

CURSO DE FARMÁCIA

Eliara Fernanda Foletto

**Análise da variabilidade genética do gene *KRAS* em pacientes portadores de
câncer colorretal do Rio Grande do Sul**

Santa Cruz do Sul

2015

Eliara Fernanda Foletto

**Análise da variabilidade genética do gene *KRAS* em pacientes portadores de
câncer colorretal do Rio Grande do Sul**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade de Santa Cruz do Sul
(UNISC) para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lia Gonçalves
Possuelo

Coorientadora: Prof^a Dra. Luciana de
Souza Nunes

Santa Cruz do Sul

2015

AGRADECIMENTOS

Clichê ou não, começo agradecendo a Deus, pois sou uma pessoa de fé e isso foi fundamental para o início e o fim dessa graduação. Com o maior amor do mundo, ao Seu David e a dona Sizinha, meus pais, por me ouvirem, aconselharem e estarem comigo nos momentos mais difíceis até os mais alegres como esse. Só nós três sabemos o amor que sentimos uns pelos outros. São, com certeza, a melhor parte de mim. Às minhas irmãs Eliane e Lenara, sempre presentes, dando força e apoiando e por quem eu guardo os mais belos sentimentos...

Ao meu grupo de pesquisa Augusto, Clairton, Professora Jane Renner, Dr. Inácio, Marina, Sabine. À Valéria Louzada Leal pelo companheirismo e carinho de todos os dias. À Martina Fernanda Gewehr, colaboradora, amiga e companheira, desde a primeira coleta de amostras no hospital até o ponto final do artigo.

Aos meus amigos Luiza Pasa, Rafaela da Silva e Guilherme Arnhold, colegas de faculdade e companheiros desde o início até a realização deste sonho.

À minha professora Dra. Luciana de Souza Nunes pelo companheirismo, os muitos encontros para discussão durante o TC I e pelas horas de bancada durante o TC II, mas, principalmente, por estar comigo e me ajudar e aconselhar neste ano, que foi de muito amadurecimento pessoal. Obrigada Prof. Lu, com você aprendi lições para vida!

E por último, mas não menos importante, agradeço à minha orientadora Dra. Lia Gonçalves Possuelo. Só tenho a dizer que fui condenada a amar a genética para o resto da vida. Minha eterna orientadora (“sora Lia”) que sempre me inspirou como profissional, por estar de mãos dadas comigo durante os quatro anos de iniciação científica, por nunca deixar de acreditar em mim, mesmo parecendo que eu não tinha maturidade suficiente para os desafios da pesquisa. Obrigada Prof. Lia! Graças a você eu vivi os momentos mais felizes da graduação, durante os muitos cursos e congressos em que pude levar nossos trabalhos.

Se em algum momento me esqueci de pronunciar alguém, que se sinta abraçado.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia mais frequente em humanos e os números não param de crescer, sendo um problema grave de saúde pública. O CCR é abordado por muitos pesquisadores, seja por levantamentos epidemiológicos que visem alertar as autoridades de saúde aos estudos genéticos, como aqueles que estudam a farmacogenética e alterações que levam a proliferação de células anormais podendo levar a resistência às terapias com anticorpos monoclonais. *KRAS* é um gene que ganhou muito enfoque na atualidade, devido a mutações pontuais nos éxons 2, 3 e 4 levando a troca de aminoácidos, alterando toda a sequência da proteína Ras. A proteína Ras alterada desta forma não cessa o processo de fosforilação na proliferação, diferenciação e apoptose celular e continua enviando estímulo à via MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) produzindo assim células anormais, ativando os mecanismos da angiogênese e a formação de tumores malignos que podem afetar indivíduos em várias fases da vida. Pesquisas clínicas identificando polimorfismos em *KRAS* têm sido realizadas pelo mundo e se mostraram eficazes na detecção de polimorfismos que direcionam o tratamento de primeira linha para o CCR metastático (CCRm). Este estudo objetivou avaliar a variabilidade genética de polimorfismos no gene *KRAS* em pacientes portadores de CCR tratados em Santa Cruz do Sul e Santa Maria e analisar o perfil epidemiológico da população alvo e correlacionar os achados clínicos com os agentes terapêuticos utilizados. Um total de 09 amostras foram analisadas pelo sequenciamento, sendo 07 (77,8%) de cirurgia e 02 (22,3%) de colonoscopia. Dos indivíduos incluídos na pesquisa 11,1% apresentaram polimorfismo no gene *KRAS* no códon 12 do exon 02. Quanto às características epidemiológicas a média de idade dos pacientes incluídos foi de 62,63 anos variando de 50 a 73 anos e o histórico familiar de CCR foi relatado por 33,3% dos pacientes. Levantamentos epidemiológicos são importantes para identificar fatores de risco e auxiliar em campanhas de saúde pública, percebendo assim os pontos necessários que devem ser abordados, assim como a caracterização genética, já que *KRAS* é capaz de prever com clareza a resposta do paciente ao tratamento. As perspectivas futuras são aumentar o número de amostras, padronizar uma técnica mais barata e com a mesma sensibilidade, além de buscar os tratamentos dos pacientes para correlacionar com os achados genéticos.

Palavras chave: Câncer colorretal, *KRAS*, células aberrantes, anticorpos monoclonais.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in humans and the numbers keep growing, to be a serious public health problem. The CCR is approached by many researchers, either by epidemiological surveys aimed at alerting health authorities to genetic studies, such as those who study the pharmacogenetics and changes that lead to proliferation of aberrant cells may lead to resistance to therapies with monoclonal antibodies. KRAS is a gene that has gained much in focus today, because of point mutations in exons 2, 3 and 4 leading to amino acid exchange, changing the whole sequence of the Ras protein. The modified Ras protein in this way does not stop the phosphorylation process in proliferation, differentiation and apoptosis and keeps sending stimulating MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) thus producing abnormal cells, activating the mechanisms of angiogenesis and the formation of malignant tumors that can affect individuals in different stages of life. Clinical research identifying polymorphisms in KRAS have been held around the world and have proved effective in detecting polymorphisms that direct first-line treatment for metastatic RCC (mRCC). This study aimed to evaluate the genetic variability of polymorphisms in the KRAS gene in RCC patients treated in Santa Cruz do Sul, analyze the epidemiological profile of the target population and to correlate clinical findings with therapeutic agents used. A total of 09 samples were analyzed by sequencing, and 07 (77.8%) of surgery and 02 (22.3%) of colonoscopy. Of individuals included in the survey 11.1% polymorphism in the KRAS gene at codon 12 of exon 02. As to the epidemiological characteristics the average age of the included patients was 62.63 years ranging from 50 to 73 years and a family history of CRC It was reported by 33.3% of patients. Epidemiological surveys are important to identify risk factors and assist in public health campaigns, thus realizing the points needed to be addressed, as well as genetic characterization, as KRAS is able to predict clearly a patient's response to treatment. Future prospects are increasing the number of samples, standardize a cheaper technique and with the same sensitivity, in addition to seeking the treatments of patients to correlate with the genetic findings.

Keywords: Colorectal cancer, KRAS, aberrant cells, monoclonal antibodies

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS	10
3.1 Objetivos gerais.....	10
3.2 Objetivos específicos	10
4. REFERENCIAL TEÓRICO	11
4.1 Carcinogênese	11
4.2 A superfamília das proteínas Ras	11
4.3 <i>KRAS</i>	13
4.4 EGFR o receptor da tirosina quinase	14
4.5 VEGF e a formação de novos vasos.....	15
4.6 Gene <i>BRAF</i> e a importância na terapêutica clínica.....	16
4.7 Biomarcadores preditivos e prognósticos.....	16
4.8 Frequência dos polimorfismos do gene <i>KRAS</i>	17
4.9 Agentes antineoplásicos e tratamento	19
5. ARTIGO CIENTÍFICO	22
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	38
7. REFERÊNCIAS	39
ANEXOS	47

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos inúmeros avanços da medicina os casos de câncer não param de crescer, o relatório mundial do câncer (2014) considerou esta a doença mais prevalente do século. Em 2012 foram relatados 14 milhões de novos casos, com um aumento previsto de 22 milhões para a próxima década, assim como os casos de óbito estão previstos para aumentar de 8,2 milhões por ano para 13 milhões por ano (STEWART et al., 2014).

O câncer é uma patologia que requer um tratamento individualizado, especializado, longo e muito caro, devido á isso tem grande impacto econômico na sociedade. Doença degenerativa que afeta indivíduos em várias fases da vida, é um dos maiores problemas para saúde pública. O baixo nível econômico, a falta de políticas de saúde pública que alertem a população para um diagnóstico precoce, o custo elevado dos exames preventivos e pacientes que não tem informações necessárias sobre os sintomas que a doença causa são fatores determinantes que levam o indivíduo a um diagnóstico tardio de CCR (BRAMBILLA et al.,2012).

Considera-se CCR tumores que evoluem em um segmento do intestino grosso (o cólon) e/ou no reto. Quando ainda não existirem metástases, é curado se diagnosticado precocemente. Algumas lesões originárias de pólipos benignos podem crescer na parede interna do intestino grosso e evoluírem a uma neoplasia maligna. Os exames preventivos como a colonoscopia e o sangue oculto nas fezes continuam sendo a maneira mais eficaz de prevenção. Através destes exames é possível detectar estes pólipos e removê-los antes que se tornem malignos (INCA 2014).

Autoridades internacionais como o *Food and Drug Administration* (FDA) através de ensaios clínicos demonstraram que portadores da forma mutante de *KRAS* não vão se beneficiar de tratamentos que visem o fator de crescimento epidérmico (EGFR), apenas os indivíduos que não possuem a forma mutante podem ser beneficiados (LURKIN et al.,2010).

O gene *KRAS* serve como um biomarcador para CCR sendo que a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) já definiu critérios para direcionar oncologistas em relação ao sequenciamento deste gene. Para o CCR metastático anticorpos como cetuximab e panitumumab são excelentes esquemas terapêuticos

de primeira linha, mas só respondem com sucesso ao tratamento indivíduos portadores do alelo selvagem (ALLEGRA et al., 2009).

KRAS é um dos novos biomarcadores da medicina personalizada e serve para direcionar oncologistas a tratamentos corretos, seguros e que possa evoluir a cura. Um biomarcador prognóstico indica informações de resultado de forma independente ao tratamento. Biomarcadores preditivos que é o caso de *KRAS* indicam à resposta do paciente a determinada terapia, neste caso anticorpos monoclonais, eles são capazes de detectar modificações específicas, como a ativação de alvos moleculares, especificidade, sensibilidade e os efeitos causados por cada droga além de expressar um amplo potencial na seleção de tratamentos individualizados de forma que possam reduzir a toxicidade, os custos e aumentar a sobrevida do paciente (PATEL, KARAPETIS, 2013).

Nas neoplasias malignas *KRAS* é encontrado de duas formas, mutado ou selvagem. Para indivíduos que expressam o genótipo selvagem os tratamentos com os inibidores de EGFR cetuximab (Erbix) ou panitumumab (Vectibix) são considerados de primeira linha. Os indivíduos que expressam um genótipo mutante não se beneficiam deste tipo de terapia (WEBSTER et al., 2013).

O FDA constatou que a associação de quimioterápicos convencionais com anticorpos monoclonais é a combinação ideal para levar o indivíduo a um aumento da sobrevida livre de doença. Estudos revelam que mutações pontuais que ocorrem nos éxons 2, 3 e 4 podem alterar os aminoácidos nos códons 12,13, 61 e 146, portanto indivíduos com genótipo mutante não devem receber terapias monoclonais como parte do tratamento (ALLEGRA et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas o estudo de oncogenes vem ganhando espaço na medicina personalizada é devido a este fato que a sobrevida dos pacientes portadores de CCR tem aumentado significativamente (PEREZ et al.,2013).

Para tornar uma nova terapia eficiente é necessário conhecer as bases moleculares, avaliando as características biológicas de cada indivíduo e através destas pesquisas o gene *KRAS* foi considerado um biomarcador moderno e seguro. A redução da toxicidade e o aumento da sobrevida livre de progressão da doença são os resultados de terapias alvo. Mutações no gene *KRAS* resultam na constante ativação de Ras estimulando a proliferação e a angiogênese (TOL et al., 2010).

Os principais polimorfismos do gene *KRAS* são mutações pontuais nos éxons 2, 3 e 4, estas fazem com que Ras, proteína codificada por *KRAS*, esteja sempre no estado de proliferação, ou seja, no momento que o anticorpo monoclonal se liga ao receptor (EGFR), a proteína Ras não está na conformação favorável para inibição da proliferação e da angiogênese (KUMAR et al., 2014).

Irrinotecano e Fluoracil fazem parte do arsenal de quimioterápicos convencionais para CCR, porém para pacientes com CCR metastático os anticorpos monoclonais cetuximab e panitumumab são considerados aditivos de primeira linha tornando o tratamento de grande eficácia (GATTENLOHNER et al., 2009).

Cada vez mais médicos e cirurgiões solicitam testes moleculares, o que em um futuro muito próximo vai caminhar lado a lado com a localização do tumor e a patologia (tumores bem diferenciados, pobremente diferenciados entre outros), já que os tumores são muito heterogêneos e se necessita de diversas confirmações para um diagnóstico correto e preciso (FENG et al.,2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Análise da variabilidade genética do gene *KRAS* em pacientes portadores de câncer colorretal de um centro de oncologia da região Centro Serra e Vale do Rio Pardo.

