia congênita nos prontuários do Serviço do Santa Izabel acarretou significativa perda de pacientes para avaliação.
2. A proporção de homens: mulheres no cenário da cardiopatia congênita é discordante do que estabelecido pela literatura, entretanto há concordância quanto ao tipo prevalente de cardiopatia congênita.
3. Em relação as alterações hormonais, o hipotireoidismo subclínico apresentou uma prevalência maior do que a estabelecida pela literatura, assim como a predominância inesperada no sexo masculino.
4. O rastreio dos níveis de TSH e investigação de hipotireoidismo e hipotireoidismo subclínico é crucial para melhor manejo, tratamento e sobrevida do paciente cardiopata congênito, já que esse diagnóstico implica em risco associado com doença arterial crônica e mortalidade, o qual já é aumentado diante da morbidade existente.
5. Quanto ao estudo genético do *NKX2-5*, foram descritos polimorfismos já relatados em literatura, mas ressalta-se a importância de estudos mais aprofundados desse fator de transcrição para desvendar os demais mecanismos genéticos.

IX. SUMMARY

NKX2-5 GENE MUTATION IN PATIENTS WITH CONGENITAL CARDIOPATHY ASSOCIATED WITH MORPHOGENESIS DEFECTS OR THYROIDAL FUNCTION.

Genetic and molecular studies suggest the essential involvement of the NKX2-5 transcription factor in the thyroid and cardiac embryonic development. Mutations in this gene have repercussions on cardiac organogenesis and, possibly, on the thyroid primordium, corroborating the major finding of association of congenital heart disease and Thyroid Dysgenesis. Objectives: Analyzing genetic alterations in the NKX2-5 gene in adult patients with congenital heart disease associated with morphological alterations and / or non-autoimmune thyroid dysfunction. Methodology: Cohort analysis of patients with CC: a) Thyroid ultrasound; B) laboratory tests to evaluate thyroid function and presence of autoimmunity (ATPO and TSH). Determination of weight, height and Body Surface [$SC(m^2) = weight(kg)^{0,425} \times height(cm)^{0,725} \times 71,84 \times 10^{-4}$]. Genetic evaluation: 5 ml of blood for extraction of genomic DNA; Polymerase Chain Reaction (PCR) and direct sequencing of the coding region of the NKX2.5 gene. Ethical aspects: This study is a subproject of "Gene mutation research implicated in thyroid and cardiovascular morphogenesis: a clinical and molecular study in cohorts of patients with thyroid dysgenesis and congenital heart disease" funded by FAPESB (grant term RED 0014/2012) and Approved by the Research Ethics Committee Dr. Celso Figuerôa and by the Research Committee of the Hospital Universitário Professor Edgard Santos.

Keywords: 1. Thyroid; 2. Transcription factor NKX2-5; 3. Congenital heart disease.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramos H, Nesi-França S, Maciel R. Novos aspectos da genética e dos mecanismos moleculares da morfogênese da tiróide para o entendimento da disgenesia tiroídiana. *Arq bras endocrinol metab*; 2008.52/9(1):1403–15p.
2. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, Ferrara AM, Santarpia L, Salvatore D, Chiovato L; Perri A; Moschini L; Fazzini C; Olivieri A; Costa P; Stoppioni V; Baserga M; De Felice M; Sorcini M; Fenzi G; Di Lauro R; Tartaglia M; Macchia PE. Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Apr;91(4):1428–33.
3. Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, Arra C, Mansouri A; Kimura S; Di Lauro R; De Felice M. An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol*. 2004 Dec 15;276(2):464–75.
4. Inzucchi SE, Burrow GN. The thyroid gland and reproduction. Fourth Edition *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*. Fourth Edition. New York; 1999.
5. Fagman H, Nilsson M. Morphogenesis of the thyroid gland. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010 Jul 8; 323(1):35-54.
6. Heery E, Sheehan AM, While AE, Coyne I. Experiences and Outcomes of Transition from Pediatric to Adult Health Care Services for Young People with Congenital Heart Disease: A Systematic Review. *Congenit Heart Dis*. 2015; 10: 413–427.
7. Rosa RC. Malformações Detectadas pelo Ultrassom Abdominal em Crianças com Cardiopatia Congênita, *soc Bras de Cardiol*. 2012; 99 (6):1.100-7.
8. Amorim LFP. Apresentação das cardiopatias congênitas diagnosticadas ao nascimento: análise de 29.770 recém-nascidos. *Jor de Ped. Rio de Janeiro*.2008; 84(1).

