

**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA E FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

Martina Fernanda Gewehr

**COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM POR HIGH RESOLUTION
MELT E SEQUENCIAMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS
GENES *KRAS BRAF* e *PIK3CA***

Santa Cruz do Sul
2019

Martina Fernanda Gewehr

**COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM POR HIGH RESOLUTION
MELT E SEQUENCIAMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS
GENES *KRAS BRAF e PIK3CA***

Projeto de pesquisa a ser apresentado à disciplina de
Trabalho de Curso II, do Curso de Farmácia da
Universidade de Santa Cruz do Sul.

Orientador: Lia Gonçalves Possuelo

Santa Cruz do Sul
2019

RESUMO

O câncer é uma doença genética caracterizada pelo crescimento desordenados de células que invadem tecidos e órgãos. O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna que se desenvolve em partes do intestino, colón e reto. Pode se desenvolver de forma esporádica ou de forma hereditária. No tratamento do CCR o uso de anticorpos monoclonais é considerado como terapia de primeira linha, sendo Cetuximabe o anticorpo mais recomendado. Este anticorpo liga-se ao EGFR bloqueando a sinalização para as vias *RAS*, *RAF* e *PIK3* resultando na indução de apoptose da célula. Genes como *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* são os principais indutores de resistências ao tratamento monoclonal. Pois, codificam proteínas que resistem a atividade monoclonal e permanecem em seu estado ativo mesmo sem a indução do estímulo proveniente do *EGFR*, levando assim a continuidade da proliferação de células malignas. O objetivo do estudo foi comparar a prevalência de mutações nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* identificadas por HRM e por sequenciamento, e caracterizar perfil epidemiológico de pacientes que realizaram a retirada cirúrgica de tumores colorretais no Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul. Foi realizado um estudo transversal prospectivo no município de Santa Cruz do Sul. Em que foram colhidas amostras de biópsias no momento da cirurgia para retirada de tumor no período de Janeiro à Junho de 2019. Dados epidemiológicos foram coletados utilizando questionário Centro de Pesquisa e Treinamento em Biotecnologia da Unisc , onde foi executado a extração de *DNA*, PCR, análise por HRM e sequenciamento. Foram coletadas 8 amostras de pacientes, 4 mulheres e 4 homens com a média de idade de 59 anos. 50% dos pacientes possuíam histórico familiar para o CCR. A localização dos tumores primários originavam-se no colón (50%) e no reto (50%), 37,5% eram moderadamente diferenciados e 25% apresentaram estadiamento entre T1-T4B, N1-N2b, M0. A especificidade obtida entre os métodos de análise HRM e sequenciamento foi de 100% com acurácia de 0,625. As técnicas de genotipagem HRM e sequenciamento se demonstraram como métodos eficientes para a análise de mutações para os gene *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA*.

Palavras-chave: Neoplasias colorretais; Polimorfismo genético; Diagnóstico molecular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESES	7
2.1 Pergunta de pesquisa.....	7
2.2 Hipóteses.....	7
3 OBJETIVOS	8
3.1 Objetivo geral.....	8
3.2 Objetivos específicos.....	8
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
4.1 Carcinogênese	9
4.2 Hallmarks do câncer	12
4.3 Epidemiologia do câncer	16
4.4 Genes envolvidos nas vias de sinalização do CCR.....	18
4.4.1 EGFR	18
4.4.2 KRAS	19
4.4.3 BRAF	20
4.4.4 PIK3CA	21
4.5 Terapia monoclonal.....	23
4.6 Métodos de diagnóstico moleculares.....	24
4.6.1 Sequenciamento genético	24
4.6.2 <i>High Resolution Melting</i>	24
5 MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 Local de pesquisa	26
5.2 Critérios de inclusão.....	26
5.3 Critérios de exclusão	26
5.4 Procedimentos metodológicos.....	27
5.4.1 Coleta de dados epidemiológicos	27
5.4.2 Amostras biológicas	27
5.4.3 Extração de DNA	27
5.4.4 Eletroforese e quantificação da amostra	28
5.4.5 Reações de PCR	28
5.4.6 Eletroforese do produto de PCR	29
5.4.7 Reação de HRM	29
5.4.8 Purificação do produto de PCR	30

5.4.9 Sequenciamento	30
5.4.10 Análise dos polimorfismos	31
5.4.11 Análise de dados.....	31
5.4.12 Riscos e benefícios.....	31
5.4.13 Considerações éticas	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
Artigo Original.....	34
7 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	59
ANEXO B - Concordância do local da Pesquisa	61
ANEXO C – QUESTIONÁRIO DE PESQUISA.....	62
ANEXO D – Normas da Revista Brasileira De Coloproctologia	63

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença genética caracterizada pelo crescimento desordenados de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se em forma de metástase para outras regiões do corpo. Estas células tendem a ser agressivas e incontroláveis, promovem formação de tumores benignos ou neoplasias malignas (INCA, 2018). Suas causas são variadas, podendo ser por fatores externos, relacionado aos hábitos e costumes do ambiente social e cultural, como por exemplo: tabagismo; exposição excessiva a radiação solar; hábitos alimentares; alcoolismo; hábitos sexuais; uso excessivo de medicamentos; e fatores ocupacionais. Ou por fatores internos, associados à predisposição genética, que devem a fatores hereditários, familiares e étnicos (HARRISS et al., 2009).

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna que se desenvolve em partes do intestino, colón e/ou reto. Pode se desenvolver de forma esporádica ou de forma hereditária, é um câncer agressivo capaz de ativar múltiplas vias de sinalização induzindo a proliferação desordenada de células cancerígenas (SANTA HELENA et al., 2017). O CCR atinge principalmente vias mediadas pelos receptores de crescimento epidérmico (EGFR), superativando proteínas da família RAS, RAF e PIK3, que são proteínas quinase responsáveis pela indução de sinais desde a superfície da célula até o núcleo (BRUERA et al., 2018).

No Brasil estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer para o biênio 2018-2019, sendo 217,27 novos casos para 100 mil para homens e 191,78 novos casos para 100 mil mulheres. Estima-se que para o CCR há 36,360 novos casos por ano, é o terceiro câncer mais frequentes na região Sul com 22,17 novos casos para 100 mil habitantes (INCA, 2018). Estudos epidemiológicos são uma forma de alerta, mas também de monitoramento de como estão os avanços no diagnóstico e prevenção do câncer. A medicina moderna vem trabalhando novas metodologias de detecção, que permitem um diagnóstico precoce visando em um tratamento personalizado, com menor efeitos tóxicos, com o objetivo de prolongar a sobrevivência dos pacientes (SALETTI et al., 2015).

Nos últimos anos, devido a possibilidade de identificar alterações genéticas e expressões fenotípicas, pesquisadores têm identificado alvos específicos potenciais para o tratamento do câncer (DEL DEBBIO et al., 2007). Através destas descobertas foi possível o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, que são imunoproteínas capazes de reconhecer e ligar-se a antígenos tumorais específicos que desencadeiam respostas imunológicas antitumorais. Estes anticorpos monoclonais poupam as células normais e por isso possuem efeitos menos tóxicos que a quimioterapia convencional (SALETTI et al., 2015). No

tratamento do CCR o uso de anticorpos monoclonais é considerado como terapia de primeira linha, sendo Cetuximabe o anticorpo mais recomendado. Este anticorpo liga-se ao EGFR bloqueando a sinalização para as vias RAS, RAF e PIK3 resultando na indução de apoptose da célula (FORNASIER et al., 2018).

Entretanto para o paciente poder fazer uso do Cetuximabe é necessário que faça um investigação molecular para descartar polimorfismos (BRUERA et al., 2018). Mutações nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* são os principais indutores de resistências ao tratamento monoclonal, estes genes resistem a atividade monoclonal e permanecem em seu estado ativo mesmo sem a indução do estímulo proveniente do *EGFR*, levando assim a continuidade da proliferação de células malignas (BARDELLI et al., 2010).

Em 2015, o Ministério da Saúde, por meio da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC), decidiu pela não incorporação do cetuximabe como tratamento de primeira linha disponível pelo Sistema Único de Saúde (SUS), como justificativa apareceram o alto custo do medicamento. Contudo, para pacientes com CCR metastático com expressão de *EGFR*, sem mutação nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* os anticorpos monoclonais são considerados aditivos de primeira linha e de grande eficácia no tratamento (GATTENLOHNER et al., 2009). Desta forma, destaca-se a importância de conhecer as bases moleculares, avaliando as características biológicas de cada indivíduo através de pesquisas nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* considerados biomarcadores modernos e seguros (TOL et al., 2010; KHAN et al., 2017).

O presente estudo tem como objetivo comparar a prevalência de mutações nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* identificadas por *High Resolution Melt* (HRM) e por sequenciamento e caracterizar perfil epidemiológico de pacientes que realizaram a retirada cirúrgica de tumores colorretais..

2 PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESES

2.1 Pergunta de pesquisa

Existe diferença na prevalência de mutações nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* identificadas por HRM e por sequenciamento? Qual o perfil epidemiológico de pacientes que realizaram a retirada cirúrgica de tumores colorretais no hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul?

2.2 Hipóteses

H1 – A frequência de polimorfismos nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* é igual a descrita na literatura para pacientes portadores de câncer colorretal.

H2 – As técnicas de genotipagem por HRM e sequenciamento são eficazes para análise de polimorfismos nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA*.

H3 – A frequência de polimorfismos nos genes *KRAS* e *BRAF* são maiores que a do gene *PIK3CA* para portadores de câncer colorretal.

H4 – O perfil epidemiológico dos pacientes com câncer colorretal atendidos da Região do Vale do Rio Pardo é o mesmo descrito pela literatura.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a prevalência de mutações nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* identificadas por HRM e por sequenciamento e caracterizar perfil epidemiológico de pacientes que realizaram a retirada cirúrgica de tumores colorretais.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar o perfil epidemiológico dos pacientes com tumores colorretais;
- Avaliar a frequência de polimorfismos dos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* em pacientes portadores de câncer colorretal por diferentes técnicas de genotipagem;

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Carcinogênese

A carcinogênese é o processo de formação do câncer, que representa um grupo de doenças genéticas complexas que acometem as células somáticas do organismo, nas quais são responsáveis pela formação de tecidos e órgãos. Todos os cânceres possuem duas características fundamentais: a proliferação descontrolada, caracterizada por crescimento e divisão de células anormais, e as metástases, processo de disseminação e invasão de células tumorais pelos tecidos (KUFÉ et al., 2010). A proliferação descontrolada de células anormais surge através da alteração do material genético (DNA) principalmente em genes de controle de expressão ou regulamentação gênica (JORDE et al., 2000). Conhecidas também como mutações genéticas, estas células cujo DNA está alterado recebem informações erradas e iniciam uma atividade descontrolada, resultando na formação de tumores malignos, que apresentam crescimento invasivo e metastático, ou tumores benignos, que crescem lentamente e não perturbam a função normal do tecido, ao menos, que comprimam estruturas do organismo (HANAHAN, WEINBERG, 2000; SHACTER, WEITZMAN, 2002; OLIVEIRA et al., 2007)

O processo carcinogênico se divide em três etapas: iniciação do tumor, promoção do tumor e progressão do tumor (KUFÉ et al., 2010). A primeira etapa da carcinogênese, iniciação do tumor, já é caracterizado por alterações genéticas irreversíveis, porém as células iniciadas ainda não são consideradas neoplásicas e, podem permanecer em estado latente por semanas, meses ou anos, estas células não possuem diferenciação, são semelhantes as demais células, mas apresentam mutações e induzem a proliferação de forma simétrica (TROSKO, 2001, 2003; SHACTER, WEITZMAN, 2002; OLIVEIRA et al., 2007).