3.2 Objetivos específicos

Realizar um levantamento epidemiológico dos pacientes com CCR, incluindo características tumorais e sociodemográficas;

Analisar a frequência dos principais polimorfismos no gene *KRAS*, nos códons 12, 13, 61 e 146 nos éxons 2, 3 e 4;

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Carcinogênese

Quando o sistema fisiológico do indivíduo passar a sofrer agressões, pela proliferação desordenada de células aberrantes, designa-se tumor ou neoplasia. Os defeitos genéticos partem de uma célula precursora que serve como clone para formação do tecido tumoral. Os proto-oncogenes, os genes envolvidos no dano e no reparo de DNA, genes que regulam a apoptose e os genes supressores de tumores são os alvos desta desordem genética. A proliferação de células aberrantes é resultado de um polimorfismo que ocorre em determinados genes, estes genes que induzem a formação de tumores são conhecidos como proto-oncogenes que na forma hiperativa chamamos de oncogenes. A família Ras é formada pelos proto-oncogenes *HRAS*, *NRAS* e *KRAS* (KOOSHYAR et al., 2013).

Uma atividade muito diminuída ou muito aumentada de determinado gene, torna o indivíduo predisposto a desenvolver determinados tipos de câncer. Proto-oncogenes quando mutados se tornam hiperativos sendo então chamados de oncogenes. São conhecidos como genes supressores de tumores, aqueles que perdem a função e levam o indivíduo a malignidade (ALBERTS et al., 2004).

4.2 A superfamília das proteínas Ras

A proteína Ras é reguladora chave no mecanismo celular, tanto na proliferação, quanto na diferenciação e apoptose. Ancorada na superfície interna da membrana plasmática é um dos membros da família das proteínas G, e tem um comprimento de 189 aminoácidos. O desenvolvimento de tumores é atribuído a algumas probabilidades moleculares como a super-expressão do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e mudanças na conformação da proteína, que vão resultar em um aumento de atividade. De todos os casos de neoplasias malignas 45% estão associados à proteína Ras (KOSMIDOU et al., 2014; CHRETIEN et al., 2013; NORMANNO et al., 2009).

Sobre as proteínas G atualmente estão descritos em torno de 50 membros. A comprovação de sinais de forma efetiva ocorre quando a fosforilação de canais iônicos ou enzimas amplificadoras são ativadas. No estado inativo estão no meio intracelular ligadas a receptores, devido a suas propriedades estruturais e funcionais

migram pelo citosol ativando enzimas, assim que receberem um estímulo adequado. O aumento da resposta celular está associado à adenilato ciclase, enzima que está aderida em meio intracelular, que ao ser ativada por uma proteína G catalisa adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (AMPc). A forma ativa é uma troca de GDP por GTP devido ao nucleotídeo guanílico interagir com a subunidade α da proteína G após a formação do grupo ligante/GPCR (MOURA, VIDAL; 2011).

Dois mecanismos iniciam a cascata de fosforilação, no primeiro ocorre a ligação covalente de um grupo fosfato a cadeia lateral de um dos aminoácidos da proteína, essa reação é catalisada por uma proteína quinase e a reação inversa por uma proteína fosfatase, estas reações mudam a conformação da proteína.

O segundo mecanismo é utilizado pelas proteínas Ras para regular sua função, neste caso o fosfato não é diretamente ligado à proteína, uma parte do nucleotídeo GTP se liga a proteína estando à mesma na sua conformação ativa. A perda de um grupo fosfato acontece quando GTP é hidrolisado a GDP numa reação catalisada pela própria proteína, tornando Ras inativa. Quando GTP é hidrolisado a GDP, Ras sofre uma mudança conformacional em seus domínios, ou seja, GTP (GDP + fosfato), causando mudança no sítio de ligação de GTP. A proteína se torna ativa em resposta a sinais extracelulares, como por exemplo, fatores de crescimento (ALBERTS et al., 2004).

Proteínas Ras são GTPases com grande atividade enzimática, que é reduzida nas proteínas codificadas pelos alelos mutantes. Sua mudança de estado quanto à ligação à GTP ou GDP ocorre por ação intrínseca (BOQUETT, FERREIRA, 2010).

A forma inativa e ativa de Ras depende de outras proteínas como é o caso de GAP (GTPase de ativação da proteína) que ligada a Ras induz a hidrólise de GTP a GDP que permanece ligado e o fosfato é liberado. Ras permanece inativa até que encontre um fator de troca de nucleotídeo guanina GEF (adiciona novamente o fosfato removido pela hidrólise de GTP) que se liga a GDP-Ras e libera seu GDP. Com o sítio desocupado é rapidamente preenchido por uma GTP (presente em maior concentração nas células, em relação à GDP) (IVERSEN et al., 2014).

4.3 *KRAS*

O gene *KRAS* (Kirsten ras oncogene) está localizado no braço curto do cromossomo 12 (LURKIN et al., 2010; ROA et al., 2013). Recentemente muitos autores tem se dedicado a estudar este gene, pois polimorfismos no éxon 2, mais especificamente nos códons 12 e 13, no processo de formação da proteína fazem com que o indivíduo não responda as terapias modernas disponíveis para o câncer (LURKIN et al.,2010).

A via Ras/Raf/MEK/ERK é uma das vias mais importantes da sinalização celular. Nas malignidades humanas os genes responsáveis por codificar as proteínas Ras são com frequência os mais alterados é caso de *BRAF*, *NRAS* e *KRAS*. Proteínas Ras agem como GTPases e são de extrema importância na tradução de sinais, elas podem ser conhecidas também por p21 e tem uma massa molecular de 21 kDa. No CCR 40% dos casos estão relacionados à *KRAS*. Um dos polimorfismos mais frequentes ocorre no éxon 2 trocando G/A (guanina/adenina) que na formação da proteína substitui o ácido aspártico por glicina (ROA et al., 2013).

Para terapias anti EGFR, *KRAS* é considerado um excelente biomarcador preditivo, pois define se a terapia irá ou não ser de sucesso, pesquisas clínicas direcionadas a *KRAS* são de extrema importância, pois polimorfismos neste gene especialmente nos códons 12, 13, 61 e 146 dos éxons 2, 3 e 4 são encontrados em torno de 50% dos casos. O fato é que a tirosina quinase continua enviando estímulos para célula produzindo células aberrantes e de forma desordenada (LOPES, CHAMMAS, IYEVASU; 2013).

Na prática oncológica diretrizes clínicas, programas educacionais, e mecanismos moleculares são de fundamental importância para auxiliar os médicos na escolha do tratamento correto. Identificar o paciente com genótipo mutante antes do início do tratamento é essencial já que estes pacientes não vão responder a fármacos como anti EGFR. Medicamentos como cetuximab e panitumumab são de primeira linha para o CCR metastático, sendo assim o sequenciamento de *KRAS* serve de esperança para indivíduos com alelos mutantes, poupando-os de tratamentos ineficazes(HARRIS et. al., 2013).

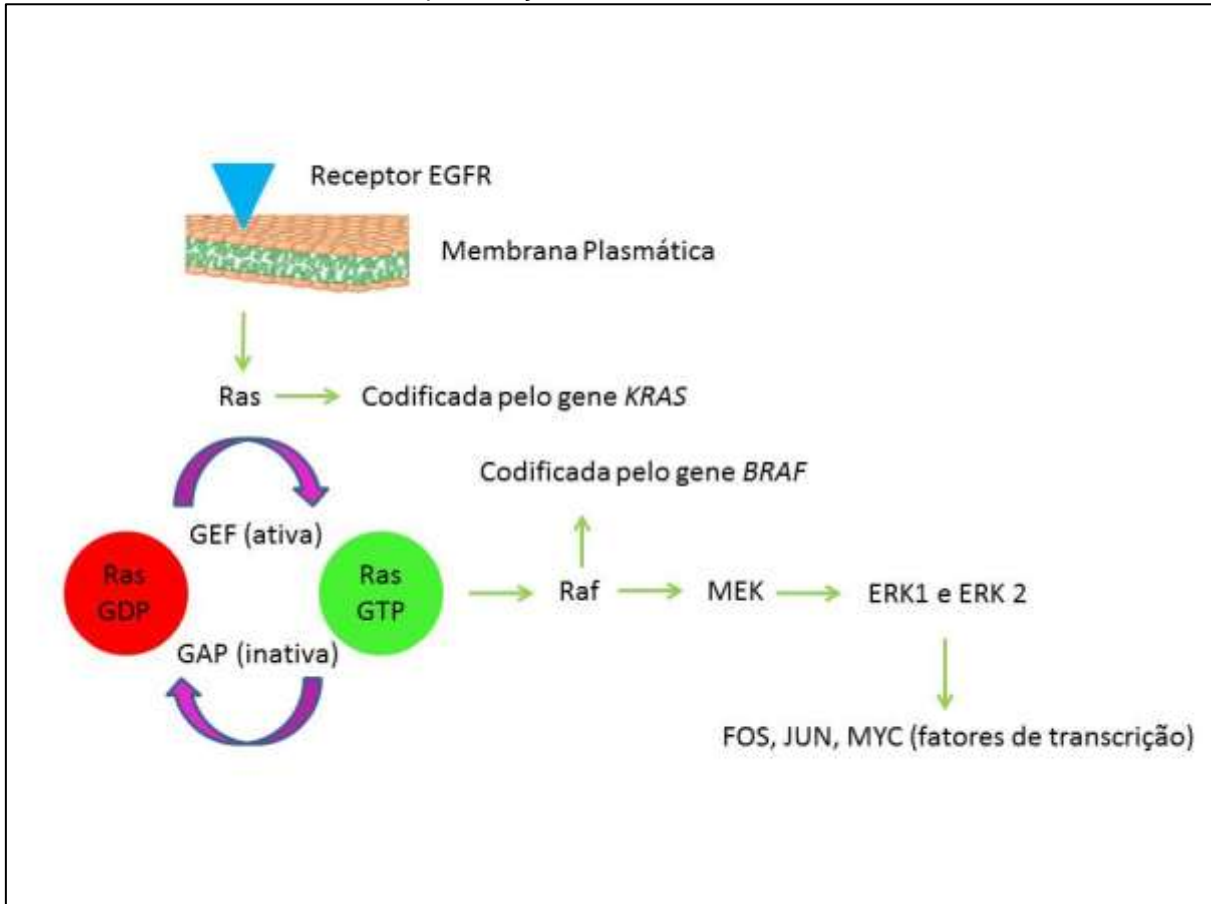
4.4 EGFR o receptor da tirosina quinase

Nas células existem vários tipos de receptores, um deles é o fator de crescimento epidérmico (EGFR) ou receptor de membrana da tirosina quinase produzindo em grande quantidade por células malignas, este receptor é um dos membros da iniciação da via MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*). Os comandos são iniciados quando o mitógeno se liga ao receptor na parte externa da célula, ocasionando a ativação dos receptores e início da sinalização para as proteínas iniciarem a cascata de fosforilação. Com o início da fosforilação cada receptor passa por alterações estruturais e químicas (LOPES, CHAMMAS, IYEYASU; 2013).

A mensagem química do mitógeno é levada para o interior da célula sem a necessidade de incorporação da substância, a qual é traduzida por vias específicas através de moléculas presentes na célula. As proteino-quinases estão presentes na via MAPK de forma ordenada. Ras-GTP estimula Raf que fosforila MEK, e consequentemente fosforila ERK1 e ERK2 (*regulação extracelular*) (Figura 1). ERKs migram até o núcleo celular, ativando os fatores de transcrição FOS, JUN e MYC. A intensa atividade de transcrição gênica e síntese de novas proteínas iniciam-se com a via MAPK que é responsável por transmitir a informação de sinalização que está no mitógeno até o núcleo celular (KNIGHT, IRVING;2014).

Para que a célula mantenha suas características de homeostasia, proliferação, diferenciação e apoptose a via Ras-Raf-MAPK-ERK é o caminho intracelular de suma importância. Quando ocorrem polimorfismos nos genes da família Ras, há uma proliferação desordenada, que impede de codificar as proteínas corretamente, formando tecidos sólidos e resistentes a terapias modernas (MATALLANAS et al., 2011).

Figura 1. O mitógeno liga-se ao receptor EGFR, onde ocorre a sinalização para o interior da célula, as proteínas citoplasmáticas proliferam o sinal, dando início a cascata de fosforilação ativando Ras, Raf, MEK, ERK e os fatores de transcrição. No caso de um polimorfismo o gene codifica a proteína Ras de forma alterada, desta forma Ras continua no estado ativo, com mudança de conformação, tornando a célula resistente e com proliferação desordenada.



Fonte: Adaptado de: GRADY, PRITCHARD, 2014; JEONG, CHA, CHOI, 2014; KNIGHT, IRVING, 2014; MATALLANA et al., 2011.

4.5 VEGF e a formação de novos vasos

O receptor EGFR é o alvo das terapias modernas, porém ainda é importante ressaltar sobre angiogênese e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) mecanismo envolvido na formação de novos vasos. Para que um tumor sólido se forme de fato é necessário que ocorra a neovascularização que propicia a propagação de células malignas. Desta forma já é possível se pensar em inibidores da angiogênese. VEGF é um regulador da neovascularização (angiogênese). A grande incidência de invasão vascular e os tumores agressivos em pacientes com CCR metastático estão associadas a amplificação do locus de VEGF (MESANGE et al., 2014).

As metástases, a sobrevivência e o crescimento assim como a consolidação de um tumor estão diretamente relacionados com VEGF que é abundante em muitas

neoplasias. Existem fármacos como bevacizumab que são anticorpos monoclonais que atuam como mediadores da angiogênese, e foram aprovados pelo FDA, com bases em ensaios clínicos em pacientes portadores do CCRm quando estão em combinação com quimioterápicos convencionais apresentam ótimos resultados (KIM et al.,2014).

A combinação de anticorpos monoclonais anti EGFR e anti VEGF enriqueceram as vastas linhas terapêuticas para portadores de CCR metastático. O tratamento individualizado que parte da testagem clínica dos genes de cada paciente além de diminuir os custos de tratamentos desnecessários, melhora a qualidade do tratamento do paciente levando os indivíduos ao ressecamento total das metástases e aumento da sobrevida livre da doença (CHRETIEN et al.,2013).

4.6 Gene *BRAF* e a importância na terapêutica clínica

A complexidade de uma célula não é difícil de modo que não possamos entendê-la. *KRAS* codifica a proteína Ras e *BRAF* codifica a proteína Raf (SHEN et al.,2013).