9. Wlodarczyk BJ, Palacios AM, Chapa CJ, Zhu H, George TM; Finnell RH. Genetic basis of susceptibility to teratogen induced birth defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2011;157:215-26.
10. Amaral F. Quando suspeitar de cardiopatia congênita no recém-nascido. *Rev de Med. Ribeirão Preto.* 2002 abr-jun;35:192-7.
11. Bertoletti J. Qualidade de vida nas cardiopatias congênitas, sociedade brasileira de cardiologia. *Soc Bras de Cardio.* 2013 set; DOI: 10.5935/abc.20130244.
11. Barbosa T. *Rev de ped do centro hosp do Porto.* 2012;XXI(3).
12. Lopes LM, et al. O Papel do ecocardiograma como método isolado na indicação Cirúrgica de Pacientes Portadores de cardiopatia congênita . *Arq Bras de Card.* 2005 mai; 84(5):381-386.
13. Amorim LFP, Pires CAB, Lana AMA, Campos ÂS, Aguiar RALP, Tibúrcio JD, Siqueira AL, Motta CC, Aguiar MJ. Presentation of congenital heart disease diagnosed at birth: analysis of 29,770 newborn infants. *J Pediatr (Rio J).* 2008 Jan 18;84(1):83–90.
14. Schoen FJ, Richard N, Mitchell. O coração. Patologia. In: Robbins & Contran. *Bases Patológicas das Doenças.* 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2010.545-553.
15. Born D. Cardiopatia congênita. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(6 supl.1):e110-e78.
16. Weismann CG, Gelb BD. The genetics of congenital heart disease: a review of recent developments. *Curr Opin Cardiol.* 2007 May;22(3):200–6.
17. Miyague NI, Cardoso SM, Meyer F, Ultramari FT, Araújo FH, Rozkowisk I, Toschi AP. Epidemiological study of congenital heart defects in children and adolescents. Analysis of 4,538 cases. *Arq Bras Cardiol.* 2003 Mar;80(3):269–78.

18. Cerqueira TLO, Ramos Y, Strappa G, San Martin D, Jesus M, Gonzaga J, Costa A, Fernandes V, Amorim T, Ladeia AM, Ramos H. The c.63A>G polymorphism in the NKX2.5 gene is associated with thyroid hypoplasia in children with thyroid dysgenesis. *Archives of Endocrinology and Metabolism*. On-line version ISSN 2359-4292. Epub Sep 25, 2015.
19. Hermanns P, Grasberger H, Refetoff S, Pohlenz J. Mutations in the NKX2.5 gene and the PAX8 promoter in a girl with thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jun;96(6):E977–81.
20. Alt B, Elsalini OA, Schrupf P, et al. Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. *Development*, v. 133, n. 19, p. 3797–3804, 2006.
21. Gioli-Pereira L, Pereira AC, Mesquita SM, Xavier-Neto J, Lopes AA, Krieger JE. NKX2.5 mutations in patients with non-syndromic congenital heart disease. *Int J Cardiol* 138:261-265.
22. Inga A, Reamon-Buettner SM, Borlak J, Resnick M A. Functional dissection of sequence-specific NKX2-5 DNA binding domain mutations associated with human heart septation defects using a yeast-based system. *Hum Mol Genet*. 2005 Jul 15;14(14):1965–75.
23. Silva MA. Estudo das características clínicas e epidemiológicas de recém-nascidos com cardiopatia congênita em uma maternidade pública da cidade de Salvador [trabalho de conclusão de curso]. Salvador:Universidade Federal da Bahia, Curso de Medicina. 2014.
24. Projeto Diterizes [Internet]. [place unknown]: Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia; 2005-2011. [cited 2016 December 18]. Available from: http://www.projetodiretrizes.org.br/4_volume/17-Hipotireoidismo.pdf
25. Kim YA, Park YJ. Review Article Prevalence and Risk Factors of Subclinical Thyroid Disease. *Endocrinol Metab*. 2014;29(29):20–9.
26. Sgarbi JA, Teixeira PFS, Maciel LMZ, et al. Consenso brasileiro para a abordagem clínica e tratamento do hipotireoidismo subclínico em adultos: recomendações do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. *Arq*