Na segunda etapa carcinogênica, as células iniciadas, sofrem efeitos genotóxicos por oncopromotore que promovem sua transformação maligna devido sua atividade de mitogênese, estimulando a célula a se dividir, se indiferenciar e sobreviver à apoptose (PITOT, DRAGAN, 1991;TROSKO, 2001). A promoção é um estágio reversível, com o desaparecimento do agente promotor, pode ocorrer a regressão na proliferação celular por apoptose. Exemplos de fatores de promoção são componentes químicos dos medicamentos, dos alimentos ingeridos e exposição exagerada a hormônios (CHEN et al., 2010).

A progressão tumoral compreende na transformação do tumor maligno, é a etapa mais extensa, caracterizada pela irreversibilidade, instabilidade, rápido crescimento, potencial

invasivo, metastização e também das alterações nos processos bioquímicos, metabólicos e morfológicos da célula (PITOT, DRAGAN 1991; DIXON, KOPRAS, 2004). A aquisição de um fenótipo angiogênico é essencial para a progressão neoplásica, pois ele procede o desenvolvimento de pequenos vasos sanguíneos que nutrem e estimulam o crescimento do tumor adquirindo uma maior malignidade (NYBERG et al., 2005).

De forma histológica, o tumor colorretal se desenvolve a partir da degeneração do epitélio colônico que subsequente desenvolve uma lesão pré-maligna denominada pólipó adenomatoso (SANTA HELENA et al., 2017). O CCR pode ocorrer de forma hereditária, isto é, em indivíduos com predisposição familiar, ou de forma esporádica, onde não se identifica nenhuma condição predisposta no paciente (VALARINI et al., 2011). A agressividade deste câncer está relacionada a sua capacidade de ativação de múltiplas vias de sinalização, como a do EGFR, as vias das proteínas RAS, RAF ou PIK3. Estas são proteínas quinases ativadas por mitógeno, nas quais pertencem a uma família de serino-treonina quinases, que formam as principais vias de sinalização e proliferação celular desde a superfície da célula até o núcleo (MCCUBREY et al., 2007; BRUERA et al., 2018). A identificação destas principais proteínas proporcionam uma melhor compreensão da doença, bem como contribui para um diagnóstico precoce, no qual facilita o tratamento do câncer (GARNIS et al., 2004; DANTAS et al., 2009; GUO et al., 2018). Devido aos inúmeros aspectos genéticos e histopatológicos envolvidos na carcinogênese do CCR é de extrema importância a análise anátomo-patológica do tumor juntamente com análise das vias de sinalização moleculares (MARTINEZ et al., 2018). Desta forma, os resultados da análise morfológica tumoral é classificada pelo método de Dukes e pela classificação de tumores malignos (TNM), que está presente na tabela 1 como padrão para o estadiamento de infiltração tumoral e pesquisa de metástases linfonodais (DUKES, 1932; PINHO, 2005; MARTINEZ et al., 2018).

Tabela 1 - Estadiamento clínico dos tumores de câncer colorretal.

Estágios	CLASSIFICAÇÃO TNM			ESTADIAMENTO
	<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	Classificação de Dukes
<i>0</i>	T0	N0	M0	Não há presença de tumor primário
<i>I</i>	T1	N0	M0	A - Tumor limitado a mucosa, linfonodo negativo
	T2	N0	M0	B1 – Tumor além da mucosa, mas limitado a parede intestinal, linfonodo negativo
<i>II</i>	T3	N0	M0	B2 – Tumor além da parede intestinal, linfonodo negativo
	T4	N0	M0	B3 – Tumor aderido ou invadindo órgão adjacentes, linfonodo negativo
<i>III</i>	T1, T2	N1	M0	C1 - Tumor aderido ou invadindo órgão adjacentes, linfonodo positivo
	T3, T4	N1	M0	C2, C3 – 1 a 3 linfonodos positivos
	Qualquer T	N2	M0	C1,C2,C3 -> 4 linfonodos positivos
<i>IV</i>	Qualquer T	Qualquer N	M1	D – Metástase distante

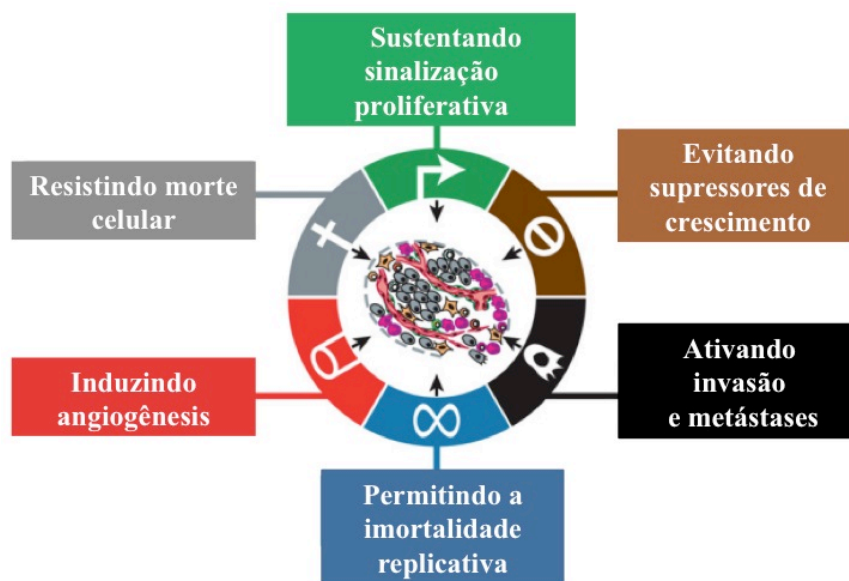
Legenda: T- tumor T0 – não há presença de tumor T1,2,3,4 – tamanho do tumor
N- linfonodos N0- não há visualização de linfonodos N1,2 – linfonodos positivos
M – Metástase M0 – Metástases não encontradas M1 –Metástases distantes

FONTE: (DUKES, 1932; AJCC, 2017)

4.2 Hallmarks do câncer

As marcas registradas do câncer (*hallmarks*) é um princípio organizador publicado pelos pesquisadores Hanahan e Winberg (2000), a proposta publicada consiste em seis marcas estruturais lógicas para compreender a diversidade das doenças neoplásicas (HANAHAN, WINBERG, 2000; 2011). O objetivo principal dos *hallmarks* é fornecer uma organização das propriedades celulares descobertas durante a transformação do fenótipo de células normais para um estágio de crescimento benigno ou para uma evolução maligna (FOUAD, AANEI, 2017). Estas primeiras seis marcas tem como delineamento patológico a sustentação da sinalização proliferativa; evasão dos supressores de crescimento; ativação de processos invasivos e metastáticos; imortalidade replicativa; indução da angiogênese; e resistência a morte celular (Figura 1)(HORNE et al., 2015; WILBUR et al., 2017).

Figura 1 - Seis primeiros *hallmarks* do câncer



Legenda: Ilustração demonstrando as seis primeiras marcas originalmente propostas por Hanahan & Winberg no ano de 2000. Fonte: adaptado de: HANAHAN, WINBERG, 2011

A capacidade de sustentar a proliferação é um traço fundamental das células cancerosas. Em tecidos normais, há o controle de liberação de sinais promotores de crescimento que regulam o ciclo celular rigidamente, garantindo uma homeostase do número de células e assim conferindo a manutenção da função dos tecidos normais (MALUMBRES, BARBACID, 2009; WITSCH et al., 2010). Porém, as células cancerosas, ao adquirir a capacidade de sustentar a proliferação, desativam estes controles e iniciam a sinalização descontrolada. Os sinais de ativação são emitidos por fatores de crescimento ligados a um mitógeno na superfície celular, constituídos por domínios intracelulares de proteínas tirosina-quinase responsáveis pela regulação de progressão do ciclo celular, bem como o crescimento e sobrevivência celular (HANAHAN, WINBERG, 2011; FOUAD, AANEI, 2017).

Além da capacidade de induzir e sustentar positivamente sinais estimulantes de crescimento, as células cancerígenas também podem contornar programas de regulação da proliferação celular. Este programa celular regulamentar é realizado por genes supressores de tumor, que operam limitando o crescimento e proliferação celular (HANAHAN, WINBERG, 2011). Um regulador chave é a proteína retinoblastoma (RB), que desempenha um papel importante na diferenciação celular. Esta proteína traduz sinais dos inibidores de crescimento ao TP53, proteína chave da expressão gênica muito utilizada para o diagnóstico do câncer, que detecta anormalidade dos sistemas operacionais intracelulares da célula, como o grau do dano ao genoma, sinais promotores do crescimento, níveis baixos de glicose ou oxigenação, e se caso algum esteja fora das condições ideais o TP53 pode interromper a progressão do ciclo celular levando a célula à apoptose (KIM et al., 2015; STRACQUADANIO et al., 2016).

A característica que define malignidade do câncer é a capacidade das células cancerosas invadir tecidos vizinhos e formar tumores secundários (STEEG, 2006). Para o surgimento da invasão de metástase é necessário que ocorram uma série de eventos, como por exemplo: a capacidade de invadir matrizes extracelular; o intravasamento na vasculatura tumoral; sobrevivência de metástases circulatórias; o poder de extravasar parênquimas de órgãos distantes; e sobrevivência e manipulação de microambientes como forma colonizadora de metástases (VALASTYAN, WEINBERG, 2011; MASSANGUÉ, OBENAUF, 2017). A atividade invasora das células cancerosas são resultados de metástases policlonais que migram coletivamente pelo organismo humano. As células epiteliais são imóveis e firmemente aderentes uma as outras, a invasão dessa barreira epitelial está ligada a transição epitélio-mesenquimal (EMT) no qual sofre mudanças bioquímicas reversíveis que permitem um célula epitelial polarizada para adquirir um mesênquima fenótipo (KALLURI, WEINBERG, 2009; YE, WEINBERG, 2015; FOUAD, AANEI, 2017).