BRAF é um gene que faz parte da cascata de proliferação da família RAS e vem ganhando espaço nos testes genéticos, apesar da baixa frequência de 5 a 10% nos casos de CCR, se o individuo apresentar alelos mutantes para *BRAF* será resistente às terapias monoclonais assim como *KRAS*. Aproximadamente 90% das mutações *BRAF* é uma troca de T>A (timina por adenina) na posição 1.799, este polimorfismo está localizado no éxon 15 e resulta na alteração do aminoácido 600 que substitui uma glutamina por uma valina (V600E) (HERNOWO et al., 2014).

4.7 Biomarcadores preditivos e prognósticos

Na prática da oncologia atual é muito importante avaliar os genes que são preditivos e prognósticos ao tratamento de cada paciente. Os marcadores preditivos indicam se o tratamento vai ou não ser eficaz para determinado individuo, já os marcadores prognósticos indicam um resultado melhor ou pior independente do tratamento. A ampla variação genética favorece a carcinogênese abrangendo uma ampla variedade de funções celulares. *KRAS* é considerado um biomarcador preditivo negativo, pois portadores deste tipo de alelo não responderão aos tratamentos anti EGFR. *BRAF* um biomarcador preditivo vem evoluindo como um

biomarcador prognóstico capaz de identificar tumores que são sensíveis a determinadas terapias. A oncologia moderna pertence a tratamentos individualizados e pesquisas estão em constante desenvolvimento em todo mundo com base em padrões moleculares (ROSE-JAMES, TT;2012).

Robusto e seguro *KRAS* é biomarcador capaz de direcionar oncologistas e pacientes. Ainda é importante ressaltar que o diagnóstico precoce e a classificação TNM não podem de forma alguma serem deixados de lado (GRADY,PRITCHARD;2014).

4.8 Frequência dos polimorfismos do gene *KRAS*

Mutações nos códons 61 e 146 são descritas, mas somente as mutações nos códons 12 e 13 são claramente preditivas a terapias com cetuximab e panitumumab. Em pacientes com CCR que irão utilizar a terapia anti-EGFR é obrigatória a testagem de *KRAS* (Chretien et al., 2013). Na tabela 1 é possível observar a frequência dos polimorfismos em *KRAS* no mundo.

Está comprovado na literatura científica que associar o panitumumab a esquemas como FOLFIRI (ácido folínico com fluoracil e irinotecano, infusão em bolus e contínua) ou FOLFOX (ácido folínico, 5 fluoracil e oxaliplatina, infusão em bolus e contínua) aumenta a sobrevida global a deixa o paciente livre de progressão (PEETERS et al., 2013).

Tabela 1. Frequência geral de polimorfismos *KRAS* em diversas partes do mundo.

Mutação	Frequência	Referência
<i>KRAS</i> codon12/13	11/46 (23,9%)	Shao et al. (2007), Japão
<i>KRAS</i> codon12/13	48/181 (26, 5%)	Wu et al. (2005), Taiwan
<i>KRAS</i> codon12/13	30/100 (30%)	Calistri et al. (2005), Itália
<i>KRAS</i> codon12/13	42/126 (33%)	Edkins et al. (2006), Hong Kong
<i>KRAS</i> codon12/13	61/94 (64%)	Edkins et al. (2006), EUA

Fonte: KOSMIDOU, et al., 2014.

As pesquisas atuais para o CCR estão direcionadas a desvendar os proto-oncogenes a os polimorfismos da via Ras. Roa e colaboradores (2013) realizaram um estudo em população chilena com 109 pacientes e avaliaram as principais mutações nos códons 12 e 13. Destes 109 pacientes, 46 apresentaram teste positivo para *KRAS*. As mutações mais frequentes foram: códon 12; a troca de glicina por aspartato em 39,1%, glicina por valina em 24,2%, glicina por serina em 6,5%, glicina por alanina em 4,3%, glicina por cisteína em 4,3% e glicina por arginina em 2,1%.

No códon 13 a troca mais frequente foi glicina por aspartato em 19,5%. Mutações em *KRAS* vem sendo frequentemente observados também em câncer de pulmão (30%), cólon (40%), pâncreas (80%), e tireoide (55%). Apesar da alta prevalência dos polimorfismos nos codons 12 e 13 é importante analisar também os códons 61 e 146 para que a análise se torne mais completa.

Chretien e colaboradores (2013) descreveram que estudos sobre *KRAS* vêm ganhando espaço, visto que mutações neste gene estão relacionadas com a resistência a anticorpos monoclonais e formação de neoplasias. Na tabela 2 é possível observar os polimorfismos mais frequentes nos códons 12 e 13 assim como a alteração de aminoácido causada na proteína.

Tabela 2. Principais alterações no éxon e troca de aminoácidos, nos códons 12 e 13; onde se encontram os principais polimorfismos no gene *KRAS*.

Códons	Polimorfismo	Alteração na proteína
12	c.35G>A	p.G12D
12	c.35G>T	p.G12V
12	c.34G>T	p.G12C
12	c.34G>A	p.G12S
12	c.35G>C	p.G12A
12	c.34G>C	p.G12R
13	c.38G>A	p.G13D

Fonte: KOSMIDOU et al., 2014; CHRETIEN et al., 2013; NORMANNO et al., 2009

Em um estudo realizado com pacientes chineses em Hong Kong com 1.506 pacientes 670 (44,5%) foram diagnosticados com mutações *KRAS*, sendo que as frequências foram códon 12 (75,1%) códon 13 (19,3%) códon 61 (2,5%) e códon 146 (2,7%). A taxa de mutação é maior em mulheres (48%, 296/617) do que em homens (42,1%, 374/889) (TONG et al., 2014).

Shen e colaboradores (2013) realizaram um estudo em uma população chinesa com 676 pacientes que realizaram cirurgia para retirada de tumor de CCR tratados na Academia Chinesa de Ciências Médicas (Pequim, China) entre agosto de 2010 e dezembro de 2011. Entre os indivíduos estudados, 35,9% (242/674) abrigavam uma mutação *KRAS*, 25,7% (173/674) no códon 12, 6,8% (46/674) no códon 13, e 2,1% (14/672), no códon 61. A ordem correspondente para a frequência de polimorfismos no códon 12 do *KRAS* foi G12D, G12V, G12A, G12C, G12S e

G12R; para o códon 13, a mutação mais frequente foi G13D, seguido por G13C e G13S. O principal polimorfismo no códon 61 foi Q61H, Q61L e Q61R. Mutações *KRAS*, aparecem mais frequentemente em mulheres do que homens e em pacientes com mais de 60 anos.

4.9 Agentes antineoplásicos e tratamento

Nos últimos anos drogas citotóxicas como oxaliplatina, fluoropirimidinas e irrinotecano foram adicionados ao arsenal de quimioterápicos contra o CCR. Sendo assim combinações como 5 FU/LV (5 fluoracil com ácido folínico), FOLFIRI (ácido folínico com fluoracil e irrinotecano, infusão em bolus e contínua), FOLFOX (ácido folínico, 5 fluoracil e oxaliplatina, infusão em bolus e contínua) IFL (5 fluoracil, ácido folínico e irrinotecano, bolus) FLOX (5 fluoracil, ácido folínico e oxaliplatina) tem sido amplamente utilizadas e com ótimos resultados. Mas os oncologistas vêm buscando novos caminhos, ou seja, atingir o alvo sem prejudicar outras vias, diminuindo custos e toxicidade. Desta forma surgem os medicamentos monoclonais, drogas com um mecanismo de ação baseado em uma interação do anticorpo com o epitopo (GRAVALOS et al.,2010).

As novas opções da terapêutica são inibidores de EGFR cetuximab e panitumumab, esses anticorpos monoclonais são capazes de inibir EGFR através de uma ligação no domínio extracelular de EGFR.

Vectibix® ou panitumumab é uma imunoglobulina humana recombinante G (IgG), que se liga de forma específica ao domínio extracelular do EGFR em células normais e malignas. Com um massa molecular de 14 kDa inibe de forma competitiva a ligação de ligandos à EGFR. Este fármaco monoclonal se torna resistente pelo fato de agir apenas em proteínas que não sejam mutadas, ou seja, que não tenham mudado de conformação. Além de impedir a união de dois monômeros, autofosforilação de EGFR e ativação dos sinais o que vai resultar em inibição da proliferação, diferenciação e favorecimento da apoptose (GRAVALOS et al.,2010).

Como já esta descrito amplamente na literatura, nas neoplasias de intestino, mama e pulmão os componentes da tirosina quinase levam EGFR a uma super-expressão, devido a isso as terapias anti EGFR associadas a anti VEGF ou a fármacos tradicionais tem-se mostrado de grande sucesso na sobrevida global livre da

doença. Os novos anticorpos monoclonais ligam-se ao domínio extracelular da tirosina quinase agindo na sinalização celular (MAHIPAL, KOTHARI, GUPTA; 2014).

A combinação de cetuximab com irinotecano tem mostrado uma sobrevida livre de progressão significativa, porém este efeito não é observado em pacientes com *KRAS* mutante, podendo até ser prejudicial. Um estudo de fase III realizado com o panitumumab mostrou que estes pacientes tiveram uma sobrevida livre da doença muito significativa e estes resultados levaram o FDA a aprovar em 2006 este anticorpo como tratamento de primeira linha para o CCR (MAHIPAL, KOTHARI, GUPTA; 2014).

Barone e colaboradores (2014) descrevem o *KRAS* como principal biomarcador de resistência a anticorpos monoclonais anti-EGFR. Para as diretrizes atuais *KRAS* é o passo mais importante na tomada de decisão para o início de tratamento de pacientes com CCR metastático. Porém o acesso restrito ao sequenciamento deste gene traz consequências muito negativas aos pacientes diminuindo assim taxa de sobrevida, impedindo que o paciente evolua a cura. Estudos mostram que o cetuximab é medicamento de primeira linha para CCR e que combinações do tipo FOLFIRI e FOLFOX é mais satisfatório do que as alternativas disponíveis atualmente na primeira linha (bevacizumab + FOLFOX, FOLFIRI), portanto cetuximab é um esquema terapêutico excelente se o paciente não apresentar polimorfismo *KRAS*. O significado clínico das mutações *KRAS* já está claro; mutações nos códons 12 e 13 conferem resistência ao EGFR. Autoridades da Europa, Estados Unidos e Japão tornaram o teste obrigatório para portadores de CCR. No Japão um Kit multiplex para *KRAS* que detecta 7 mutações nos códons 12 e 13 foi aprovado para testes *in vitro*. Recentemente desenvolveu-se outro que detecta 36 mutações nos códons 61 e 146.

Para que a análise molecular contemple todos os parâmetros as células tumorais circulantes (CTC) seriam o próximo passo, pois oferecem novas perspectivas a fim de obter um bom prognóstico e orientar médicos e pacientes. Seu uso clínico é muito atraente especialmente por detectarem cedo um pior prognóstico. A plataforma de pesquisa para este tipo de célula (Veridex LLC, NJ, USA), foi aprovada pelo FDA em 2004 para câncer de mama, 2007 para colorretal e 2008 para câncer de próstata. Porém ainda existem muitas dificuldades como a incapacidade de detectar as células não epiteliais. Foi proposto que para cada 100 gramas de tumor 3,3 gramas podem estar na corrente sanguínea. Estes

biomarcadores exigem mais estudos para que sua utilidade clínica seja completamente elucidada (LIM et al., 2014).

5. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “*Análise da variabilidade genética do gene KRAS em pacientes portadores de câncer colorretal do Rio Grande do Sul*” será encaminhado para publicação na Revista Brasileira de Coloproctologia (ISSN 0101-9880: versão impressa e ISSN 1980-5446: versão online) (Anexo 8). O método, resultados, discussão e conclusão serão apresentadas no artigo.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Levantamentos epidemiológicos são importantes para identificar fatores de risco e auxiliar em campanhas de saúde pública, percebendo assim os pontos necessários que devem ser abordados, assim como a caracterização genética, já que *KRAS* é capaz de prever com clareza a resposta do paciente ao tratamento.

As perspectivas futuras são aumentar o número de amostras, padronizar uma técnica mais barata e com a mesma sensibilidade, além de buscar os tratamentos dos pacientes para correlacionar com os achados genéticos.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et. al. **Biologia Molecular da Célula**. 4° ed. Porto Alegre. Editora Artmed, 2004.

ALLEGRA, C. J.; JESSUP, J. M.; SOMERFIELD, M. R.; HAMILTON, S. R.; HAMMOND, E. H.; HAYES, D. F.; MCALLISTER, P. K.; MORTON, R. F.; SCHILSKY, R. L. American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion: Testing for KRAS Gene Mutations in Patients With Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti–Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 12, p. 2091-2096, 2009.

AL-SHAMSI, H. O.; ALHAZZANI, W.; WOLFF, R. A. Extended RAS testing in metastatic colorectal cancer-Refining the predictive molecular biomarkers. **J Gastrointest Oncol**, v. 6, n. 3, p. 314-321, 2015.

BARONE, C.; PINTO, C.; NORMANNO, N.; CAPUSSOTTI, L.; COGNETTI, F.; FALCONE, A.; MANTOVANI, L. KRAS early testing: consensus initiative and cost-effectiveness evaluation for metastatic colorectal patients in an Italian setting. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e85897, 2014.

BOLTON, L.; REIMAN, A.; LUCAS, K.; TIMMS, J.; CREE, I. A. KRAS mutation analysis by PCR: a comparison of two methods. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0115672, 2015.

Boquett J. A; Ferreira R. J; Aspectos biológicos e atividade tumorigênica da família proto-oncogênica Ras. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 201-211, 2010.

BRAMBILLA, E.; PONTE, M. D.; RUSCHEL, L. G.; BOSI, H. R.; BRAGA, G. L. D.; SILVA, P. G. D. Staging of colorectal cancer in the private service versus Brazilian National Public Health System: what has changed after five years? **Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)**, v. 32, n., p. 144-147, 2012.