Bras Endocrinol Metab [Internet]. 2013 Apr [cited 2017 Jan 16] ; 57(3): 166-183. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302013000300003&lng=en.

27. Roberts CGP, Ladenson PW. Hypothyroidism. *Lancet*. 2004 Mar 6;363(9411):793–803.

3. Gaitonde DY, Rowley KD, Sweeney LB. Hypothyroidism: an update. *Am Fam Physician*. 2012 Aug 1;86(3):244–51.

28. Brust ES, Beltrão CB, Chammas MC, Watanabe T, Sapienza MT Marui S. Absence of mutations in PAX8, NKX2-5, and TSH receptor genes in patients with thyroid dysgenesis. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2012;56(3):173-7.

29. Ramos HE, Nesi-França S, Boldarine VT, Chiamolera MI, Camacho CP et. al. Clinical and molecular analysis of thyroid hypoplasia: a population-based approach in Southern Brazil. *Thyroid*. 2009; 19:61-8.

XI. ANEXOS

Anexo 01 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Professor Dr. Celso Figueirôa – Hospital Santa Izabel

HIS HOSPITAL SANTA IZABEL
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DA BAHIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
PROF. DR. CELSO FIGUEIRÔA
HOSPITAL SANTA IZABEL

Salvador, 27 de março de 2012

PARECER Nº: 47/2011
CAAE: 0033.0.057.000-11

1. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA: *“Pesquisa de Mutações de Genes Implicados na Morfogênese Tireoideana e Cardiovascular: Estudo Clínico e Molecular em Coortes de Pacientes com Disgenesia Tireoidiana e Cardiopatia Congênita”.*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Anabel Góes Costa
INSTITUIÇÃO: Hospital Santa Izabel
CARGO: Médica

2. PARECER DO CEP

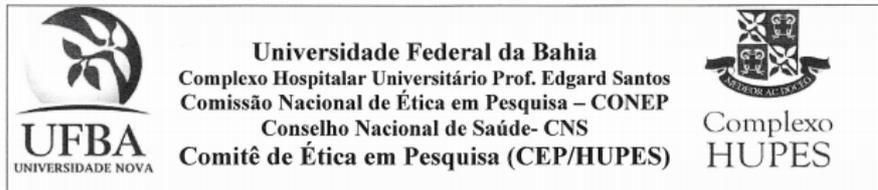
*As respostas referentes as pendências exigidas fornecidas pelo pesquisador responsável pelo protocolo supracitado, foram avaliadas e respondem as dúvidas éticas deste CEP. O Comitê de Ética em Pesquisa Prof. Dr. Celso Figueirôa- Hospital Santa Izabel, acatando o parecer do relator designado para o referido protocolo, em uso de suas atribuições, **aprova** o Projeto de pesquisa supracitado, estando os mesmos de acordo com as Resoluções 196/96 e 251/97.*

Cordialmente,



Prof. Dr. Jelson dos Santos Nascimento
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa Prof. Dr. Celso Figueirôa
Hospital Santa Izabel