Assim como tecidos normais, os tumores necessitam de nutrientes e oxigênio, bem como a capacidade de evacuar resíduos metabólicos e dióxido de carbono. A neovasculatura associada ao tumor, gerada pelo processo de angiogênese supre esta necessidade (HANAHAN, FOLKMAN, 1996). Durante a embriogênese, o desenvolvimento da vasculatura envolve o nascimento de novas células endoteliais e criação de novos vasos, denominado de vasculogênese (HANAHAN, WINBERG, 2011). A angiogênese é o processo de brotamento, divisão, migração e montagem de células endoteliais de vasos já existentes, isto é, há uma remodelação de redes vasculares primitivas, que normalmente surgem em eventos pós-natais, feridas, ciclo produtivo feminino e inflamação crônica (HANAHAN, FOLKMAN, 1996). Nestes eventos, a angiogênese é autolimitada, podendo ser ativada, desligada, ou prolongada conforme a sua regulação anti-angiogênica. No processo carcinogênico a angiogênese é continuamente ativada, sendo a hipoxia o gatilho mais importante, onde as células epiteliais possuem mecanismos de sensibilidade ao oxigênio que expressam sinais a via de sinalização dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF), via que codifica genes envolvidos no crescimento de novos vasos sanguíneos no período embrionário, pós natal e em situações fisiológicas e patológicas em adultos (CAMELIET, 2000; CAMELIET, JAIN, 2000; YANG et al., 2013).

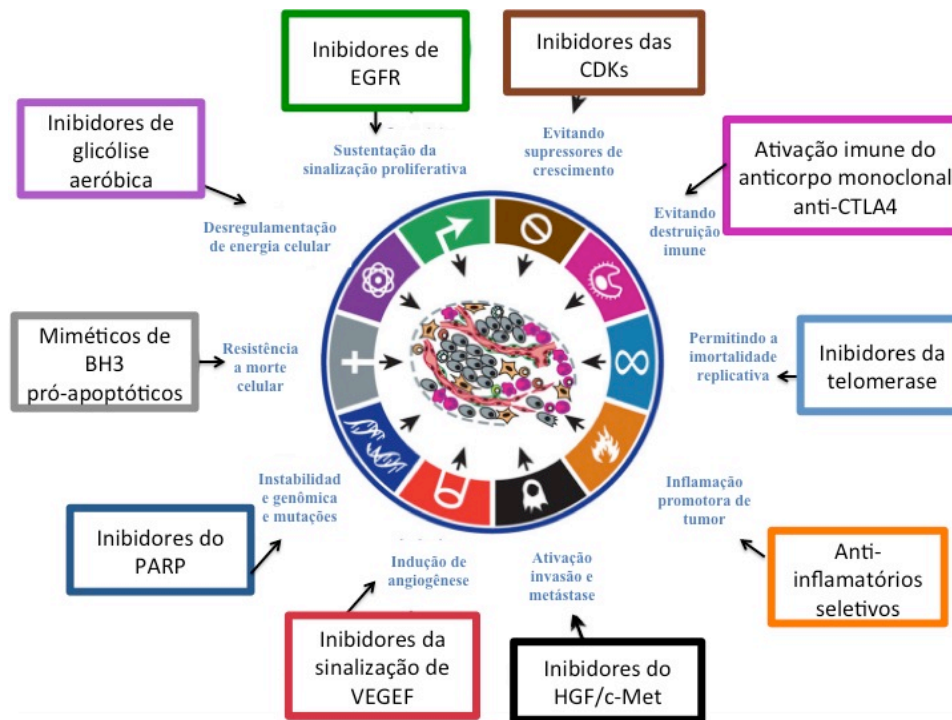
Uma barreira natural contra o câncer é a morte celular programada por apoptose. A apoptose é induzida pelo níveis de estresse que a célula sofre durante a formação do câncer, porém algumas células cancerosas podem superar a resposta apoptótica por mecanismos de inativação envolvendo o gene *p53*, perda de proteínas pró-apoptóticas e inibição da protease caspase (ADAMS, CORY, 2007; LABI, ERLACHER, 2015). Esta multiplicidade de mecanismos de prevenção de apoptose refletem a diversidade de sinais indutores existentes das células cancerígenas durante a sua evolução para o estado maligno (HANAHAN, WINBERG, 2011; FOUAD, AANEI, 2017). Outro programa efetivo importante na resistência a morte celular, é a autofagia, que permite que a célula sobreviva a auto níveis de estresse, o programa autofágico permite que as células quebrem as organelas celulares, como os ribossomo, mitocôndrias e, permite a reciclagem de catabólicos utilizados na biossíntese e metabolismo energético. Quem realiza esta degradação são os autofagossomos, organelas intracelulares associadas aos lisossomas, que fornecem metabólicos de baixo peso molecular que servem como suporte de sobrevivência para as células cancerosas (MIZUSHIMA, 2007; LEVINE, KROEMER, 2008).

Em uma atualização das *hallmarks* do câncer, foram atribuídas mais duas características, que propôs ser funcionalmente importante para o desenvolvimento do câncer

(LUO et al., 2009; COLOTTA et al., 2009; NEGRINI et al., 2010). A primeira envolve a reprogramação do metabolismo celular e energético, que apoia a proliferação celular contínua, substituindo o programa metabólico operacional da maioria dos tecidos normais. O segunda marca envolve a evasão ativa de células cancerosas de ataque e eliminação de células imunes, esta capacidade destaca a dicotomia de funções do sistema imunológico que tanto antagoniza como aumenta o desenvolvimento e progressão do tumor (HANAHAN, WINBERG, 2011).

Cada *hallmark* pode ser categorizada de acordo com sua terapia direcionada (Figura 2). A eficácia de cada uma dessas terapias deve ser avaliada individualmente em cada indivíduo, porém esta seleção terapêutica inclui os principais alvos moleculares específicos atribuído a cada *hallmark*. Tais terapias alvos tem ação inibitória de vias de sinalização chave para crescimento do tumor e, portanto, possuem menos toxicidade. Estas considerações sugerem que o desenvolvimento de medicamentos e protocolos de tratamento se beneficiaram dos conceitos das *hallmarks*, que compõe caminhos de combinações terapêuticos guiados por mecanismos patogênicos interligados um ao outro (HANAHAN, WINBERG, 2011; FOUAD, AANEI, 2017).

Figura 2 - Direcionamento terapêutico das *Hallmarks* do câncer



Legenda: A imagem lista drogas que interferem no crescimento e progressão do tumor em seus respectivos alvos moleculares de acordo com suas *hallmarks*. Fonte: adaptado de: HANAHAN, WINBERG, 2011

4.3 Epidemiologia do câncer

Segundo as estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer tem aumentado no mundo para 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes em 2018. Um a cada 5 homens e uma a cada 6 mulheres desenvolvem câncer ao longo da sua vida e um a cada 8 homens e uma a cada 11 mulheres morrem da doença. A estimativa de sobrevivência após o diagnóstico do câncer é de 5 anos (BRAY et al., 2018). Dados publicados pelo Globocan (2018) sugere que o tipo de câncer mais comum para ambos os sexos é o câncer de pulmão, correspondente a 11,6% dos casos diagnosticados no mundo e 18,4% das causas de morte por câncer, em segundo com 11,6% encontra-se o câncer de mama em mulheres e em terceiro 10,2% o câncer colorretal, dados expressos na tabela 2 a seguir no texto (WHO, 2018).

Tabela 2 – Incidência e mortalidade relacionada aos principais tipos de câncer no mundo.

Tipos de câncer	Nº de novos casos (% no mundo)	Nº de mortes (% no mundo)
Pulmão	2.093.876 (11,6)	1,761,007 (18,4)
Mama	2.088.849 (11,6)	626,679 (6,6)
Próstata	1.276.106 (7,1)	358,989 (3,8)
Cólon	1.042.056 (6,1)	551,269 (5,8)
Melanoma de pele	1.042.056 (5,8)	65,155 (0,7)
Estômago	1.033.701 (5,7)	782,685 (8,2)
Fígado	841.080 (4,7)	781,631 (8,2)
Reto	704.376 (3,9)	310,394 (3,2)

Fonte: GLOBOCAN, 2018.

A incidência é o número de casos novos que ocorrem em um período especificado e em uma área geográfica, transmitido como um número absoluto de casos por ano ou taxas por 100 mil habitantes. Estas taxas auxiliam na realização de estratégias de prevenção primária, que visam diminuir esta medida, ou aumentar o número de detecção precoce da doença no qual resulta ao aumento transitório nas taxas de incidência a medida que são descobertos. Mortalidade é o número de mortes ocorridas em determinada região em um período especificado, é o produto da incidência e a taxa de mortalidade, que calcula a proporção de pacientes diagnosticados que vieram a óbito, assim as taxas de mortalidade medem o risco médio de morte na população de um câncer específico (BRAY et al., 2018). O crescimento rápido da taxa de incidência e mortalidade relacionada ao câncer no mundo, se deve a um

complexo de razões, o crescimento da população, aos fatores de risco relacionado ao desenvolvimento da doença e os fatores de desenvolvimento socioeconômicos (FERLAY et al., 2015).

Foram registrados acima de 1,8 milhões de novos casos e 881.000 mortes estimadas de CCR no mundo. É o terceiro tipo de câncer mais incidente e o segundo mais mortal. As taxas de mortalidade variam de acordo com a região geográfica, 55% dos novos casos ocorrem em países mais desenvolvidos, 52% dos óbitos acontecem em países menos desenvolvidos, observando então maiores incidências e menores taxas de mortalidade em países da Europa e menores estimativas na África Ocidental, refletindo a baixa sobrevida nessas regiões (FERLAY et al., 2015; BRAY et al., 2018).

No Brasil, há a estimativa de 36.360 novos casos, sendo 17.380 homens e 18.980 mulheres, correspondendo ao risco estimado de 16,83 novos casos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres. É o terceiro câncer mais frequente em homens e o segundo entre as mulheres. É mais frequente na Região Sudeste 23,29/100 mil habitantes e o terceiro nas Regiões Sul com 22,17/100 habitantes e no Centro Oeste com 16,95/100 mil habitantes. Em 2015 ocorreram 8.163 óbitos por CCR em homens e 8.533 em mulheres (INCA, 2018).