CAUNT, C. J.; SALE, M. J.; SMITH, P. D.; COOK, S. J. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. **Nat Rev Cancer**, v. 15, n. 10, p. 577-592, 2015.

CHRETIEN, A. S.; HARLE, A.; MEYER-LEFEBVRE, M.; ROUYER, M.; HUSSON, M.; RAMACCI, C.; HARTER, V.; GENIN, P.; LEROUX, A.; MERLIN, J. L. Optimization of routine *KRAS* mutation PCR-based testing procedure for rational individualized first-line-targeted therapy selection in metastatic colorectal cancer. **Cancer Med**, v. 2, n. 1, p. 11-20, 2013

DO, H.; KRYPUY, M.; MITCHELL, P. L.; FOX, S. B.; DOBROVIC, A. High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. **BMC Cancer**, v. 8, n., p. 142, 2008.

FENG, Q. Y.; WEI, Y.; CHEN, J. W.; CHANG, W. J.; YE, L. C.; ZHU, D. X.; XU, J. M. Anti-EGFR and anti-VEGF agents: important targeted therapies of colorectal liver metastases. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 15, p. 4263-4275, 2014.

FOULKES, W. D.; KNOPPERS, B. M.; TURNBULL, C. Population genetic testing for cancer susceptibility: founder mutations to genomes. **Nat Rev Clin Oncol**, v., n., p., 2015.

GATTENLOHNER, S.; ETSCHMANN, B.; KUNZMANN, V.; THALHEIMER, A.; HACK, M.; KLEBER, G.; EINSELE, H.; GERMER, C.; MULLER-HERMELINK, H. K. Concordance of KRAS/BRAF Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer before and after Anti-EGFR Therapy. **J Oncol**, v. 2009, n., p. 831626, 2009.

GONG, B.; LIU, W. W.; NIE, W. J.; LI, D. F.; XIE, Z. J.; LIU, C.; LIU, Y. H.; MEI, P.; LI, Z. J. MiR-21/RASA1 axis affects malignancy of colon cancer cells via RAS pathways. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 5, p. 1488-1497, 2015.

GRADY, W. M.; PRITCHARD, C. C. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. **Toxicol Pathol**, v. 42, n. 1, p. 124-139, 2014.

GRAVALOS, C.; CASSINELLO, J; GARCIA-ALFONSO, P.; JIMENO, A. Integration of panitumumab into the treatment of colorectal cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 74, n. 1, p. 16-26, 2010.

HARRIS, J. N.; LILJESTRAND, P.; ALEXANDER, G. L.; GODDARD, K. A.; KAUFFMAN, T.; KOLEVSKA, T.; MCCARTY, C.; O'NEILL, S.; PAWLOSKI, P.; RAHM, A.; WILLIAMS, A.; SOMKIN, C. P. Oncologists' attitudes toward *KRAS* testing: a multisite study. **Cancer Med**, v. 2, n. 6, p. 881-888, 2013.

HECHT, J. R.; DOUILLARD, J. Y.; SCHWARTZBERG, L.; GROTHEY, A.; KOPETZ, S.; RONG, A.; OLINER, K. S.; SIDHU, R. Extended RAS analysis for anti-epidermal growth factor therapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Cancer Treat Rev**, v. 41, n. 8, p. 653-659, 2015.

HERNOWO, B. S.; ARIYANNI, F.; SURYANTI, S.; HASSAN, A. H. Use of *BRAF* V600E as a Molecular Marker in Aggressive Colorectal Cancer. **Acta Med Indones**, v. 46, n. 2, p. 104-110, 2014.

IMAMURA, Y.; LOCHHEAD, P.; YAMAUCHI, M.; KUCHIBA, A.; QIAN, Z. R.; LIAO, X.; NISHIHARA, R.; JUNG, S.; WU, K.; NOSHO, K.; WANG, Y. E.; PENG, S.; BASS, A. J.; HAIGIS, K. M.; MEYERHARDT, J. A.; CHAN, A. T.; FUCHS, C. S.; OGINO, S. Analyses of clinicopathological, molecular, and prognostic associations of *KRAS* codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review. **Mol Cancer**, v. 13, n., p. 135, 2014.

Instituto Nacional do Câncer – INCA (Acesso 08/08/2014; Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao+>).

Instituto Nacional do Câncer – INCA (Acesso em 9/09/2014 Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54).

IVERSEN, L.; TU, H. L.; LIN, W. C.; CHRISTENSEN, S. M.; ABEL, S. M.; IWIG, J.; WU, H. J.; GUREASKO, J.; RHODES, C.; PETIT, R. S.; HANSEN, S. D.; THILL, P.; YU, C. H.; STAMOU, D.; CHAKRABORTY, A. K.; KURIYAN, J.; GROVES, J. T. Molecular kinetics. Ras activation by SOS: allosteric regulation by altered fluctuation dynamics. **Science**, v. 345, n. 6192, p. 50-54, 2014.

JEONG, W. J.; CHA, P. H.; CHOI, K. Y. Strategies to overcome resistance to epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy in metastatic colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 29, p. 9862-9871, 2014.

KIM, S. T.; PARK, K. H.; SHIN, S. W.; KIM, Y. H. Dose *KRAS* Mutation Status Effect on the Effect of VEGF Therapy in Metastatic Colon Cancer Patients? **Cancer Res Treat**, v. 46, n. 1, p. 48-54, 2014.

KNIGHT, T.; IRVING, J. A. Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. **Front Oncol**, v. 4, n., p. 160, 2014.

KOOSHYAR, M. M.; AYATOLLAHI, H.; KERAMATI, M. R.; SADEGHIAN, M. H.; MIRI, M.; SHEIKHI, M. Lack of *KRAS* gene mutations in chronic myeloid leukemia in Iran. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 11, p. 6653-6656, 2013.

KOSMIDOU, V.; OIKONOMOU, E.; VLASSI, M.; AVLONITIS, S.; KATSELI, A.; TSIPRAS, I.; MOURTZOUKOU, D.; KONTOGEORGOS, G.; ZOGRAFOS, G.; PINTZAS, A. Tumor heterogeneity revealed by *KRAS*, *BRAF*, and *PIK3CA* pyrosequencing: *KRAS* and *PIK3CA* intratumor mutation profile differences and their therapeutic implications. **Hum Mutat**, v. 35, n. 3, p. 329-340, 2014.

KUMAR, S. S.; PRICE, T. J.; MOHYIELDIN, O.; BORG, M.; TOWNSEND, A.; HARDINGHAM, J. E. *KRAS* G13D Mutation and Sensitivity to Cetuximab or Panitumumab in a Colorectal Cancer Cell Line Model. **Gastrointest Cancer Res**, v. 7, n. 1, p. 23-26, 2014.

LI, W.; QIU, T.; ZHI, W.; SHI, S.; ZOU, S.; LING, Y.; SHAN, L.; YING, J.; LU, N. Colorectal carcinomas with KRAS codon 12 mutation are associated with more advanced tumor stages. **BMC Cancer**, v. 15, n., p. 340, 2015.

LIM, S. H.; BECKER, T. M.; CHUA, W.; CAIXEIRO, N. J.; NG, W. L.; KIENZLE, N.; TOGNELA, A.; LUMBA, S.; RASKO, J. E.; DE SOUZA, P.; SPRING, K. J. Circulating tumour cells and circulating free nucleic acid as prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. **Cancer Lett**, v. 346, n. 1, p. 24-33, 2014.

LURKIN, I.; STOEHR, R.; HURST, C. D.; VAN TILBORG, A. A.; KNOWLES, M. A.; HARTMANN, A.; ZWARTHOFF, E. C. Two multiplex assays that simultaneously identify 22 possible mutation sites in the *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* and *PIK3CA* genes. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8802, 2010.

Lopes A; Chammas R; Iyeyasu H. **Oncologia para a Graduação**. 3° ed. São Paulo. Editora Lemar, 2013.

MAHIPAL, A.; KOTHARI, N.; GUPTA, S. Epidermal growth factor receptor inhibitors: coming of age. **Cancer Control**, v. 21, n. 1, p. 74-79, 2014.

MATALLANAS, D.; BIRTWISTLE, M.; ROMANO, D.; ZEBISCH, A.; RAUCH, J.; VON KRIEGSHEIM, A.; KOLCH, W. Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. **Genes Cancer**, v. 2, n. 3, p. 232-260, 2011.

MESANGE, P.; POINDESSOUS, V.; SABBAH, M.; ESCARGUEIL, A. E.; DE GRAMONT, A.; LARSEN, A. K. Intrinsic bevacizumab resistance is associated with prolonged activation of autocrine VEGF signaling and hypoxia tolerance in colorectal cancer cells and can be overcome by nintedanib, a small molecule angiokinase inhibitor. **Oncotarget**, v. 5, n. 13, p. 4709-4721, 2014.

MOHAMED SUHAIMI, N. A.; FOONG, Y. M.; LEE, D. Y.; PHYO, W. M.; CIMA, I.; LEE, E. X.; GOH, W. L.; LIM, W. Y.; CHIA, K. S.; KONG, S. L.; GONG, M.; LIM, B.; HILLMER, A. M.; KOH, P. K.; YING, J. Y.; TAN, M. H. Non-invasive sensitive

detection of KRAS and BRAF mutation in circulating tumor cells of colorectal cancer patients. **Mol Oncol**, v. 9, n. 4, p. 850-860, 2015.

MOURA, M. M.; CAVACO, B. M.; LEITE, V. RAS proto-oncogene in medullary thyroid carcinoma. **Endocr Relat Cancer**, v. 22, n. 5, p. R235-252, 2015.

Moura, R. P; Vidal, F. A. P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. *Scientia Medica*, v. 21, n. 1, p. 31-36; 2011.

NAN, X.; TAMGUNEY, T. M.; COLLISSON, E. A.; LIN, L. J.; PITT, C.; GALEAS, J.; LEWIS, S.; GRAY, J. W.; MCCORMICK, F.; CHU, S. Ras-GTP dimers activate the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 26, p. 7996-8001, 2015.

NORMANNO, N.; TEJPAR, S.; MORGILLO, F.; DE LUCA, A.; VAN CUTSEM, E.; CIARDIELLO, F. Implications for *KRAS* status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 6, n. 9, p. 519-527, 2009.

PATEL, G. S.; KARAPETIS, C. S. Personalized treatment for advanced colorectal cancer: *KRAS* and beyond. **Cancer Manag Res**, v. 5, n., p. 387-400, 2013

PEETERS, M.; DOUILLARD, J. Y; VAN CUTSEM, E; SIENA, S.; ZHANG, K.; WILLIAMS, R.; WIEZOREK, J. Mutant *KRAS* codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 6, p. 759-765, 2013.

PEREZ, K.; WALSH, R.; BRILLIANT, K.; NOBLE, L.; YAKIREVICH, E.; BREESE, V.; JACKSON, C.; CHATTERJEE, D.; PRICOLO, V.; ROTH, L.; SHAH, N.; CATALDO, T.; SAFRAN, H.; HIXSON, D.; QUESENBERRY, P. Heterogeneity of colorectal cancer (CRC) in reference to *KRAS* proto-oncogene utilizing WAVE technology. **Exp Mol Pathol**, v. 95, n. 1, p. 74-82, 2013.

ROA, I.; SANCHEZ, T.; MAJLIS, A.; SCHALPER, K. [*KRAS* gene mutation in colorectal cancer]. **Rev Med Chil**, v. 141, n. 9, p. 1166-1172, 2013.

ROSE-JAMES, A.; TT, S. Molecular Markers with Predictive and Prognostic Relevance in Lung Cancer. **Lung Cancer International**, v. 2012, n., p. 12, 2012.

SCHOEN, R. E.; RAZZAK, A.; YU, K. J.; BERNDT, S. I.; FURL, K.; RILEY, T. L.; PINSKY, P. F. Incidence and Mortality of Colorectal Cancer in Individuals With a Family History of Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1438-1445 e1431, 2015.

SHEN, Y; WANG, J; HAN, X; YANG, H.; WANG, S.; LIN, D; SHI, Y. Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: the genetic profiling of *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *NRAS* mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81628, 2013.

STEWART BW, Wild CP, editors (2014). *World Cancer Report 2014*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

TOL, J.; DIJKSTRA, J. R.; VINK-BORGER, M. E.; NAGTEGAAL, I. D.; PUNT, C. J.; VAN KRIEKEN, J. H.; LIGTENBERG, M. J. High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of *KRAS* mutations in colorectal cancer tissue. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 8, p. 2122-2131, 2010.

TONG, J. H.; LUNG, R. W.; SIN, F. M.; LAW, P. P.; KANG, W.; CHAN, A. W.; MA, B. B.; MAK, T. W.; NG, S. S.; TO, K. F. Characterization of rare transforming *KRAS* mutations in sporadic colorectal cancer. **Cancer Biol Ther**, v. 15, n. 6, p. 768-776, 2014.

TOST, J.; SCHATZ, P.; SCHUSTER, M.; BERLIN, K.; GUT, I. G. Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 9, p. e50, 2003.

VIEIRA, F. M. D. A. C.; SENA, V. O. D. Câncer colorretal metastático: papel atual dos anticorpos monoclonais e a individualização de seu uso. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 22, n., p. 45-49, 2009.

WEBSTER, J.; KAUFFMAN, T. L.; FEIGELSON, H. S.; PAWLOSKI, P. A.; ONITILO, A. A.; POTOSKY, A. L.; CROSS, D.; MEIER, P. R.; MIRABEDI, A. S.; DELATE, T.; DAIDA, Y.; WILLIAMS, A. E.; ALEXANDER, G. L.; MCCARTY, C. A.; HONDA, S.; KUSHI, L. H.; GODDARD, K. A. *KRAS* testing and epidermal growth factor receptor inhibitor treatment for colorectal cancer in community settings. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 22, n. 1, p. 91-101, 2013.