**ANEXO 02 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo
Universitário Professor Edgard Santos**



Universidade Federal da Bahia
Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
Conselho Nacional de Saúde- CNS
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/HUPES)

Complexo
HUPES

DECLARAÇÃO

PROTOCOLO CEP/HUPES Nº 125/2011

Declaramos ter lido e concordado com o parecer ético emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa Prof. Dr. Celso Figueirôa Hospital Santa Izabel, através do Parecer Consubstanciado Nº 47/11, tendo como Coordenador Prof. Dr. Jedson dos Santos Nascimento, instituição que aprovou o projeto em 27 de março de 2012. Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como Instituição Co-participante do Projeto intitulado: **Pesquisa de Mutação de genes implicados na morfogênese tireoidiana e cardiovascular: estudo clínico e molecular em coortes de pacientes com disgenesia tireoidiana e cardiopatia congênita**, tendo como pesquisador responsável, Anabel Góes Costa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança.

Situação: APROVADO.

Salvador, 01 de junho de 2012.


Prof. Dr. Roberto Badaró, MD, PhD
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa/HUPES


Prof. Dr. Hugo da Costa Ribeiro Junior
Diretor do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos

Rute Nunes Queiroz
Diretora Adjunta de Serviços Assistenciais
Complexo HUPES / UFBA
Mat. 1186319
Diretora Pro Tempore

Comitê de Ética em Pesquisa- CEP/HUPES
Rua Augusto Viana, s/n - Canela – Salvador – Bahia CEP: 40.110-060
Tel.: (71) 3283-8043 FAX: (71) 3283-8141
E-mail: cep.hupes@gmail.com

ANEXO 03 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – HOSPITAL SANTA ISABEL

Nome do Projeto: “Pesquisa de mutações de genes implicados na morfogênese tireoideana e cardiovascular: estudo clínico e molecular em *coortes* de pacientes com disgenesia tireoidiana e cardiopatia congênita”.

Pesquisador Responsável: **Helton Estrela Ramos:** Coordenador do Projeto – Professor Adjunto do Departamento de Bio-regulação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Pesquisador colaborador do CPqGM – FIOCRUZ-BA.

E-mail para contato: tireoideufba@gmail.com

Anabel Góes Costa: Chefe do Serviço de Cardiopediatria e do Ambulatório de Cardiopatia Congênita em Adultos, Hospital Santa Izabel.

Propósito e Revisão Geral

Você tem um tipo de doença chamada Cardiopatia Congênita, que consiste num defeito de formação ou funcionamento do coração e você está sendo convidado a participar, como voluntário, de um projeto de pesquisa intitulado: “Pesquisa de mutações de genes implicados na morfogênese tireoideana e cardiovascular: estudo clínico e molecular em *coortes* de pacientes com disgenesia tireoidiana e cardiopatia congênita”.

Este projeto irá estudar a base molecular desta doença, a cardiopatia congênita. Estudo molecular significa procurar esclarecer (entender) a causa genética da cardiopatia congênita, ou seja, esclarecer se existe alguma alteração genética que causou a doença. Para isto, será estudado um componente específico, o DNA, que está presente nas células (menor parte do corpo humano, que forma os diversos órgãos, como exemplos de órgãos podem ser citados: o coração, a pele, o olho e o sangue) e que é responsável pelas características de um indivíduo (pessoa), que são transmitidas de pai para filho, desta forma possibilitando que os filhos se assemelhem (sejam parecidos) em algumas características aos pais.

O objetivo desta pesquisa é achar a causa genética (mutações, alterações, mudanças no DNA) da cardiopatia congênita em pacientes acompanhados pelo ambulatório de cardiopatia congênita do Hospital Santa Isabel. A intenção é avaliar clinicamente os pacientes com diagnóstico de cardiopatia congênita que tenham possível alteração genética que causou a doença. Caso você apresente a mutação que será estudada, seus pais serão convidados a

participar do estudo. A pesquisa genética dos pais se faz necessária para o entendimento de que se trata de uma característica hereditária (transmitida, passada de pais para filhos).