As diferenças geográficas refletem na incidência possivelmente pelos hábitos de vida, o CCR é uma doença desencadeada por fatores genético, como histórico familiar, e ambientais relacionado ao estilo de vida, que envolve o consumo de bebidas alcoólicas, alimentação pobre em frutas e vegetais, consumo de carnes vermelhas e alimentos industrializados, obesidade, tabagismo e sedentarismo (HARRISS et al., 2009; BOUVARD et al., 2015). O risco de desenvolver o CCR aumenta com a idade, 90% dos casos são diagnosticados em indivíduos com 50 anos ou mais (ACS, 2014). Em estágio inicial não apresenta sintomas, podendo variar de 2 meses até 10 meses o aparecimentos dos sintomas e diagnóstico. Entre os sintomas mais comuns estão, as dores abdominais, prisão de ventre, sangramento anal, sangue nas fezes, diarreia e inchaço abdominal. Por isso é de extrema importância a avaliação médica, realizando exames de rastreamento, como por exemplo sangue oculto nas fezes, pesquisa de DNA fecal e colonoscopia (SANTOS JUNIOR, 2008).

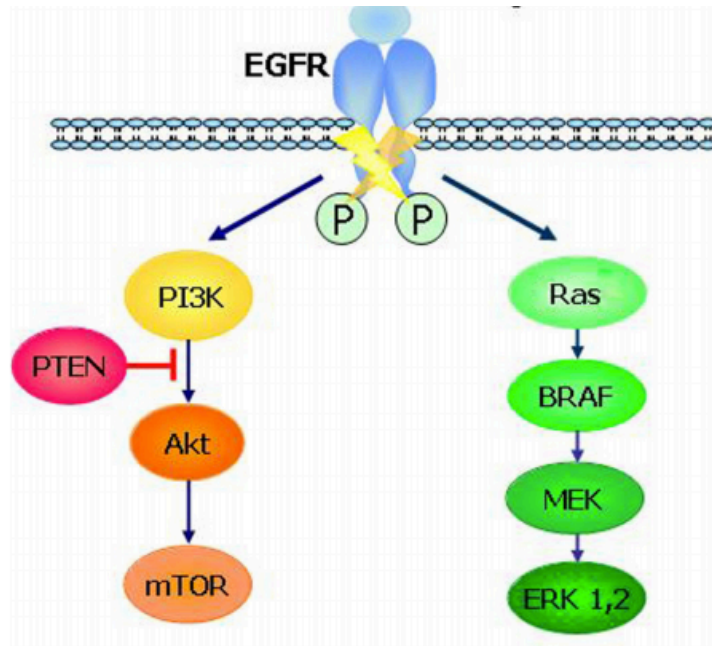
4.4 Genes envolvidos nas vias de sinalização do CCR

4.4.1 EGFR

O EGFR é formado por uma família de proteínas HER/ERBB, é um receptor de tirosina quinase (RTK), que controla as vias de sinalização MAPK1 (ERK1/2), MAPK2 (RAS/RAF) e AKT (PIK3) que estimulam a proliferação, diferenciação, motilidade, sobrevivência celular, e o desenvolvimento de tecidos (Figura 3) (WANG et al., 2006). O gene EGFR está localizado no cromossomo 7 humano na região p11.2, contém 28 exóons e abrange quase 200kb (REITER et al., 2001). A molécula EGFR é constituída por 3 regiões, uma fora da célula contendo os sítios de ativação na porção N-terminal; uma na membrana; e uma no domínio C-terminal intracelular (KRAUSE, VAN ETTEN, 2005). O mecanismo de ativação do EGFR se dá inicialmente pelo meio extracelular, onde há o reconhecimento do fator de crescimento, um mitógeno *TGF α* , que ancora a atividade tirosina-quinase (TK) para meio intracelular promovendo a autofosforilação do seu domínio C-terminal. A transdução destes sinais ocorre por meio de interação de proteínas que contêm um domínio *SH₂* ou um domínio de ligação a fosfotirosina (KIM, CHOI, 2015).

Mutações envolvendo o EGFR podem causar a sua constante ativação, levando a proliferação celular descontrolada. Este receptor tem sua via de sinalização alterada em aproximadamente 30% de todos os tipos de câncer e podendo chegar a 90% nos casos de câncer de pulmão (FANG, 2005). As mutações genéticas descobertas no EGFR são encontradas normalmente no domínio de ligação ao ATP e estão associadas a respostas aos inibidores de tirosina quinase (LYNCH et al., 2004; PAEZ et al., 2004). Cerca de 90% das mutações são encontradas em pequenas regiões do gene entre os exóons 18 e 24. De 45% a 50% das mutações encontram-se no exón 19, entre os códonos 746 e 750. E 35% a 45% ocorrem no exón 21, no códon 858, onde há a substituição de uma arginina por leucina (L858R) (MITSUDOMI, 2014; PANJKOVIC et al., 2014; NISHII et al., 2017). Na tabela 3 contém os resultados de diversos estudos realizados sobre a frequência de mutações no gene EGFR.

Figura 3 - Via de sinalização celular dos genes KRAS, BRAF e PIK3CA



Legenda: A imagem mostra a via de sinalização *MAPK2* e *AKT*, mediada pelo gene de ativação EGFR.

Fonte: (SALLETI et al., 2015)

Tabela 3 – Frequências de mutações no gene EGFR

Mutação	Frequência N (%)	Referência
EGFR gene	10.687 (39,6)	Yatabe et al., 2015, Asia
EGFR gene	33 (9)	Khan et al., 2017, Estados Unidos
EGFR gene	261 (59,7)	Mok et al., 2009, Asia

Fonte: (MOK et al., 2009; YATABE et al., 2015; KHAN et al., 2017)

4.4.2 KRAS

O oncogene do Sarcoma do rato de Kristen (*KRAS*) pertence à família de proteínas RAS (*KRAS*, *NRAS* E *HRAS*) que codificam as proteínas de ligação à guanosina-5-trifosfato (GTP). Está localizado no cromossomo 12 humano na região p12.1, contém 6 exóons e abrange 58kb. É um efetor de sinalização importante ligado ao EGFR, fosforila seu sinal através do valina 600 (*BRAF*), podendo também ativar fosfatidilinositol-3-quinase (PIK3) através da interação direta com sua subunidade catalítica. Cerca de 22% à 57% de pacientes portadores de CCR

possuem mutações no gene *KRAS*, 85% a 90% ocorrem no exón 2 nos códons 12 ou 13 e 5% estão presentes no exón 3 e 4 nos códons 61 e 146 (ALLEGRA et al., 2009; BARDELLI et al., 2010; ROOCK et al 2011).

Para exercer seu papel de sinalização *KRAS* pode permanecer em dois estados, ativo ligado à molécula de GTP e inativo, quando a GTP hidrolisa a difosfato de guanosina (GDP). A ativação da proteína *KRAS* ocorre através da fosforilação dos sinais emitidos pelo EGFR, que ativam proteínas denominadas *Guanine Exchange Factors* (GEFs), que ao reconhecerem *KRAS* na sua forma inativa promovem a troca das moléculas hidrolisadas GDP por GTP, tornando um gene ativo. A inativação de *KRAS* é feita pelas *Activating Proteins* (GAPs), proteínas que reconhecem a forma ativa de *KRAS* e com sua atividade enzimática GTPase, hidrolisa GTP em GDP. Quando ocorrem mutações no gene *KRAS*, principalmente nos códon 12 e 13 correspondente a porção de interação aos GAPs da proteína ou no códon 61 que corresponde ao sítio catalítico, desestabilizam a atividade da *GTPase*, fazendo com o que *KRAS* permaneça em sua conformação ativa ligada ao GTP, induzindo a proliferação celular e resistência à apoptose (HUNTER et al., 2015; BRUERA et al., 2018). Pode ser visualizado na tabela 4 as frequências das mutações encontradas em diferentes estudos.

Tabela 4 – Frequências de mutações no gene *KRAS*

Mutação	Frequência	Referência
KRAS códons 12/13	217 (28%)	Rosty et al., 2013, Austrália
KRAS códons 12/13	14 (42%)	Khan et al., 2017, Estados Unidos
KRAS códons 12/13	1 (2,4%)	Pappen, 2017. Brasil
KRAS códon 61	5 (8%)	Loupakis et al., 2009, Reino Unido
KRAS códon 146	40 (3,2%)	Imamura et al., 2014, Estados Unidos

Fonte: (LOUPAKIS et al., 2009; ROSTY et al., 2012; IMAMURA et al., 2014; KHAN et al., 2017; PAPPEN, 2017)

4.4.3 BRAF

Mutações em *BRAF*, também conhecido por valina 600 (V600), ocorrem aproximadamente em 10% dos CCR, e podem chegar em 15% em todos os tipos de canceres. O gene está localizado no braço longo do cromossomo 7 humano na posição q34, encontra-se conjunto com seu gene de fusão A-quinase proteína ancora (AKAP9), no qual corresponde

aos exóns 1 ao 8, e *BRAF* exóns 8 ao 18 que possui aproximadamente 2,4kb (HUSSAIN et al., 2014). Cerca de 80% do *BRAF* mutado são *V600E* (1799T>A), alteração de nucleotídeo que resulta na troca do aminoácido 600, exón 15, que substitui uma glutamina por uma valina, levando à ativação constitutiva da atividade quinase. O gene *BRAF* é um importante integrante da via MAPK2 mediado pelo EGFR, é ativado pela *GTPase* proveniente de RAS, que além de afetar os fatores de crescimento sua alteração pode influenciar os processos celular chave, como migração celular, sobrevivência celular e apoptose (AHRONIAN et al., 2015; BARRAS., 2015; ODDO et al., 2016).

Este gene é muito utilizado para prognóstico metásticos, presente em 25% dos pacientes com CCR. Estudos associam que mutações em *KRAS* e *BRAF* estejam relacionados a metástases hepáticas, frequentes em 75% dos casos, sendo 10% encontradas no momento do diagnóstico de CCR e 15 à 25% desenvolvem ao longo dos três anos após a ressecção do tumor primário (HUANG et al., 2013; UMEDA et al., 2013). As diferentes frequências de mutações encontrados por outros autores estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 – Frequências de mutações no gene BRAF

Mutação	Frequência	Referência
BRAF códon 600	56 (7,9%)	Richman et al., 2009, Reino Unido
BRAF códon 600	78 (15,2%)	Vaughn et al., 2011, Estados Unidos
BRAF códon 600	60 (6%)	Van Cutsem et al., 2011, Hungria

FONTE: (RICHMAN et al., 2009 ; VAUGHN et al., 2011 ; VAN CUTSEM et al., 2011)

4.4.4 PIK3CA

O gene polipeptídeo alfa fosfatidilinositol-3-quinase catalítico (*PIK3CA*) corresponde a subunidade catalítica (p110 α) do PI3K, localizado na posição *q26.32* no braço longo do cromossomo 3, consiste em 20 exóns e possui aproximadamente 34kb (VOLINIA et al., 1994). Este gene é capaz fosforilar de moléculas sinalizadoras, que desencadeiam reações que transmitem sinais químicos dentro das células. Sua sinalização é de extrema importância para muitas atividades celulares, incluindo crescimento e divisão celular, movimento de células e sobrevivência celular. *PIK3CA* também está envolvido na regulação de vários hormônios e atua na maturação de células de gordura (adipócitos) (SOUZA et al., 2014).