YOSHINO, T.; MURO, K.; YAMAGUCHI, K.; NISHINA, T.; DENDA, T.; KUDO, T.; OKAMOTO, W.; TANIGUCHI, H.; AKAGI, K.; KAJIWARA, T.; HIRONAKA, S.; SATOH, T. Clinical Validation of a Multiplex Kit for RAS Mutations in Colorectal Cancer: Results of the RASKET (RAS KEy Testing) Prospective, Multicenter Study. **EBioMedicine**, v. 2, n. 4, p. 317-323, 2015.

ANEXOS

Anexo 1. Questionário

Material colhido de () Cirurgia () Colonoscopia

Colonoscopia/ cirurgia:

1. Número do paciente: _____
2. Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____
3. Médico oncologista: _____
4. Médico cirurgião: _____
5. Cidade de residência do paciente: _____
6. Gênero: (1) feminino (2) masculino
7. Histórico familiar de CCR: () Sim () Não
Se sim qual o parentesco: _____
8. Cor da pele: (1) Branca (2) Não branco
9. Data da primeira consulta médica: _____
10. Patologia: (1) bem diferenciado (2) moderadamente diferenciado (3)
pobremente diferenciado (4) não diferenciado (5) não disponível

Somente se material de cirurgia:

11. Se houver tumor qual é o sitio de tumor primário: (1) cólon (2) reto (3) não disponível
12. Data da cirurgia para retirada do tumor: _____
13. Linfonodos regionais: (1) Sim (2) Não (3) não disponível
14. Metástase no diagnóstico (1) sim (2) não (3) sem informação
15. Localização das metástases: _____
16. Estadiamento: (1) I (2) II (3) III (4) IV

Se quimioterapia:

17. Esquema terapêutico de primeira linha recebido:

Anticorpos Monoclonais () Sim () Não Qual

: _____

Outro esquema () Sim () Não Qual:

Dose de cada um:

18. Data de início do tratamento:_____

19. Tempo em meses (número de ciclos) para utilização deste
esquema:_____

20. Finalidade do tratamento: (1) curativa (2) prévia (3) controle (4)
adjuvante (5) paliativa (6) invasivo (7) sem informação

Anexo 2. Termo De Consentimento Livre e Esclarecido

Nome do paciente: _____

Pesquisa: Análise da variabilidade genética do gene *KRAS* em pacientes portadores de câncer colorretal do Rio Grande do Sul.

Investigadores: Prof^a Dr^a. Lia Gonçalves Possuelo, do curso de Farmácia (51-8471- 3720), Prof^a. Dr^a. Jane Dagmar Pollo Renner, do curso de Farmácia (51-9826- 3124) Prof^a Dr^a. Luciana de Souza Nunes, do curso de Farmácia (51- 9576-9883) Eliara Fernanda Foletto, aluna do curso de farmácia (51- 9551-5774).

Objetivos e benefícios

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo principal é verificar a presença de mutações na amostra retirada do tumor ou nos pólipos retirados durante o procedimento ao qual foi você foi submetido. O benefício principal desta pesquisa será: a identificação da presença destas mutações, sendo possível evoluir na busca de uma melhor terapia para tratamentos de câncer do colorretal.

Procedimentos

A amostra é recolhida do tecido retirado (quando cirurgia) ou do pólipo (quando colonoscopia).

Local de estudo

O estudo será realizado na UNISC (Universidade de Santa Cruz do Sul) nos laboratórios pertencentes ao CPTBio (Centro de Pesquisa e Treinamento em Biotecnologia).

Riscos

A participação no estudo não envolve nenhum risco. Pois o material colhido será fracionado do tecido colhido na cirurgia ou colonoscopia, quando for o caso, que é rotineiramente enviado para biopsia.

Desistência na participação do estudo

A participação do indivíduo nesse estudo é voluntária, ou seja, quem não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito.

Gostaria de ser comunicado dos resultados desta pesquisa?

Sim, gostaria.

Não gostaria de ser comunicado dos resultados desta pesquisa.

Compensação financeira

Não haverá nenhum pagamento aos indivíduos que concordarem em participar do estudo, bem como os participantes do estudo não terão nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos e recebimento do laudo com os resultados.

Confidencialidade das informações

Toda a informação individual que será fornecida pelo participante do estudo e os resultados das análises realizadas serão consideradas confidenciais. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código (número) criado na entrada do estudo; este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo. Este banco será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos, no meio científico.

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo

Este termo de consentimento explica o estudo que está sendo proposto e convida os indivíduos a participar; no entanto, se houver alguma dúvida, estas poderão ser esclarecidas, pela equipe do estudo pelos telefones: 51- 9826- 3124 (Profª Jane), 51- 9576-9883 (Profª Luciana) 51- 8471- 3720 (Profª Lia) 51-95515774 (Eliara-aluna) . Demais dúvidas também poderão ser esclarecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santa Cruz do Sul (CEP), pelo telefone (51) 3717-7680

Autorização para estocagem de material biológico

Permito que minha amostra de tecido seja guardada para ser utilizada em outra pesquisa, mediante protocolo de pesquisa autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISC, ficando, no entanto livre para solicitar a destruição da mesma a qualquer momento, se assim desejar; (sem minha identificação e/ou mantendo minha privacidade).

- Sim, permito
- Não permito que minha amostra seja utilizada em novos estudos
- Desejo que minha amostra seja destruída após o fim do presente estudo.

O significado de sua assinatura

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre o termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar deste estudo. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do paciente. Data:

Assinatura do Coordenador do estudo. Data:

Observação: O presente documento, baseado nas diretrizes e normas regulamentares para pesquisa em saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 466/12), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma em poder do voluntário ou de seu responsável legal e outra com o pesquisador responsável.

Anexo 3. Carta Hospital Ana Nery.

Santa Cruz do Sul, 08 de julho de 2015.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UNISC)

Prezados Senhores,

Declaramos para os devidos fins conhecer o protocolo de pesquisa intitulado: "Análise da variabilidade genética do gene *KRAS* em pacientes portadores de câncer colorretal do Rio Grande do Sul", desenvolvido pela acadêmica Eliara Fernanda Foletto do Curso de Farmácia, da Universidade de Santa Cruz do Sul-UNISC, sob a orientação da professora Lia Gonçalves Possuelo, bem como os objetivos e a metodologia de pesquisa e autorizamos o desenvolvimento no Centro de Oncologia Integrado do Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul.

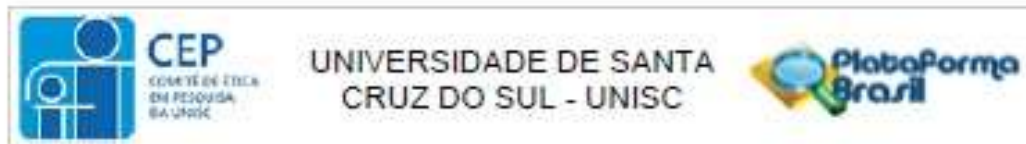
Informamos concordar com o parecer ético que será emitido pelo CEP/UNISC, conhecer e cumprir com a Resolução do CNS 466/12 e demais Resoluções Éticas Brasileiras. Esta instituição está ciente das suas corresponsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa e no seu compromisso do resguardo da segurança e bem estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária.

Atenciosamente,


Lídio Irineu Rauber
Diretor Executivo
Hospital Ana Nery

Rua Pereira da Cunha, 209 - CEP 96835-090
51 2106.4400 - Santa Cruz do Sul - RS - www.hospitalananery.com.br

Anexo 4. Aprovação do Comitê de Ética.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da variabilidade genética do gene KRAS em pacientes portadores de câncer colorretal do Rio Grande do Sul.

Pesquisador: Lia Gonçalves Possuelo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42923214.1.0000.5343

Instituição Proponente: Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

Patrocinador Principal: Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.186.214

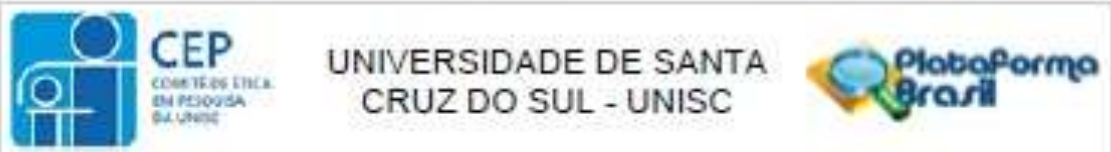
Data da Relatoria: 18/08/2015

Apresentação do Projeto:

O câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia mais frequente em humanos e os números não param de crescer, sendo um problema grave de saúde pública. O CCR é abordado por muitos pesquisadores, seja por levantamentos epidemiológicos que visem alertar as autoridades de saúde aos estudos genéticos, como aqueles que estudam a farmacogenética e alterações que levam a proliferação de células aberrantes podendo levar a resistência às terapias com anticorpos monoclonais. KRAS é um gene que ganhou muito enfoque na atualidade, devido a mutações pontuais no exon 2 levando a troca de aminoácidos, alterando toda a sequência da proteína Ras. A proteína Ras desta forma não cessa o processo de fosforilação na proliferação, diferenciação e apoptose celular e continua enviando estímulo à via MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) produzindo assim células aberrantes, ativando os mecanismos da angiogênese e a formação de tumores malignos que podem afetar indivíduos em várias fases da vida. Pesquisas clínicas identificando

polimorfismos em KRAS têm sido realizadas pelo mundo e se mostraram eficazes na detecção de polimorfismos que direcionam o tratamento de primeira linha para o CCR metastático (CCRM). Este estudo objetiva avaliar a variabilidade genética de polimorfismos no gene KRAS em pacientes portadores de CCR tratados em Santa Cruz do Sul, analisar o perfil epidemiológico da população

Endereço: Av. Independência, nº 2203 -Bloco B, sala 803
Bairro: Universitário **CEP:** 96.815-900
UF: RS **Município:** SANTA CRUZ DO SUL
Telefone: (51)3717-7680 **E-mail:** cep@unisc.br



Continuação do Parecer: 1.106.214

alvo e correlacionar os achados clínicos com os agentes terapêuticos utilizados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos gerais

Análise da variabilidade genética do gene KRAS em pacientes portadores de câncer colorretal de um centro de oncologia da região Centro Serra e Vale do Rio Pardo e sua relação com a resposta terapêutica.

Objetivos específicos

- Realizar um levantamento epidemiológico dos pacientes com CCR, incluindo características tumorais, sociodemográficas do paciente e características relacionadas ao tratamento realizado;
- Analisar a frequência dos principais polimorfismos no gene KRAS, nos códons 12, 13, 61 e 146 do exon 2;
- Relacionar a presença dos polimorfismos com a resposta ao tratamento quimioterápico utilizado pelo paciente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos para os participantes desta pesquisa.

Benefícios:

Esta pesquisa permitirá analisar os polimorfismos do gene KRAS e identificar a variabilidade genética dos pacientes portadores de CCR tratados em Santa Cruz do Sul. Com este conhecimento é possível escolher a melhor terapia a ser empregada tomando o tratamento menos agressivo e mais eficaz.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Documentos solicitados quando da primeira avaliação devidamente protocolados e corretos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão presentes e mostram-se adequados.

Recomendações:

Não há.

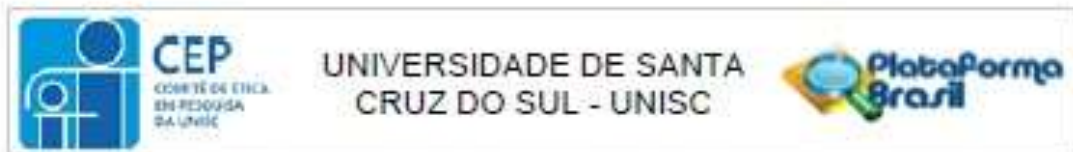
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Independência, nº 2203 -Bloco B, sala 603
 Bairro: Universitário CEP: 96.815-900
 UF: RS Município: SANTA CRUZ DO SUL
 Telefone: (51)3717-7660 E-mail: cep@unisc.br



Continuação do Parecer: 1.106.214

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado e em condições de ser executado.

SANTA CRUZ DO SUL, 14 de Agosto de 2015

Assinado por:
Ingo Paulo Kessler
(Coordenador)

Endereço: Av. Independência, nº 2209 -Bloco E, sala 603
 Bairro: Universitário CEP: 96 815-000
 UF: RS Município: SANTA CRUZ DO SUL
 Telefone: (51)3717-7860 E-mail: cep@unisc.br

Anexo 5. Análise das sequências.