A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução Nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. A sua participação ficará limitada a uma coleta de sangue (5 ml) que será utilizado nos estudos genéticos. Você, ao aceitar participar da pesquisa não precisará fazer nenhuma consulta médica. Como em qualquer procedimento de coleta de sangue você poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados à agulhada da coleta de sangue: dor local, mancha roxa, sensação de visão turva, queda da pressão e infecção local. Os riscos que envolvem este procedimento são mínimos e serão devidamente acompanhados pela equipe médica. Estes riscos são os citados acima.

Ao participar da pesquisa você está autorizando o armazenamento de sangue e DNA coletados para a constituição de um Biobanco e Biorepositório segundo a Resolução CNS Nº 441/2011, onde se entende por Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais e Biorepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais. Desta forma, sua participação em estudos futuros fica sob seu critério a possibilidade de optar por: a) necessidade de novo consentimento a cada pesquisa, ou seja, em caso de novo estudo, onde seja necessário a utilização do seu material biológico o pesquisador responsável terá que lhe pedir nova autorização.

Em caso de óbito (morte) ou incapacidade você deverá indicar uma ou mais pessoas que possam consentir na utilização ou descarte do seu material biológico, assim como ter acesso aos resultados obtidos e às devidas orientações; ou, b) manifestação de dispensa de novo consentimento a cada pesquisa. O material coletado será processado, analisado e estocado no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e/ou no Serviço de Genética Médica da Universidade Federal da Bahia situado no Hospital Universitário Edgar Santos (HUPES/UFBA). Em caso de mudança de local você será informado formalmente por meio do Termo de Transferência de Material Biológico (TTMB).

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os integrantes do estudo terão conhecimento dos dados que forem necessários para realização das atividades pertinentes ao desenvolvimento do presente trabalho. Você terá acesso a todas as informações sobre o projeto e seus dados genéticos, assim como, direito de retirar o seu sangue e/ou DNA, do local onde estes se encontram armazenados a qualquer momento. Durante o estudo você poderá ser submetido ao exame Ecocardiograma com Doppler. O Ecocardiograma é um exame auxiliar para o diagnóstico utilizado no estudo do coração, este exame nos mostra defeitos na forma e funcionamento do coração. Este exame não causará dor ou sofrimento a você. Todas as despesas necessárias para a realização do estudo (exames, testes, etc...) não são da sua responsabilidade.

Os benefícios esperados ao entrar na pesquisa são: o diagnóstico da causa da Cardiopatia Congênita podendo influenciar na melhoria do tratamento e adequar o manejo dos pacientes, além de fornecer melhor explicação para o entendimento da causa da doença e do andamento do tratamento. A avaliação genética também pode possibilitar um aconselhamento genético adequado para possíveis futuros filhos. Além disso, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a causa da cardiopatia congênita na Bahia. Gostaríamos ainda de esclarecer que você não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar a participação no estudo, ou se aceitar participar, pode retirar o consentimento e material biológico a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção da continuidade do tratamento do seu tratamento, que está assegurado. As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada (ou seja, seu nome não irá ser divulgado), para que a confidencialidade seja mantida. Os dados genéticos e resultados não ficarão acessíveis ou divulgados a terceiros (outras pessoas).

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Eu recebi uma cópia deste documento, e tenho o direito de negar ou desistir de participar deste estudo em qualquer momento sem qualquer prejuízo para os cuidados a mim dispensados. A PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA É VOLUNTÁRIA.

Eu _____, R.G. _____,
reafirmando que tenho ciência do acima exposto, concordo em participar desse estudo, e estou
ciente que tenho:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros, relacionados com a pesquisa a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo sem que isso traga prejuízo à continuação dos meus cuidados;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
6. O conhecimento de que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

_____, _____ de _____ de 20__

Participante ou Responsável Legal

Pesquisador Responsável

Polegar direito