Faz parte de uma família de quinases lipídicas dividida em dois subgrupos, o subgrupo IA unidade catalítica e subgrupo IB unidade reguladora (BRUHN et al., 2013; HAO et al., 2016). A ativação da via de sinalização tem início na ligação de RTKs e receptores acoplados a proteína G que recrutam as PIK3 cistosólicas (STEPHENS et al., 1994). Sua ativação consiste em catalisar a formação PIP3 e PIP2 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato e osfatidilinositol-4,5-bifosfato) responsável pela tradução do sinal de interação com proteínas de domínio homólogo a PH (pleclestrina) (CORVERA, CZECH, 1998). Entre elas estão as AKT (serina-treonina quinase) uma proteína efetora do PIP3, é ativada por mecanismo de translocação e ancoramento na membrana plasmática através do PH, sendo em seguida fosforilada em treonina 308 e serina 473 pelas proteínas quinases PDK (3-fosfoinosídeo quinase-1) e proteína reguladora alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC2), tornando a via AKT completamente ativa e capaz de fosforilar múltiplos substratos (ZHAO, VOGT, 2008; SOUZA et al., 2014).

Mutações no *PIK3CA* ocorrem em 15-18% dos CCR, mais de 80% ocorrem no exon 9 e 60% no exón 20 (Tabela 6). Ocorrem simultaneamente em 20% à 25% com as mutações de *KRAS* ou *BRAF* (ROOCK et al., 2011). Está relacionado ao ganho de funções e metástase linfonodal (FENIC et al., 2007; DU et al., 2013). O aumento da expressão gênica do *PIK3CA* surge tardiamente na tumorigênese, coincidindo com a invasão de células malignas além da localização do tumor primário, ou seja encontra-se em tumores metastáticos (SAMUEL et al., 2004; PEDRERO et al., 2005).

Tabela 6 – Frequências de mutações no gene PIK3CA

Mutação	Frequência	Referência
PIK3CA exón 9	4 (13,6%)	Sartore-bianchi et al., 2009, Itália
PIK3CA exón 9	78 (74%)	Rosty et al., 2013, Austrália
PIK3CA exón 20	5 (35,7%)	Algars et al., 2017, Finlândia
PIK3CA exón 20	6 (2,7%)	Lasota et al., 2016, Finlândia

FONTE: (SARTORE-BIANCHI et al., 2009; ROSTY et al., 2013; LASOTA et al., 2016; ALGARS et al., 2017)

4.5 Terapia monoclonal

Os anticorpos monoclonais são antineoplásicos muito utilizados no tratamento do câncer, como terapia alvo, possuem poucos efeitos colaterais e alta especificidade. Eles são usados individualmente ou acoplados com outro quimioterápico (SANTOS et al., 2002). Esta terapia utiliza imunoproteínas que se ligam a antígenos tumorais específicos, desencadeando resposta imunológicas. Seu mecanismo de ação resume em bloquear os receptores de crescimento celular, induzindo a apoptose (FORNASIER et al., 2018). O objetivo do tratamento pode ser curativo, tratamento imediato ou tornando o tumor potencialmente ressecável, ou pode ser paliativo, com objetivo de prolongar a sobrevida e controlar os sintomas para melhorar a qualidade de vida (SCHMOLL et al., 2012; SALETTI et al., 2015).

A terapia utilizando o cetuximabe vem demonstrando ser eficiente para o CCR, este quimérico monoclonal recombinante do anticorpo *IgG1* liga-se ao *EGFR* bloqueando a fosforilação e ativação das quinases associadas aos receptores (MAPK e AKT) (FORNASIER et al., 2018). É administrado por via intravenosa através de uma bomba de infusão, uma hora antes da administração os pacientes devem receber anti-histamínicos para evitar reações alérgicas. Sua infusão deve ser administrada entre 1h à 2h e sua dose varia entre 250mg/m² à 400mg/m². Tem um longo tempo de meia vida, aproximadamente 112h. Pode ser combinado com os quimioterápicos irinotecano, ácido folínico, fluorouracil e oxaliplatina (FOLFOX) (DEL DEBBIO et al., 2007) .

Porém, hoje sabe-se que há mecanismos que geram resistência ao tratamento monoclonal. Avaliar polimorfismos nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* pode ser útil para selecionar pacientes aptos a receber a terapia *anti-EGFR*. O mecanismo de resistência funciona da seguinte forma, o anticorpo monoclonal cetuximabe mesmo se ligando ao receptor *EGFR*, os genes alterados permanecerão ativados, independente da sinalização de *EGRF*, causando assim a continuidade na proliferação aberrantes de células tumorais (BARDELLI et al., 2010).

4.6 Métodos de diagnóstico moleculares

4.6.1 Sequenciamento genético

O crescimento das pesquisas médicas estão cada vez mais relacionada a genética, o uso de testes laboratoriais está cada vez mais frequentes e presente em todas as fases da cadeia da saúde: prevenção, diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico. Com a evolução da biologia molecular foi possível realizar análises de biomarcadores tumorais por sequenciamento genético. Esta técnica busca descobrir a sequência de bases nitrogenadas que constituem a dupla fita do DNA de uma região alvo. Em 1977 Frederick Sanger desenvolveu sequenciamento pelo método enzimático (CAMPANA et al., 2011).

O modelo Sanger consiste em adicionar didesoxiribonucleotídeos (ddNTP's), nucleotídeos que possuem o grupamento OH livre no carbono 3' da pentose, quando as ddNTP's ligam-se com a fita de DNA, com a ausência do OH, o próximo nucleotídeo não consegue ligar e a replicação da fita para. Este método dominou o mercado por 30 anos, porém com a evolução da medicina personalizada exigiu-se desenvolvimento de novos equipamentos capazes de gerar informações sobre milhões de pares de bases em um curto período. Estas novas plataformas permitem gerar análises muito mais precisas e com uma grande economia de custos para o sequenciamento. O aumento da especificidade se deu pelo início da utilização de fluorocromos nas reações, que emitem sinais fluorescentes detectados por lasers de absorção que permite identificar cada nucleotídeo, este sinal é enviado para um software de análise no qual de forma informatizada fornece os resultados em eletroferogramas e sequências FASTA (DORR et al., 2014).

4.6.2 *High Resolution Melting*

A medicina personalizada é uma das tendências na assistência médica, porém diversas dificuldades são encontradas na introdução dos testes genéticos devido ao alto custo dos equipamentos para laboratórios clínicos. Recentes avanços utilizando fluoróforos, criou instrumentos e softwares que analisam a dissociação do DNA. A análise de fusão por alta resolução (*High resolution melting* ou HRM) é rápida, simples e de menor custo. Um método pós PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizado para identificar polimorfismos nas sequências específicas, onde é marcado por um fluorocromo, similar a PCR em tempo real

são detectados por softwares, porém é utilizada uma rampa de desnaturação para captura dos dados. Os resultados são apresentados em curvas de *melting* utilizando gráficos que quantificam o nível de fluorescência a aumentar de acordo com o aumento da temperatura. Desta forma, é possível distinguir a presença ou ausência de mutações, assim como identificar diferentes tipos de mutações no mesmo gene amplificado (WITTEWER, 2009). O HRM é uma técnica altamente sensível que permite detectar mutações em amostras contendo 1% à 10% de células mutadas, enquanto o método de sequenciamento requer de 10% à 30% de células alteradas. Este método também facilita a análise de amostras clínicas que contêm pouco material biológico. Sua boa sensibilidade e especificidade demonstra ser um método preciso para detecções genéticas (AKIYOSHI et al., 2013).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local de pesquisa

O estudo foi realizado com pacientes submetidos a cirurgia de retirada de tumor colorretal no hospital Ana Nery, de Santa Cruz do Sul. E posteriormente as metodologias laboratoriais para as análises dos polimorfismos foram realizadas no Centro de Pesquisa e Treinamento em Biotecnologia (CPTBio), vinculado ao TECNOUNISC, localizado no bloco 55 da Universidade de Santa Cruz do Sul.

5.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com idade acima de 18 anos de ambos os sexos portadores de CCR, que realizarão cirurgia para ressecção de tumor colorretal no Hospital Ana Nery e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes dos quais as amostras coletadas não tenham quantidade suficiente de tecido para realização das técnicas de genotipagem ou que a qualidade do DNA obtido na extração seja insatisfatória.

5.4 Procedimentos metodológicos

5.4.1 Coleta de dados epidemiológicos

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi aplicado um questionário próprio para coleta de dados do paciente, como idade, sexo, presença de comorbidade, hábito tabágico e histórico familiar de câncer do colorretal. Os prontuários clínicos foram acessados através do Centro de Oncologia Integrado do Hospital Ana Nery para obtenção de dados clínicos referentes ao diagnóstico clínico laboratorial e história terapêutica.

5.4.2 Amostras biológicas

Para a análise dos polimorfismos utilizou-se biópsias de tumores de CCR coletadas por patologistas na hora da cirurgia de ressecção tumoral. As mostras foram armazenadas em tampão de EDTA para o transporte até o Centro de Pesquisa e Treinamento em Biotecnologia (CPTBio) localizado no bloco 55 da UNISC e vinculado ao Parque Científico e Tecnológico (TecnoUnisc) e armazenadas à -20°C.

5.4.3 Extração de DNA

A técnica utilizada para a realização da extração do DNA das biópsias, segue um protocolo padronizado no CPTBio, adaptado de Tosti et al (2003): Pesar 12 mg de tecido tumoral e macerar dentro de um ependorf ; adicionar 180 µL de tampão de lise celular; Incubar por 10 minutos a 100°C; adicionar 40 µL de *proteinase K* (10mg/mL); incubar por 3 horas a 55°C; adicionar 600 µL de lise celular; passar no vórtex por 15 segundos; incubar por 30 minutos a 65°C; centrifugar a amostra por 4 minutos a 13000 rpm; em um novo ependorf, adicionar 600 µL de isopropanol e 600 µL de sobrenadante (misturar por inversão e centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm); retirar o sobrenadante, com cuidado para não perder o pellet; adicionar 600 µL de álcool 70 % e inverter o tubo; centrifugar por 2 minutos a 13000 rpm; retirar o etanol; inverter o tubo em papel absorvente e deixar secar por um dia; adicionar

50 µL de solução de reidratação do DNA.