Homo sapiens Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), RefSeqGene on chromosome 12. NCBI Reference Sequence: NG_007524.1

4561 ggcgtctccc tgggtggcatc cgcacagccc gccgcggtcc ggtcccgcctc cgggtcagaa
 4621 ttggcggctg cggggacagc cftgcggtta ggcagggggc gggccgccgc gtgggtccgg
 4681 cagtccctcc tcccgcaag gcgccgcca gaccgcctct ccagccggcc cggctcgcca
 4741 ccctagaccg ccccagccac cccttctcc gccggcccgg cccccgctcc tccccgccc
 4801 gcccgccccg gccccctct tctccccgc ggcgctcgt gctccccct ctccctctt
 4861 cccacaccgc cctcagccgc tcctctcgt acgcccgtct gaagaagaat cgagcgcgga
 4921 acgcatcgat agctctgcc tctgcccgc cccggcccc aactcctcg tgtgctcga
 4981 gctcgattt cctagggcgc ggccgcccgc gcggaggcag cagcggcggc ggcagtggcg
 5041 gcggcgaagg tggcggcggc tcggccagta ctcccggccc ccgccattc ggactgggag
 5101 cgagcgcggc gcaggcactg aaggcggcgg cggggccaga ggctcagcgg ctcccaggtg
 5161 cgggagagag gtacggagcg gaccaccct cctgggccc tcccgggtc ccgaccctc
 5221 ttcccggcgc cggcggggc cggcggcag tgaatgaatt aggggtccc ggaggggagg
 5281 gtggggggcg cggcgcggg gtcggggcg gctgggtgag aggggtctgc aggggggagg
 5341 cgcgcggacg cggcggcgc gggagtgagg aatgggcgg gggggctga ggagggtag
 5401 gctggaggcg gtcgccgctg gtgctgctc ctggacgggg aacccttcc ttctctcc
 5461 ccgagagccg cggctggagg ctctgggga gaaactcgg ccgggccggc tgcccctcg
 5521 agcgggggg tgcggggg gttactccc cggcgccc gctccccct cccctctcc
 5581 cgctcccgca cctctgcct cctttccag cactcggctg cctcgggtca gcctccctg
 5641 ctgcattgg catcttagg acgaaggtat aaacttctc ctcgagcgca ggctggacgg

Éxon 1

10141 gtgctacagg gtgtagagca ctggaagtc tctacatgag tgaagtcatg atatgatcct
 10201 ttgagagcct ttgcccgcg cagaacagca gtctggctat ttgatagaa caactgatt
 10261 ttaagataaa agaactgtct atgtagcatt tatgcattt tcttaagcgt cgatggagga
 10321 gtttgtaaata gaagtacagt tcattacgat acacgtctgc agtcaactgg aattttcatg
 10381 attgaattt gtaaggtatt ttgaaataat tttcatata aaggtagatt tgtattaa
 10441 ggtactggtg gactattga tagtgatta accttatgtg tgacatgttc taatatagtc
 10501 acattttcat tattttatt ataagcctg ctgaaaatga ctgaatataa acttgggta
 10561 gttggagctg gtggcgtagg caagagtgcc ttgacgatac agctaattca gaatcattt
 10621 gtggacgaat atgatccaac aatagaggta aatctgttt taatatgcat attactggtg
 10681 caggaccatt cttgataca gataaagggt tctctgacca tttcatgag tacttattac
 10741 aagataatta tgctgaaagt taagttatct gaaatgtacc ttgggttca agttatatgt
 10801 aaccattaat atgggaact tactttcctt gggagtatg cagggtccat gatgttact
 10861 ctctgtcat tttgattgga agtgatttc agagttcgt gagagggtag aaatttgat
 10921 cctatctgga ctaaaagac aatctttta ttgtaacttt tattttatg ggtttctgg
 10981 tatttgaca tcatatgtaa aggttagatt taattgtact agtgaatat aattgttga

Éxon 2

Códon 12 - GGT

Códon 13 - GGC

Usar primer F

28081 atggaattgc tgatcatatg gtaattctgt gtttaacttt ttgaggaact accactgttt
 28141 tccacaatgg catcaccatt ttacattccc accagcaatg cacaaagatt tcagtgctg
 28201 tatccttgct aacacttatt ttccattttt tgagttttt tgtttgttt ttttaataat
 28261 agccaatcct aatgggtagt tggtagcatc tcatggttt gattttatt tctgactat
 28321 tgatgatgtt gagcatcttt ttaggtgctt agtggccatt tgcctgcat cttggagca
 28381 ggaacaatgt ctttcaagt ctttgccca ttttaaatt gaatttttg ttgtgagtt
 28441 gtatataaca ctttttga agtaaaagg **gcactgtaat** **aatccagact** **gtg**tttctcc
 28501 cttctcag **ga** ttcttacagg aagcaagtag taattgatgg agaaacctgt ctctggata
 28561 **ttctcgacac** agcagg **caa** gaggagtaca gtgcaatgag ggaccagtac atgaggactg
 28621 **gggagggctt** tctttgtga ttgccataa ataactaa atcatttga gatattcacc
 28681 **attatagg**tg ggttaaatt gaatataata agctgacatt aaggagtaat tatagtttt
 28741 atttttgag tctttgtaa tgcatgcat ataataatta ataaaaatt taaataatg
 28801 tttatgaggt aggtaatac cctgtttat aatgaagtt ctgggggat tagagcagt
 28861 gagtaactg ctccagactg catcggtagt ggtggtgctg ggattgaaac ctaggcctg
 28921 ttgactccac agccttctgt actctgact attctacaaa agcaagact taaactttt
 28981 agatacatca ttaaaaaaga aaaccataaa aaagaatag aaaagatgat ttgagatggt
 29041 gtcacttaa cagtcttaa agcaatcgtg tgtatagcat agaattgctt ggattggata

Éxon 3
 Códon 61 - GGT
 Usar primer F

29701 aaaatcttc tagttgcca cttgtttt tgaaaaagta atatgaaaat tatgttaatg
 29761 cttaattca ggttttga aatatttt tatcttaca cattaacat acgtttca
 29821 aattatagtc tgtatatag cacttgggt ctagaattt ttagtagtt ctgtttact
 29881 attatgatct acctgatat taacctata ggtatagtt ttactatact ttaggtatt
 29941 tgatctttg agagagatac aaggttctg ttaaaaagg taaagaaca aaataactag
 30001 tagaagaagg aaggaaaatt tgggtagtg gaaactagga attacattgt tttcttcag
 30061 ccaaattta tgacaaaagt tgggacagg tttgaaaga tattgtgtt actaatgact
 30121 gtgctataac ttttttct tcccag **aga** acaaattaa agagttaagg **actctgaaga**
 30181 **gtacctatg** gtccag **tag** gaaataaatg tgattgctt tctagaacag tagacacaaa
 30241 **acaggctcag** gacttagcaa gaagttatgg aattccttt attgaaacat cagcaaagac
 30301 **aagacagg**ta agtaacactg aaataaatac agatctgtt tctgcaaat cataactgtt
 30361 atgcattha atatatcagt tttctctca attatgctat actaggaat aaaacaatat
 30421 ttagtaaatg ttttgtctc **ttgagagggc** **attgcttctt** aatccagtgt ccatggact
 30481 gctttggct ttggttctt tctacattga aaatttctt tcaattctga gcacatgta
 30541 acatttagaa tcaagaggt ggggatttt tttcccatg gttacatata tatatatata
 30601 tatatatata tatatatata tataaagaac agggcaaca attttgcgt
 30661 tttctattc gtagtactt taaaccatt atgcatggt tctaggttaa acgttgtgt

Éxon 4
 Códon 146 - TAG
 Usar primer R

39841 gttccagttt ctgactcac cttgagatt ctttatggt tttgtgtt ttaacaaag
 39901 gttcacgct catattttac ctttttctt ctacttccc cctggaggag ggtgtgggaa
 39961 tcatagtagt ataaatcact ttttctaa gtcaaagaag taatttaaag ctaactcag
 40021 tttaggctt aattccagga ctagcaaac aaaatggtg cattaattga caaacagatg
 40081 ctaatactg tgtttaggct tgcataatc tctcctaatt cctaatttaa aaattttaa
 40141 atttaattcc attagaaac aaaactgact ttaagaaca aaccaggatt ctagccata
 40201 tttaaaact gcatcctcag tttattcaa acagtctgat gtctgttaa aaaaaaaaa
 40261 atctcaagct cataatctca aacttctgc acatggctt cccagtaaact tactctacc
 40321 aatgcaacag actttaaaga agttgtgtt tacaatgac **agagtggagg** **atgctttta**
 40381 **facattgg**tg agggagatcc gacaatacag attgaaaaa atcagcaag aagaaaagac
 40441 **tcctggct**gt gtgaaaatta aaaaatgcat tataatgtaa tctggtaagt ttaagttcag
 40501 cacattaatt ttggcagaaa gcagatgct ttaaaaggta acaaggggc aaccactta

Éxon 5

40561 gaactactta ggtgtagtat tctaactga agtattaaaa gataagaaac ttgttccat
 40621 aattagtaca tttatttta atctagtggg aattaattat aattgagaca atttgatgg
 40681 ctgtagtaga ctaatctata ttggcataa agtctaata ttaatgagt ctaagtaaa
 40741 ctaaataatt ggaaactgat atttaccttt attttaagg gaaaagttt gagataatca
 40801 gcagctttt tttttttt ttttttta gtagggagaa aaagatatga gctatagtag
 40861 acagcagtaa tattgaatgg cccagaaggt gggaaaaagc cactctaaa tgtattttt
 40921 ctttggata ttttacaagc aaataataac ttctgcctaa gttcgccatc tcagtggcat

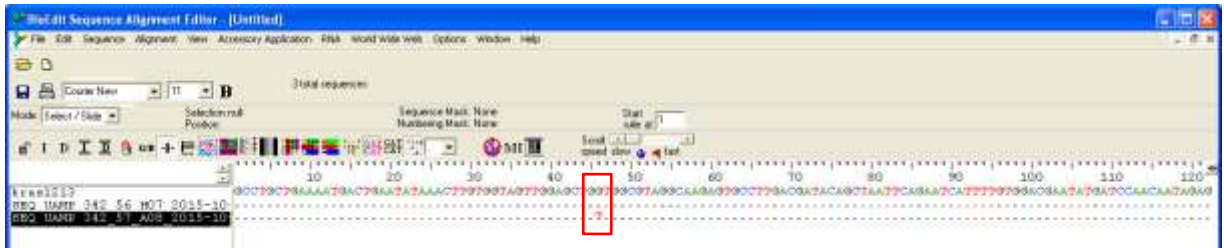
45301 agctaattc tccacaaac tgaggtatta gtgttttt taaagtggta ttctcctgtg
 45361 ttgggggtcac ttaaaccctt ttcttaatg ataaatataat gaattgaaac taatccctta
 45421 atatataca ttgaaaact gaaataatat gtttagatac tgttacttg tgataaatt
 45481 attggaatag gatgttcgaa tactgtttac ttcttgtaa attttaaat ccaatggatt
 45541 ttacgtaagt atagaactgg agtcaaata ctgtactgt gtgtgaagat atatgaacat
 45601 agttacagt tgcattgctt atatctaaag tccagaaaca taaggacaat taagtgtaca
 45661 cacacacaca tgcatttga tttgatgac ttaggttgc caatgtggaa aaaatagtag
 45721 caaattaagt tctcctgtga aaaagtcgtt acctattta aaattctgtg ccattggta
 45781 tcctgtctt ttgtgaaaat tagtgttct gttataata tgacaaaac acctatgagg
 45841 atgacattta agaattctaa aagtcctaat atagtaata tatattcagt tgctgaaga
 45901 gaaacataaa gaatccttc ttaataattt ttccattaat gaaattgtt acctgtacac
 45961 atgaagccat cgtatatatt cacattttaa tacttttat gtatttcag **g gtgttgatga**
46021 tgcttctat acattagttc gagaaatcg aaaacataaa gaaaagatga gcaaagatgg
46081 taaaaagaag aaaaagaagt caagacaaa gtgtgtaatt atgtaaatac aattgtact
 46141 ttttcttaa ggcatactag tacaagtgg t aatttttga cattacacta aattattagc
 46201 attgtttta gcattaccta attttttcc tgctccatgc agactgttag cttttacctt
 46261 aaatgcttat ttaaaatga cagtggaagt ttttttcc tctaagtcc agtattcca
 46321 gagtttggg ttttgaacta gcaatgcctg tgaaaaagaa actgaatacc taagatttct
 46381 gtctggggg ttttggtgca tgcagtgat tacttctat tttcttacc aattgtgaat
 46441 gttggtgga acaaaatga tgaagctttt gaatcatccc tattctgtgt tttatcagt
 46501 cacataaatg gattaattac taatttcagt tgagacctc taattggttt ttactgaaac
 46561 attgagggaa cacaaattta tgggcttct gatgatgatt ctctaggca tcatgtcta
 46621 tagtttgc tccctgatga atgtaaagt acactgttca caaaggttt gtctccttc
 46681 cactgctatt agtcatggtc actctccca aatattata ttttctat aaaagaaaa
 46741 aaatggaaaa aaattacaag gcaatggaaa ctattataag gccatttct ttcacatta
 46801 gataaattac tataaagact cctaatagct ttctctgta aggagacc agtatgaaat
 46861 ggggattatt atagcaacca tttggggct atattacat gctactaaat tttataata
 46921 attgaaaaga ttttaacaag tataaaaaat tctcatagga attaaatgta gtctccctgt
 46981 gtcagactgc tcttcatag tataacttta aatctttct tcaactgag tcttgaaga
 47041 tagtttaat tctgctgtg acattaaaag attattggg ccagttatag ctattagggt
 47101 gttgaagaga ccaaggtgc aaggccaggc cctgtgtgaa ctttgagct tcatagaga
 47161 gttcacagc atggactgtg tccccagggt catccagtgt tgcatgcat tggtagtca
 47221 aaatggggag ggactagggc agtttgata gctcaacaag atacaatctc actctgtgg
 47281 ggtcctgctg acaaatcaag agcattgctt ttgttctta agaaaacaaa ctctttta
 47341 aaaattactt taaatatta actcaaaagt tgagattttg ggggtgggt gtgccaagac
 47401 attaatttt ttttaaca atgaagtga aaagtttac aatctctagg tttggctagt
 47461 tctctaaca ctggttaaat taacattgca taacacttt tcaagictga tccatattta
 47521 ataatgctt aaaataaaaa taaaacaat cttttgata aatttaaat gttactatt
 47581 ttaaaataaa tgaagtgaga tggcatggg aggtgaaagt atcactggac taggaagaag

Éxon 6

47641 gtgacttagg ttctagatag gtgtcttta ggactctgat tttgaggaca tcacttacta
 47701 tccatttctt catgttaaaa gaagtcactt caaactctta gttttttt ttacaacta
 47761 tgaatttat attccattta cataaggata cacttatttg tcaagctcag cacaaactgt
 47821 aaattttta cctatgttac accatctca gtgccagtct tgggcaaaaat tgtgcaagag
 47881 gtgaagtta tattgaata tccattctcg ttttaggact ctcttccat attagtgtca
 47941 tcttgctcc ctacctcca catgccccat gacttgatgc agtttaata ctgtaatc
 48001 ccctaacct aagatttact gctgctgtgg atactccat gaagtttcc cactgagtca
 48061 catcagaaat gccctacatc ttattcctc agggctcaag agaactgtac agataccata
 48121 aagggatttg acctaaccac taatttcag gtgggtgctg atgcttgaa catctcttg
 48181 ctgcccaatc cattagcgc agtaggattt tcaaacctg gtatgaatag acagaacct
 48241 atccagtggg aggagaattt aataaagata gtgctgaaag aattccttag gtaatctata
 48301 actaggacta ctctggtta cagtaataca ttccattgtt ttagtaacca gaaacttca
 48361 tgcaatgaaa aatacttta ttcatgaagc ttacttttt ttttggtgt cagagtctg
 48421 ctctgtcac ccaggctgga atgcagtggc gccatctcag ctactgcaa cctccatc
 48481 ccagggtcaa gcgattctg tgcctggcc tctgagtag ctgggattac aggcgtgtg
 48541 cactacactc aactaattt tgtatttta ggagagacgg ggttcacc tgttgccag
 48601 gctggctcg aactcctgac ctcaagtat taccacact tggcctcata aacctgtt
 48661 gcagaactca ttattcagc aatatttat tgagtgccta ccagatgcca gtcaccgcac
 48721 aaggcactgg gtatatgga tcccaaca agagacataa tccggtcct taggtagtgc
 48781 tagtgggtc tgaatatct tactaaggcc tttggtatac gaccagaga taacacgat
 48841 cgtatttag tttgcaaag aagggttg gtctctgtg cagctctata attgttgc
 48901 tacgattcca ctgaaactct tcatcaagc tactttatgt aaactctc attgttta
 48961 aggaataaac tgattatat tgttttta ttggcataa ctgtattct ttaggaca
 49021 ttactgtaca catlaagggt tatgtcagat attcatattg acccaaatgt gtaatatcc
 49081 agtttctct gcataagta taaaatata cttaaaaatt aatagttta tctgggtaca
 49141 aataaacagg tgctgaact agttcacaga caaggaaact tctatgtaa aactactatg
 49201 atttctgaat tgctatgtga aactacagat ctttgaaca ctgttaggt aggtgtta
 49261 gacttacaca gtacctgtt tctacacaga gaaagaaatg gccatactc aggaactgca
 49321 gtgctatga gggatattt aggcctctg aattttgat gtatggtggc atttttta
 49381 ggtagtgtt aattacctt atgtgaact tgaatggtt acaaaaagat ttgtttgt
 49441 agagatttta aagggggaga attctagaaa taaatgttac ctaattatta cagccttaa
 49501 gacaaaaatc ctgttgaag ttttttaa aaaagctaaa ttacatagac ttaggcatta
 49561 acatgttgt ggaagaatat agcagacgta tattgtatca tttgagtga tgtccaag
 49621 taggcattct aggtctatt taactgagtc aactgcata ggaattaga actaactt
 49681 tataggttat caaaactgt gtcaccattg cacaaatttg tctaataa tacatagaaa
 49741 cttgtgggg catgttaagt tacagttgc acaagttcat ctatttga ttccattgat
 49801 tttttttt ttctaaacat ttttctca aacagtatat aactttttt aggggattt
 49861 ttttagaca gcaaaaacta tctgaagatt tccatttgc aaaaagtaat gatttctga
 49921 taattgtga gtaatgtt ttagaacca gcagttacct taagctgaa ttatattta
 49981 gtaactctg tgaataact ggatagcat aattctgcat tgagaaactg aatagctgc
 50041 ataaaatgaa actttcttc taaagaaaga tactcacatg agttctgaa gaatagcat
 50101 aactagatta agatctgtgt ttagttta tagttgaag tgctgttg ggataatgat
 50161 aggtaattta gatgaattta ggggaaaaa agttatctg cagatatgtt gagggccat
 50221 ctctcccc acacccac agagctaac ggttacagt gtttatccg aaagttcca
 50281 attccactgt ctgtgttt catgtgaaa atactttgc attttctt tgagtccaa
 50341 tttctacta gtactattc ttaatgaac atgtttacct ggaatgtatt ttaactatt
 50401 ttgtatagt taaactgaaa catgcacatt ttgtacattg tgctttctt tgtgggacat
 50461 atgcagtgtg atccagtgt ttccatcat ttggtgctg tgacctagga atgttggtca
 50521 tatcaaacat taaaatgac cactcttta atgaaatta actttaaat gttatagga
 50581 gtatgtctg tgaagtgat taaaattgt aatattttg tcatgaactg tactactct

50641 aattattgta atgtaataaa aatagttaca gtgactatga gtgtgtattt attcatgaaa
50701 ttggaactgt ttgccccgaa atggatatgg aatactttat aagccataga cactatagta
50761 taccagtga tctttatgc agcttgtag aagatcctt tatttctaaa aggtgctgtg
50821 gatattatgt aaaggcgtgt ttgcttaaac taaaacat atttagaagt agatgcaaaa
50881 caaatctgcc tttatgacaa aaaaatagga taacattatt tatttattc ctttatcaa
50941 agaaggtaat tgatacacia caggtagctt ggtttaggc ccaaaggtag cagcagcaac
51001 attaataatg gaaataattg aatagttagt tatgtatgtt aatgccagtc accagcaggc
51061 tattcaagg tcagaagtaa tgactccata catattattt atttctataa ctacattaa
51121 atcattacca ggaactgttt gttttagt gaacctgag tatgtgctgt taatatacca
51181 aattgggtga aaaaataagg gattccttc aaaagttaag agaagtaagt gtgaagaaa
51241 ttatttgct tattaaatgt tccgtaaag gcattctct gtcagtaaaa tggagaaata
51301 agctaaaaat aattggctaa gtcctattaa gtagaggat taagtgtatt atatttcat
51361 tcaaaattgg gtgctatta atttatgac gtagtatag ctaaattgct atgttgtat
51421 caaaattgag cataaagtg ctgatactt cccgatga acagaagtg aaacctattt
51481 agttcagtag ggcagctcag ggattttta cacaacatgt atatctccc atttaagtt
51541 agaattattt tacaacatct ggtatacata aacagctggc actgatagct aaattaaagt

Anexo 6. Análise do sequenciamento.



H07 (amostra 21) – GGT (sw)

A08 (amostra 22) – GTT (mut)

Anexo 7. CDS inicio da regiões codificantes.

```

45001 ttgcataatt taagtactgc aggttttaaaa tctactacca gtttgagagt gccatttttc
45061 aactgtaga ttattaggtt gaaaagtatt atggcttaaa atcgctttta gccattaaat
45121 ttaaataacc ttgctttaat cataaataga tgggtgtcac aatgactaac tgttaaactc
45181 tttgaagaca ggatatttgg ctttatatgg caagcttttg aatacaacag aaattaaaac
45241 tttatgggat agaaagaatc tcctccaaat tggtaaaacta taagaccttt caaatgattt
45301 agctaatttc tccacaaaatc tgaggatatta gtgttttttt taaagtggta ttctcctgtg
45361 ttgggtgtcac tttaaacctt tttcttaatg ataaatata gaattgaaac taatccccta
45421 atatataatca tttgaaaact gaaataatat gtttagatac tgtttacttg ttgataaatt
45481 attggaatag gatgttcgaa tactgtttac ttcttggtaa atttttaaat ccaatggatt
45541 ttacgtaagt atagaactgg agctcaaaata ctgttactgt gtgtgaagat atatgaacat
45601 agtttacagt tgcattggctt atatctaaag tccagaaaca taaggacaat taagtgtaca
45661 cacacacaca tgcatttggga tttttagtgc caatgtggaa aaaatagtag
45721 caaattaagt tctcctgtga aaaagtcggt accttattta aaattctgtg ccattggtta
45781 tccttgctct ttgtgaaaat tagtgttcct gtttataata ttgacaaaac acctatgcgg
45841 atgacattta agaattctaa aagtcctaata atatgtaata tatattcagt tgcctgaaga
45901 gaaacataaa gaatcctttc ttaatatatt ttccattaat gaaatttgtt acctgtacac
45961 atgaagccat cgtatatatt cacattttaa tactttttat gtatttcagg gtgttgatga
46021 tgcttctat acattagttc gagaaattcg aaaacataaa gaaagatga gcaaagatgg
46081 taaaaagaag aaaaagaagt caaagcaaaa gtgtgtaatt atgtaatac aatttgact
46141 tttttcttaa ggcatactag tacaagtggg aatttttgta cattacacta aattattagc
46201 atttgtttta gcattaccta attttttcc tgctccatgc agactgtag cttttacctt
46261 aatgcttat tttaaatga cagtggaggt tttttttcc ttaagtgcc agtattccca
46321 gagtttgggt ttttgaacta gcaatgcctg tgaaaaagaa actgaatacc taagatttct
46381 gtcttgggggt ttttgggtgca tgcagttgat tacttcttat ttttcttacc aattgtgaat
46441 gttgggtgta aacaaattaa tgaagctttt gaatcatccc tattctgtgt tttatctagt
46501 cacataaatg gattaattac taatttcagt tgagacctc taattggttt ttactgaaac
46561 attgagggaa cacaaattta tgggcttctc gatgatgatt cttctaggca tcatgtccta
46621 tagtttgtca tccctgatga atgtaaagtt acactgttca caaaggtttt gtctcctttc
46681 cactgctatt agtcatggtc actctcccca aaatattata tttttctat aaaaagaaaa
46741 aatggaaaa aaattacaag gcaatggaaa ctattataag gccatttcct tttcacatta
46801 gataaattac tataaagact cctaatagct tttcctgta aggcagaccc agtatgaaat
46861 ggggattatt atagcaacca ttttggggct atatttcat gctactaaat ttttataata
46921 attgaaaaga ttttaacaag tataaaaaat tctcatagga attaaatgta gtctccctgt
46981 gtcagactgc tctttcatag tataacttta aatcttttct tcaacttgag tctttgaaga
47041 tagttttaat tctgcttgtg acattaaaag attatttggg ccagttatag cttattaggt
47101 gttgaagaga ccaaggttgc aaggccaggc cctgtgtgaa ctttgagct tcatagaga
47161 gttcacagc atggactgtg tccccacggt catccagtgt tgcattgcat tggttagtca
47221 aatgggggag ggactagggc agtttggata gctcaacaag atacaatctc actctgtggg

```

CDS

▼ Feature

1 of 3

NG_007524 : 4 segments


```

39781 cttcacttgt ataccctgga aatagactga aaggtgtaa aatttaagat aaaactcaag
39841 gttccagttt cttgactcac ctttgagatt cttttatggt tttgttggtt ttttaacaaag
39901 gtttcacgtc catattttac ctttttctt ctcattctcc cctggaggag ggtgtgggaa
39961 tcgatagtat ataaatcact tttttcctaa gtcaaagaag taattttaaag ctaacttcag
40021 tttaggcttt aattccagga ctagcaaact aaaatgggtt cattaattga caaacagatg
40081 ctaataacctg tgtttaggct tgtcataatc tctcctaatt cctaatttaa aaattttaaa
40141 atttaattcc attagaaaac aaaactgact tttagaaca aaccaggatt ctagcccata
40201 ttttaaaact gcatcctcag ttttattcaa acagtctgat gctgttttaa aaaaaaaaaa
40261 atctcaagct cataatctca aacttcttgc acatggcttt cccagtaaat tactcttacc
40321 aatgcaacag actttaaaga agttgtgttt tacaatgcag agagtggagg atgcttttta
40381 tacattggtg agggagatcc gacaatacag attgaaaaaa atcagcaaaag aagaaaagac
40441 tcctggctgt gtgaaaatta aaaaatgcat tataatgtaa tctggtaagt ttaagttcag
40501 cacattaatt ttggcagaaa gcagatgtct tttaaaggta acaaggtggc aaccacttta
40561 gaactactta ggtgtagtat tctaacttga agtattaaaa gataagaaac ttgtttccat
40621 aattagtaca tttattttta atctagtggg aattaattat aattgagaca attttgatgg
40681 ctgtagtaga ctaatctata tttggcataa agtctaata tttaatgagt cttaaagtaa
40741 ctaaatattht ggaaactgat atttaccctt atttttaagg gaaaaagttt gagataatca
40801 gcagcttttt tttttttttt ttttttttta gtagggagaa aaagatatga gctatagtag
40861 acagcagtaa tattgaatgg cccagaaggt gggaaaaagc cactcttaaa tgtatttttt
40921 cttttggata ttttacaagc aaataataac ttctgcctaa gttcgccatc tcagtggcat
40981 cagcagcaca gcactttctt atcccagtga gaaacctggg aatttttagga tgactcctac
41041 cgccctcttt tccccctggt ttggaagtat ccacaaattc ctgtgacgtt acattctgtg
41101 tcttttatgt catcattagt tcaggcccct atcatttctt gttggactgt tagaacctcc
41161 tatttggttt accagttgct gccatcattc attgtgaaac cggagagata cactttaaag
41221 aaatgtcatt tttggccggg cgcgggtggct cacgcctgta atcccagcac tttgggaggc
41281 ctaggcgggt gatcacctga ggtcaggagt tcaagaccag cctggctaac atggtgaaac
41341 cctatthtcta ctaaaaatac aaaaaatag ccgggcgtgg tggcacgtgc ctgtaatccc
41401 agctacttgg gaggctgagg caggagaatt gcttgaacct gggaggcaga ggttcagtg
41461 agctgagaat gcaccattgc actccagctt gagcaacaag agcgaaactc tgtctcaaaa
41521 aaaaaaaaaa aaagtcaatt tagctataga ataaaatctc atgttcaca tgtgttcag
41581 atagtcctta ctaccttccc accactccag ctctttttg gtcttatatc taaaaacgtc
41641 atcttgcttg aatttctttt gttcttctat aaataaatac catgttattt cctaccttcc
41701 cttgagtctt ggctcttggt tggaatgcca gtatthttat ccctagtctt actaattagc
41761 taacactctc atgattcccc agtctcctac tctctaaaaa ctttcttta aacccttaga
41821 ctaggcatgg agcccttctt gtgtattccc agaatactat tcttaactat tatatgcttc
41881 ccatgttatg ttgaaataac taacctcttc tgtttcattc ctatattact tgacagcaaa
41941 atcttagcca gaattacata tttttaatct ttgcacacc attgcctagt aaggttctgt
42001 ggacatagta actaccaggt aatatthttat tgcgtggaat tctcattttc gtttctaaac
42061 ccgtattaaa ctctgtcttg ctcaaaaaat acttcactag gtatcataaa gttcatggca