5.4.4 Eletroforese e quantificação da amostra

Para avaliar a qualidade do DNA, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com *Gelred* 1X durante 45 minutos utilizando 150V e 100mAh. Para realizar quantificação do DNA é utilizado o equipamento *NanoDrop* (ThermoScientific Nano Drop 2000c) com parâmetro A_{260}/A_{280} , equivalente a ondas espectrofotométricas específicas para detecção de ácidos nucleicos/proteínas e por final a concentração do DNA deve ser ajustada para 50ng/uL e armazenado a -20°C, até ser utilizado na PCR.

5.4.5 Reações de PCR

A PCR foi padronizada utilizando 150ng de DNA e preparadas com os seguintes reagentes: 1,5mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; Tampão 10x; 0,25 mM de cada primer; 0,5U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen). As condições de ciclagem, de acordo com cada primer segue na tabela 7:

Tabela 7 - Primers e características da amplificação alvo

Gene	Sequencia do primer 5'3'	pb	Ciclagem	Alvo
KRAS	<i>F</i> 5' GTATTAACCTTATGTGTGACA 3'	222pb	94°C 5'	Codón 12 e 13
	<i>R</i> 5' GTCCTGCACCAGTAATATGC 3'		94°C 1' 53°C 1' 72°C 1' 72°C 10' 40 ciclos	
KRAS	<i>F</i> 5' TCTGAAGATGTACCTATGGTCCTAGT 3'	288pb	94°C 5'	Códon 146
	<i>R</i> 5' AAGAAGCAATGCCCTCTCAA 3'		94°C 1' 58°C 1' 72°C 1' 72°C 10' 40 ciclos	

Gene	Sequencia do primer 5'3'	pb	Ciclagem	Alvo
KRAS	F 5'TGCACTGTAATAATCCAGACTGTG 3' R 5'TTAAACCCACCTATAATGGTGAA 3'	229pb	94°C 5' 94°C 1' 57°C 1' 72°C 1' 72°C 10' 40 ciclos	Códon 61
BRAF	F 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' R 5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3'	116pb	95°C 10' 95°C 30' 56°C 30' 72°C 45' 72°C 10' 38 ciclos	Exón 15
PIK3CA	F 5' GGGAAAAATATGACAAAGAAAGCTA 3' R 5' TCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC 3'	198pb	94°C 2' 94°C 15' 60°C 15' 72°C 15' 72°C 5' 45 ciclos	Exón 9
PIK3CA	F 5' TTCTCAATGATGCTTGGCTCTGGAA 3' R 5' AATGCATGCTGTTTAATTGTGTGGA 3'	197pb	95°C 10' 95°C 30' 56°C 30' 72°C 45' 72°C 10' 38 ciclos	Exón 20

5.4.6 Eletroforese do produto de PCR

Com o material genético já extraído e amplificado realizou a técnica de eletroforese em gel de agarose em uma concentração de 2% com tampão *Tris*, *EDTA* e ácido bórico (TBE 1X) aplicando-se 8µl de produto de *PCR* e 2µl de tampão de corrida (azul de bromofenol), utilizando como referência a escala de 100 pb *DNA Ladder* (Invitrogen). O gel foi corado com *Gelred* 1X durante 45 minutos utilizando 150V e 100mAh.

5.4.7 Reação de HRM

A reação de *HRM* utilizou um fluoróforo a 10pM *SYTO* ® (Invitrogen) junto com os demais reagentes da *PCR* convencional 1,5mM MgCl₂; 0,2 mM *dNTP*; Tampão 10x; 0,25

mM de cada primer; 0,5U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen). As condições de ciclagem, seguem na tabela 8.

Tabela 8 - Condições para análise de PCR em alta resolução.

Estágios	Passos	Temperatura	Tempo	Rampa
Curva de <i>melting</i>	Desnaturação	95°C	10seg	100%
	Anelamento	60°C	1min	100%
	Dissociação em alta resolução	95°C	15seg	1%
	Anelamento	60°C	15seg	100%

5.4.8 Purificação do produto de PCR

A purificação da PCR foi realizada utilizando PEG8000/2,5M NaCl. Segundo o protocolo já padronizado no CPTBio. Iniciou-se adicionando em um microtubo 2,5 µL do produto da PCR e 2,5µL de PEG8000/2,5M NaCl e em seguida é misturado no vórtex por 15 segundos. Deve-se incubar a amostra de purificação em banho maria a 37°C durante 15 minutos. Iniciar centrifugação a 12000 rpm durante 10 minutos, descartar o sobrenadante e adicionar 500µL de etanol 50%. Centrifugar novamente a 12000 rpm durante 5 minutos, descartar o sobrenadante e secar levemente a boca do tubo em papel toalha e por final deixar evaporar por uma hora (observar se esta seco, senão deixar mais tempo) e ressuspender com 30µL de água MiliQ (ultrapura) incubando em banho maria a 37°C por 30 minutos.

5.4.9 Sequenciamento

Para o sequenciamento das amostras utilizou-se o equipamento de sequenciamento genético *ABI 3500 Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero *POP7* (Applied Biosystems). Os produtos de PCR purificados foram marcados utilizando 5 pmol primer (os mesmos utilizados na reação de PCR), 1 µL do reagente *BigDye Terminatorv3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 min seguida de 35 ciclos de 96°C por 15

seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram precipitadas com etanol e desnaturadas com formamida para serem eletroinjetadas no sequenciador automático.

5.4.10 Análise dos polimorfismos

As sequências foram analisadas pelo programa *Chromas™* versão 2.3, através dos cromatogramas gerados após o sequenciamento. No programa *BIOEDIT* v7.2.5 serão alinhadas as sequências e comparadas com o alinhamento gerado pelo *BLAST*. A análise da curva de *melting* do *HRM* é realizada no próprio software do equipamento (Applied Biosystems), onde são gerados gráficos de desnaturação da fita de *DNA* avaliando os parâmetros de fluorescência e temperatura. A concordância entre as técnicas foi realizada através do teste de validação de testes diagnósticos no qual mede a especificidade e acurácia da análise.

5.4.11 Análise de dados

As informações geradas a partir das análises genéticas e os dados epidemiológicos serão inseridos no programa de análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0. Os resultados serão apresentados de forma descritiva representada por média aritmética com seu respectivo desvio padrão ($x \pm dp$) ou expressos em frequência (%). Para avaliar as variáveis categóricas utilizará o teste qui-quadrado.

5.4.12 Riscos e benefícios

O risco desta pesquisa é a quebra de confidencialidade dos questionários aplicados pessoalmente ao paciente. Porém, para a redução deste risco é necessário a adoção de postura qualificada, ética e técnica do pesquisador aos participantes da pesquisa.

Avaliar as características biológicas e epidemiológicas de cada paciente contribui para caracterização dos pacientes portadores de CCR do Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul. E pode influenciar indiretamente na escolha terapêutica futura dos pacientes. Os resultados

obtidos na pesquisa também contribuirá para agregação na produção científica da Universidade de Santa Cruz do Sul.

5.4.13 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santa Cruz do sul e, apenas após a sua aprovação, pode ser executado. A participação dos pacientes na pesquisa só ocorreu após a assinatura do termo de esclarecimento livre e esclarecido, o qual explica sobre a pesquisa, bem como assegura sobre a garantia do sigilo. As informações obtidas na pesquisa foram utilizadas para fins científicos e vinculados ao projeto. A pesquisa cumpriu com as exigências da Resolução CNS 466/12 e demais resoluções éticas Brasileiras.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho são apresentados em forma de artigo científico intitulado “COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM HRM E SEQUENCIAMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES *KRAS*, *BRAF* E *PIK3CA*” que será submetido à Revista Brasileira de Coloproctologia (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0101-9880&lng=en&nrm=iso).

Artigo Original

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM POR HIGH RESOLUTION MELT E SEQUENCIAMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA*

Martina Fernanda Gewehr¹, Mario Antônio Ferrari³, Lia Gonçalves Possuelo²

¹Acadêmica de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul

²Professora da Universidade de Santa Cruz do Sul

³Médico no Hospital Ana Nery

RESUMO

Este estudo tem como objetivo comparar a prevalência de mutações nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* identificadas por *HRM* e por sequenciamento e caracterizar perfil epidemiológico de pacientes que realizaram a retirada cirúrgica de tumores colorretais em hospital de referência em oncologia do Rio Grande do Sul. Foi realizado um estudo transversal observacional prospectivo, incluindo pacientes submetidos a cirurgia de retirada de tumor colorretal no período de Março à Junho de 2019 no Hospital Ana Nery, de Santa Cruz do Sul. Para análise dos polimorfismos foi utilizado DNA extraído de biópsias de tumores amplificados por PCR e analisados por sequenciamento e HRM. Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir da revisão dos prontuários e questionários. Foram coletadas 8 amostras de pacientes, 4 mulheres e 4 homens com a média de idade de 59 anos. 50% dos pacientes possuíam histórico familiar para o CCR. A localização dos tumores primários originavam-se no colón (50%) e no reto (50%), 37,5% eram moderadamente diferenciados e 25% apresentaram estadiamento entre T1-T4B, N1-N2b, M0. A especificidade obtida entre os métodos de análise HRM e sequenciamento foi de 100%, com acurácia de 0,625. As técnicas de genotipagem *HRM* e sequenciamento se demonstraram como métodos eficientes para a análise de mutações para os genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA*.

Palavras-chaves: Neoplasias colorretais; Polimorfismo genético; Diagnóstico molecular

ABSTRACT

This study aims to compare *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* genes by **HRM** and by sequencing and to characterize the epidemiological profile of patients who underwent costly coronary tumor surgery at a referral hospital in Rio Grande do Sul oncology. A prospective, including patients with tumor revascularization surgery from March to 2019 at Ana Nery Hospital, Santa Cruz do Sul. Data analysis of *DNA* polymorphisms extracted from biopsies tumors amplified by *PCR* and assay for sequencing and *HRM*. The clinical data of the patients were removed from the review of medical records and questionnaires. Eight patient samples were collected, four women and four men with mean age of 59 years. 50% of the patients had a family history for CCR. The location of the primary tumors originated from colon (50%) and non-rectal (50%), 37.5% were moderately differentiated and 25% staging was T1-T4B, N1-N2b, M0. A specificity obtained between the methods of *HRM* analysis and sequencing was 100%, with accuracy of 0.625. *HRM* genotyping and sequencing techniques were demonstrated as efficient methods for mutation analysis for the *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* genes.

Keywords: Colorectal neoplasms; Genetic polymorphism; Molecular diagnosis

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é a terceiro tipo de câncer mais comum no mundo e o segundo mais mortal. No Brasil estima-se que no ano de 2018 ocorreram 36.360 novos casos, sendo diagnosticados 17.380 homens e 18.980 mulheres. Os valores de incidência e mortalidade podem variar de acordo com a região e hábitos de vida; na Região Sul a frequência é de 22,17 casos a cada 100 mil habitantes¹. Em 2015 foram registrados no Brasil 16.696 óbitos devido a tumores colorretais, em aproximadamente em 50% dos casos. A alta taxa de mortalidade está relacionada aos diagnósticos tardios, no qual ocorre normalmente já no estágio IV da doença^{1,2}.

Os carcinomas colorretais desenvolvem-se a partir da degeneração do epitélio colônico que origina uma lesão pré-maligna denominada pólipos adenomatosos³. Tendem a ser mais agressivos quando possuem alterações genéticas em genes que codificam proteínas de vias de sinalização mediadas pelos receptores de crescimento (EGFR), que em meio extracelular reconhece o fator de crescimento TGF α . Este fator ancora sua atividade tirosina-

cinase para meio intracelular promovendo a autofosforilação do seu domínio C-terminal. Por meio da atividade enzimática GTPase das proteínas *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* estimulam a proliferação e sobrevivência celular^{4,5,6}. Testes moleculares são rotineiramente solicitados para orientar as decisões de tratamento⁷. Exemplo disso é a identificação de biomarcadores preditivos que permite ao paciente um bom prognóstico da doença. A análise mutacional de *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* serve como uma ferramenta para analisar possíveis resistências aos anticorpos monoclonais anti-EGFR, por exemplo ao Cetuximabe quimérico monoclonal considerado tratamento de primeira linha para pacientes com CCR metastático⁸.

O método Sanger de sequenciamento é o mais utilizado para análises de genotipagem de células tumorais, porém com a evolução da biotecnologia nos últimos anos, se fez necessário uma técnica no qual permitisse a realização das análises de forma ultrasensível e rápida⁹. *High Resolution Melting* (HRM) é um método de genotipagem que permite utilizar um equipamento de real-time *PCR*, trazendo resultados mais baratos, rápidos e sensíveis que o sequenciamento. O método HRM utiliza as curvas de *melting* como resultados e leva aproximadamente trinta minutos, mas somente através do sequenciamento genético é possível visualizar as sequências de ácidos nucleicos que constituem a fita de DNA do fragmento de interesse, comprovando a existências de mutações^{10,11}.

Este estudo tem como objetivo comparar a prevalência de mutações nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* identificadas por HRM e por sequenciamento e caracterizar perfil epidemiológico de pacientes que realizaram a retirada cirúrgica de tumores colorretais em hospital de referência em oncologia do Rio Grande do Sul.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal observacional prospectivo, realizado com pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) submetidos a cirurgia de retirada de tumor colorretal no período de Março à Junho de 2019 no Hospital Ana Nery, de Santa Cruz do Sul. Foram incluídos no estudo pacientes acima de 18 anos, de ambos os sexos, portadores de CCR que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Para realização do levantamento dos dados epidemiológicos foi aplicado questionários de pesquisa os pacientes. As variáveis estudadas foram: idade, sexo, presença de comorbidade, hábito tabágico e histórico familiar de câncer. A obtenção de dados clínicos referentes ao diagnóstico laboratorial e histórico terapêutico foi realizada através da análise de prontuários clínicos acessados no Centro de Oncologia Integrado do Hospital Ana Nery.

Para análise dos polimorfismos foram utilizadas amostras biológicas de biópsias de tumores de *CCR* coletadas pelo cirurgião durante as cirurgias de ressecção tumoral. As amostras foram armazenadas em tampão contendo *EDTA* e transportadas ao Centro de Pesquisa e Treinamento em Biotecnologia (CPTBio) vinculado ao Parque Científico e Tecnológico da Universidade de Santa Cruz do Sul (TecnoUnisc) onde foram armazenadas à -20°C. A técnica utilizada para a realização da extração do *DNA* das biópsias, seguiu um protocolo adaptado de Tosti et al (2003)¹². Para avaliação da qualidade do *DNA*, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com *Gelred* 1X durante 45min utilizando 120V e 150mAh. O *DNA* foi quantificado no fluorômetro *Qubit*® 3.0 (Thermo Fisher Scientific) e diluído na concentração de 50ng/uL e armazenado à -20°C. A reação de PCR foi padronizada utilizando a concentração total de 150ng de DNA e preparada com os seguintes reagentes: 1,5mM MgCl₂; 0,2 mM *dNTP*; Tampão 10x; 0,25 mM de cada primer; 0,5U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen). As condições de ciclagem, estão descritas na Tabela 1:

Tabela 1 - Primers e características da amplificação alvo

Gene	Sequencia do primer 5'3'	pb	Ciclagem	Alvo	Referência
<i>KRAS</i>	F 5'GTATTAACCTTATGTGTGACA 3' R 5' GTCCTGCACCAGTAATATGC 3'	222pb	94°C 5' 94°C 1' 55°C 1' 72°C 1' 72°C 10' 40 ciclos	Códo n 12 e 13	Tong et al.(2014)
<i>KRAS</i>	F 5'TCTGAAGATGTACCTATGGTCCTAGT 3' R 5' AAGAAGCAATGCCCTCTCAA 3'	288pb	94°C 5' 94°C 1' 60°C 1' 72°C 1' 72°C 10' 40 ciclos	Códo n 146	Tong et al.(2014)
<i>KRAS</i>	F 5'TGCACTGTAATAATCCAGACTGTG 3' R 5'TTTAAACCCACCTATAATGGTGAA 3'	229pb	94°C 5' 94°C 1' 58°C 1' 72°C 1' 72°C 10' 40 ciclos	Códo n 61	Tong et al.(2014)
<i>BRAF</i>	F 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3'. R 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3'	116pb	94°C 5' 94°C 1' 56°C 1' 72°C 1' 72°C 10' 40 ciclos	Exón 15	Quiu et al.(2015)

Gene	Sequencia do primer 5'3'	pb	Ciclagem	Alvo
<i>PIK3CA</i>	F 5' TTCTCAATGATGCTTGGCTCTGGAA 3'	197pb	94°C 5'	Exón 20
	R 5' AATGCATGCTGTTTAATTGTGTGGA 3'		95°C 1' 60°C 1' 72°C 1' 72°C 10' 40 ciclos	

A reação de HRM utiliza o fluoróforo *SYTO*® (Invitrogen) a 10pmol junto com os demais reagentes de PCR 1,5mM MgCl₂; 0,2 mM *dNTP*; Tampão 10x; 0,25 mM de cada primer; 0,5U *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen). A PCR-HRM foi realizada no equipamento *QuantStudio 3 real-time PCR* (Applied Biosystems). As condições de ciclagem estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições para análise de PCR em alta resolução.

	Etapas	Temperatura	Tempo	Rampa
<i>Curva de melting</i>	Desnaturação	95°C	10seg	1.6°C/s
	Anelamento	60°C	1min	1.6°C/s
	Dissociação em alta resolução	95°C	15seg	0,025°C/s
	Anelamento	60°C	15seg	1.6°C/s

As amostras de *PCR* foram purificadas utilizando PEG8000/2,5M NaCl. Para o sequenciamento das amostras utilizou-se o equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero *POP7* (Applied Biosystems). Os produtos de *PCR* purificados foram marcados utilizando 5 pmol de cada primer, *forward* ou *reverse*, 1 µL do reagente *BigDye Terminatorv3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. Realizou as reações de marcação no termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 min seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 4 min. Após marcadas, precipitou-se as amostras com etanol e desnaturadas com formamida para serem eletroinjetadas no sequenciador automático.

Os resultados dos eletroferogramas foram analisados no programa *Chromas™* versão 2.3. Utilizou-se o programa *BIOEDIT v7.2.5* para o alinhamento das sequências. A

confirmação dos fragmentos sequenciados foi através do alinhamento gerado pelo *BLAST*. As curvas de *melting* obtidas pelo QuantStudio 3 foram analisadas através do software *High Resolution Melting* v3.0.1. Todas as informações geradas a partir das análises genéticas e os dados epidemiológicos foram inseridos no programa de análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 20.0. Foram realizadas estatísticas descritivas representadas por média aritmética com seu respectivo desvio padrão ($x \pm dp$) ou expressos em frequência (%). A comparação das técnicas de genotipagem *HRM* e sequenciamento foi realizada através dos cálculos de validação de testes diagnósticos medindo a acurácia e especificidade.

RESULTADOS

Foram incluídos no estudo amostras e dados de 8 pacientes, sendo 4 (50%) mulheres e 4 (50%) homens. A idade média foi de 59 anos variando dos 30 a 82 anos. Um total de 50% (n=4) dos pacientes afirmaram ter casos de *CCR* na família, 70% (n=6) eram tabagistas ou em algum momento da vida afirmaram ter sido tabagista (Tabela 3).

Tabela 3 – Caracterização epidemiológicas dos pacientes inclusos no estudo.

Caracterização dos pacientes	N (%)
Sexo	
Feminino	4 (50)
Masculino	4 (50)
Tabagismo	
Tabagista Ativo	3 (37,5)
Não Tabagista	2 (25)
Ex-Tabagista	3 (37,5)
Etilismo	
Etilista	2 (25)
Não Etilista	6 (75)
Histórico Familiar	
Possui casos na família	4 (50)
Não possui casos na família	3 (37,5)

Nos prontuários clínicos constataram que a localização do tumor primário da metade dos pacientes submetidos a cirurgia originam-se do cólon. Em 50% (n=4) das amostras coletadas foi avaliado o estadiamento tumoral após cirurgia, em 12,5% (n=1) foi encontrada presença de metástases hepáticas (Tabela 4).

O tratamento quimioterápico mais indicado foi o citotóxico Capacetabine em 25% (n=2) dos casos, 12,5% (n=1) faz uso da combinação quimioterápica de ácido folínico, fluorouracil e oxaliplatina (FOLFOX), 12,5% (n=1) realizam a radioterapia como tratamento coadjuvante e 62,5% (n=5) dos pacientes não estavam realizando quimioterapia ou radioterapia após a cirurgia (até o momento da coleta dos dados) (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização clínica dos pacientes incluídos no estudo.

Caracterização clínica dos paciente	N (%)
Diferenciação tumoral	
Bem diferenciado	1 (12,5)
Moderadamente diferenciado	3 (37,5)
Pobrememente diferenciado	1 (12,5)
Sítio do Tumor	
Cólon	4 (50)
Reto	4 (50)
Estadiamento	
Tis, N0, M0	1 (12,5)
T1-T4B, N1-N2b, M0	2 (25)
Qualquer T ou N com M1a ou M1b	1 (12,5)
Tratamento Quimioterápico	
FOLFOX*	1 (12,5)
CAPACETABINE	2 (25)
Não indicada	2 (25)
Radioterapia	
Sim	1 (12,5)

* Ácido fólico, fluorouracil e oxaliplatina

A genotipagem dos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* revelaram diferentes resultados pelas plataformas *HRM* e sequenciamento. A especificidade obtida entre a comparação das duas plataformas analíticas foi de 100% com a acurácia de 0,625. Uma pequena variação de 0,05°C foi analisada em uma das curvas de *melting* no exón 20 do gene *PIK3CA* indicando uma possível alteração genética (Figura 1). Uma variação maior foi observada nas amostras do códon 12 e 13 do gene *KRAS*, no qual apresentou temperaturas da curva de *melting* entre 73°C à 74.5°C gerando a visualização 3 curvas diferentes (Figura 2). Para a confirmação dos resultados foi realizado o sequenciamento genético no qual não apresentou nenhuma mutação presente nas seqüências amplificadas. Foi obtida a concordância genotípica de 100% nos resultados *HRM* e sequenciamento para o gene *KRAS* nos códons 61 e 146 (Figura 3 e 4) e para o gene *BRAF* no exón 15 (Figura 5).