```

CDS



Feature



2 of 3



NG_007524 : 4 segments

```

50341 tttcttacta gtactatttc ttaatgtaac atgtttacct ggaatgtatt ttaactatatt
50401 ttgtatagtg taaactgaaa catgcacatt ttgtacattg tgctttcttt tgtgggacat
50461 atgcagtggt atccagttgt tttccatcat ttggttgctg tgacctagga atggttggtca
50521 tatcaaacat taaaaatgac cactctttta attgaaatta acttttaaat gtttatagga
50581 gtatgtgctg tgaagtgatc taaaatttgt aatatttttg tcatgaactg tactactcct
50641 aattattgta atgtaataaa aatagttaca gtgactatga gtgtgtatatt attcatgaaa
50701 tttgaactgt ttgccccgaa atggatatgg aatactttat aagccataga cactatagta
50761 taccagtgaa tcttttatgc agcttgtagg aagtatcctt tatttctaaa aggtgctgtg
50821 gatattatgt aaaggcgtgt ttgcttaaac ttaaaacat atttagaagt agatgcaaaa
50881 caaatctgcc tttatgacaa aaaaatagga taacattatt tatttatttc cttttatcaa
50941 agaaggtaat tgatacacia caggtgactt ggttttaggc ccaaaggtag cagcagcaac
51001 attaataatg gaaataattg aatagttagt tatgtatgtt aatgccagtc accagcaggc
51061 tatttcaagg tcagaagtaa tgactccata catattatatt atttctataa ctacatttaa
51121 atcattacca ggaactgttt gttttgtagt gaaccttgag tatgtgctgt taatatacca
51181 aattgggtga aaaaaaagg gattcctttc aaaagttaag agaagtaagt gtgtaagaaa
51241 ttattttgct tattaatgt tcggtaaatg gcattctctt gtcagtaaaa tggagaaata
51301 agctaaaaat aattggctaa gtcctattaa gttagaggat taagtgtatt atattttcat
51361 tcaaaattgg gtgctcatta atttatgatc ggtagtatag ctaaattgct atgtttgtat
51421 caaaattgag cataaagttg ctgatacttt ctccgtatga acagaagttg aaacctattt
51481 agttcagtag ggcagctcag ggatttttta cacaacatgt atatcttccc attttaagtt
51541 agaattatatt tacaacatct ggtatacata aacagctggc actgatagct aaattaaagt
51601 agtaatgatc aattagtttt gttggtatct gaataatagc gttgtttcat agctctgtat
51661 ttcctaagga agtacaagc ttctagctct ttcattacaa attcgccttg tgcaataagt
51721 tctttgatct tctctggatt cttcacatct ttgtttttaa ggaaaatggt cttcaaacgc
51781 tttttaaaat agtctgctcc ttttggatag tctcgtccaa gatacagcag cttcaaaaaag
51841 aaagattata tatttctaaa caatccatgt catataataa catttttata aaattggcaa
51901 cataattact tacattttta taaagtttta gtacttctcc tcttaagaa ttggccattt
51961 tcatttatca tgtaaattat ccacttttat gcataacata ctaaagaaa ggaaaatttt
52021 tttgcaatta gctgcattgt agtcttaaaa aaataaaaaa aggttataca cattgagaaa
52081 atggtaacct tttttacatt caataaataa ttcttgataa ctttttcggt ccacgtactg
52141 ggatatagtt ataaacactt ccgataaaat tacctgctgt cataattgac gttttcctat
52201 gggagacata agcaaagaca attgtgattg tgagaagtca catgaaggaa atgagaaagt
52261 ggattgtcat cacagatagg tacgtgtacc tccttttatg ccacagtgga atgagttaaa
52321 ctagatttaa attccagttg cataatgtac agattaatta accttgctga gcctgagttt
52381 tccttatcaa caaacaagag attatcttta ccctgctctc aaggcaaggc cagagccact
52441 tgaaggacat tgagcagaag cctgatcaaa tgctgatggg tgcttatcca aaggaggct
52501 gaaaactagc agaaactggg tgagttaagc aggttggat agtagatggg cagtaagatt
52561 ggtggtgaag aggccaaatg aacaacctgt aagagggtgt ccctgaggaa caggcaaaat

```

CDS

Feature



3 of 3



NG_007524 : 2 segments (minus strand)

Anexo 8: Instruções para autores da Revista Brasileira de Coloproctologia.

13/12/2015

Rev. bras. colo-proctol. - Instruções aos autores



ISSN 0101-9880 versão
impressa

ISSN 1980-5446 versão online

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)
- [Envio de manuscritos](#)

Escopo e política

Os trabalhos devem ser inéditos e destinar-se exclusivamente à **REVISTA BRASILEIRA DE COLOPROCTOLOGIA**. Os artigos de revisão serão inseridos a convite da Comissão Editorial. Em casos excepcionais de republicação de trabalhos nacionais ou estrangeiros, deverão estes conter autorização formal do autor e do periódico detentor do copyright.

As normas são baseadas no formato proposto pelo International Committee of Medical Journal Editors e publicado no artigo: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals, que foi atualizado em outubro de 2004 e está disponível no endereço eletrônico <http://www.icmje.org>. Para apresentação de ensaios clínicos randomizados, recomenda-se que o trabalho esteja em conformidade com o CONSORT guidelines (Begg C, Cho N, Eastwood S et al. Improving the quality of reporting of randomized clinical trials: the CONSORT statement. JAMA 1996;276:637-9). Uma lista de verificação está disponível no website do JAMA: <http://jama.ama-assn.org>

Os manuscritos submetidos à Revista, que atenderem às "instruções aos autores" e que se coadunem com a sua política editorial são encaminhados a 4 membros do conselho editorial, que considerarão o mérito científico da contribuição. Os manuscritos são encaminhados aos relatores previamente selecionados aleatoriamente pelos Editores. O anonimato é garantido durante todo o processo de julgamento. A decisão sobre aceitação é tomada pelos Editores, após avaliação de 4

membros do conselho editorial e, tendo sua publicação recomendada por pelo menos 3/4 dos mesmos. Cópias dos pareceres poderão ser encaminhados aos autores e relatores, estes por sistema de troca entre eles. Manuscritos recusados - Manuscritos não aceitos não serão devolvidos, a menos que sejam solicitados pelos respectivos autores. Manuscritos recusados, mas com a possibilidade de reformulação, poderão retornar como novo trabalho, iniciando outro processo de julgamento. Manuscritos aceitos - Manuscritos aceitos ou aceitos sob condição poderão retornar aos autores para aprovação de eventuais alterações no processo de editoração e normalização de acordo com estilo da Revista. Aprovação para Publicação - Todos os artigos propostos à publicação serão previamente submetidos à apreciação de 4 membros do Conselho Editorial. Quando aceitos, estarão sujeitos a pequenas correções ou modificações que não alterem o estilo do autor. Eventuais modificações na forma, estilo ou interpretação só ocorrerão após prévia consulta. Quando recusados, os artigos serão devolvidos com a justificativa do Editor Chefe. Os comentários dos Conselheiros, nestes casos, poderão ser enviados pelo Editor Chefe ou solicitados pelo Autor. **Correção Final:** Os Artigos para publicação serão encaminhados, em prova gráfica, ao autor para as correções cabíveis e devolução no menor prazo possível. Se houver atraso na devolução da prova, o Editor Chefe reserva-se o direito de publicar, independentemente da correção final. A prova gráfica será enviada ao autor cujo endereço foi indicado para correspondência, ficando o mesmo responsável pela apreciação final da matéria, estando os demais de acordo com a publicação da mesma.

É remetida exclusivamente a seus assinantes, colaboradores, bibliotecas, hospitais, sociedades médicas, centros de estudo a aos periódicos nacionais e estrangeiros com os quais mantém permuta.

REVISTA BRASILEIRA DE COLOPROCTOLOGIA reserva-se todos os direitos, inclusive de tradução, em todos os países signatários da Convenção Pan-Americana e da Convenção Internacional sobre Direitos Autorais.

A reprodução total ou parcial dos trabalhos em outros periódicos - com menção obrigatória da fonte dependerá de autorização da Revista.

Para fins comerciais, é proibida a tradução e reprodução parcial ou total dos trabalhos publicados nesta revista.

A **REVISTA BRASILEIRA DE COLOPROCTOLOGIA** não aceita matéria paga em seu espaço redatorial, nem paga qualquer valor, em espécie ou outros, aos autores dos trabalhos publicados em suas páginas.

A Revista se reserva o direito de não aceitar os originais que não considerar apropriados (apresentação, datilografia, número de cópias, itens abrangidos, etc.), assim como propor modificações, de acordo com as apreciações dos Consultores e Conselho Editorial.

A redação, quando o caso, adaptará automaticamente todos os trabalhos aceitos para publicação às presentes normas.

Forma e preparação de manuscritos

- **Página de Identificação:** Deve conter: a) Título do artigo, em português, que deverá ser conciso, porém informativo; b) nome completo de cada autor e afiliação institucional; c) nome do departamento e Instituição aos quais o trabalho deve ser atribuído; d) nome, endereço, fax e e-mail do autor responsável e a quem deve ser encaminhada correspondência, e) fontes de auxílio à pesquisa, f) potenciais conflitos de interesse.
- **Resumo e descritores:** A segunda página deve conter o resumo, em português e inglês, de não mais que 200 palavras para artigos originais, de revisão, comunicações breves e artigos de atualização. Para os artigos originais, de revisão e comunicações breves deve ser estruturado, destacando os objetivos do estudo, métodos, principais resultados apresentando dados significativos e as conclusões. Para as atualizações, o resumo não necessita ser estruturado, porém deve conter as informações importantes para reconhecimento do valor do trabalho. Abaixo do resumo, especificar 5 descritores que definam o assunto do trabalho. Os descritores deverão ser baseados no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) publicado pela Bireme que é uma tradução do MeSH (Medical Subject

Headings) da National Library of Medicine e disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>

- **Texto:** Deverá obedecer à estrutura exigida para cada categoria de artigo. Em todas as categorias a citação dos autores no texto deverá ser numérica e seqüencial, utilizando algarismos arábicos entre parênteses e sobrescritos, evitando indicar o nome dos autores.

Citações no texto e referências citadas em legendas de tabelas e figuras devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto, com algarismos arábicos (números índices). Deve-se incluir apenas o número da referência, sem outras informações.

- **Tabelas:** Cada tabela deve ser enviada em folha separada. As tabelas devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, na ordem que foram citadas no texto e encabeçadas por um título apropriado. Devem ser citadas no texto, sem duplicação de informação. As tabelas, com seus títulos e rodapés, devem ser auto-explicativas. Tabelas provenientes de outras fontes devem citar as referências originais no rodapé.
- **Figuras e gráficos:** As ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos etc.) devem ser enviadas individualmente.

Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e serem suficientemente claras para permitir sua reprodução. As legendas para as figuras deverão constar em página separada. Fotocópias não serão aceitas. Se houver figuras extraídas de outros trabalhos previamente publicados, os autores devem providenciar permissão, por escrito, para a sua reprodução. Esta autorização deve acompanhar os manuscritos à publicação

- **Análise estatística:** Os autores devem demonstrar que os procedimentos estatísticos utilizados foram não somente apropriados para testar as hipóteses do estudo, mas também corretamente interpretados. Os níveis de

significância estatística (ex. $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) devem ser mencionados.

- **Abreviações:** As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Em seguida, não se deve repetir o nome por extenso.
- **Nome de medicamentos:** Deve-se usar o nome genérico.
- **Agradecimentos:** Devem incluir as colaborações de pessoas, grupos ou instituições que merecem reconhecimento, mas que não tem justificadas suas inclusões como autoras; agradecimentos por apoio financeiro, auxílio técnico, etc.
- **Referências:** Devem ser numeradas consecutivamente na mesma ordem em que foram citadas no texto e identificadas com números arábicos. A apresentação deverá estar baseada no formato denominado " Vancouver Style", conforme exemplos abaixo, e os títulos de periódicos deverão ser abreviados de acordo com estilo apresentado pela List of Journal Indexed in Index Medicus, da National Library of Medicine e disponibilizados no endereço: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>

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

Para todas as referências, cite todos os autores até seis.

Acima de seis, cite os seis primeiros, seguidos da expressão et al..

Envio de manuscritos

Os artigos deverão ser entregues em disquete ou CD-Room, no programa word acompanhado de 2 cópias de impressão em papel. *4.2. Datilografia* Os originais devem ser datilografados em duas vias, com espaço duplo, em uma só face, com laudas contendo de 20 a 25 linhas, devidamente numeradas e rubricadas pelo autor principal, sendo-nos enviados através de correspondência, na qual constará além do título completo do trabalho, autorização para sua publicação neste periódico, para o endereço da SBCP.

Subcomissões por e-mail (sbcp@sbcp.org.br) também são aceitas. Nesse caso, é imprescindível que a permissão para reprodução do material e as cartas com a aprovação de um Comitê de Ética da Instituição onde foi realizado o trabalho, quando referente a intervenções (diagnósticas ou terapêuticas) em seres humanos e aquela assinada por todos autores em que se afirme o ineditismo do trabalho sejam enviadas por fax á RBCP (fax número: 21 2220-5803).