Figura 1 – Resultado da análise de HRM para o exón 20 do gene *PIK3CA*.

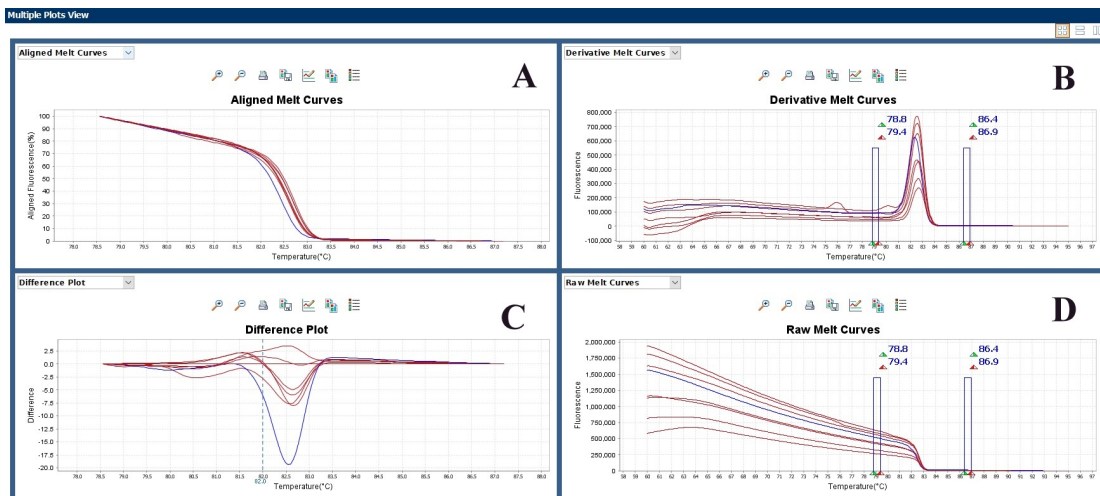


Figura 2 — Resultado da análise de HRM para o códon 12 e 13 do gene *KRAS*.

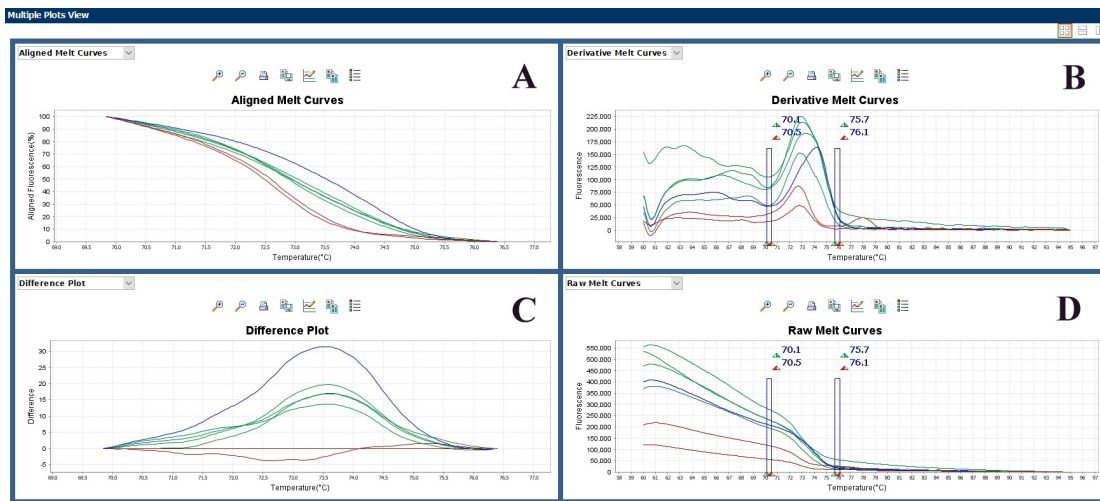


Figura 3 - Resultados das análises de HRM para o códon 61 do gene *KRAS*

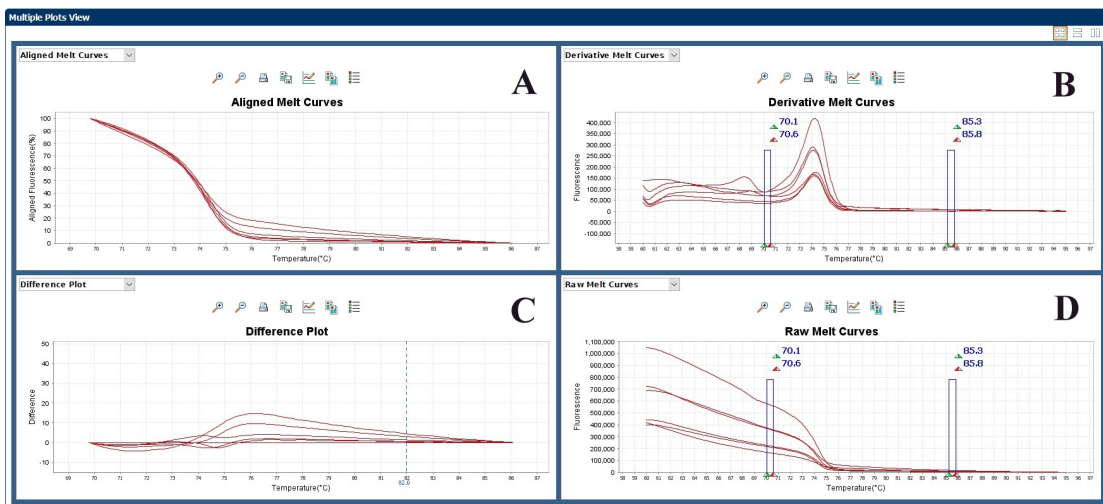


Figura 4 - Resultados das análises de HRM para o códon 146 do gene *KRAS*.

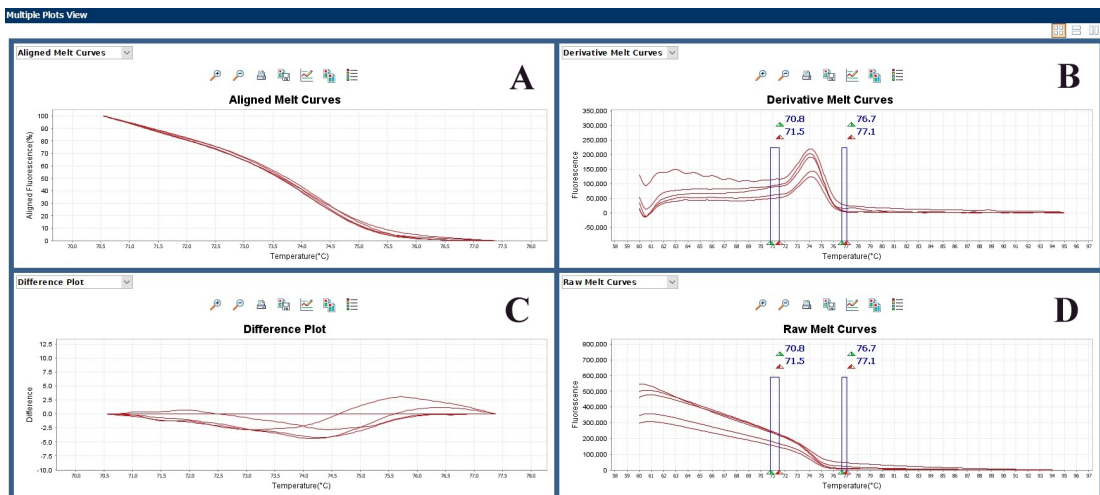
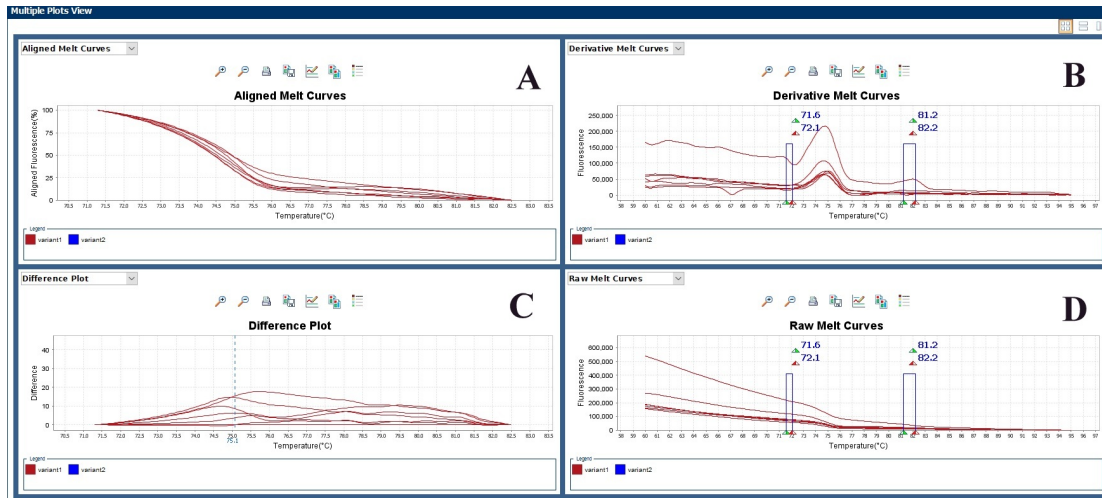


Figura 5 - Resultados das análises de HRM para o exón 15 do gene *BRAF*.



Legenda: As figuras estão divididas em quatro imagens: A – Alinhamento das curvas de *melting*; B- curvas de *melting* ; C- Gráfico de diferença; D- Dado bruto das curvas de *melting*

DISCUSSÃO

As características gerais dos pacientes com *CCR* inclusos no estudo estão de acordo com os dados da literatura. A idade média encontrada foi 59 anos, a mesma descrita por Almeida et al.(2018)¹³. A prevalência de casos no sexo feminino e masculino foram iguais (50%), Imamura et al.(2014) estudou 1267 casos 55% eram do sexo feminino e 45% do sexo masculino¹⁴. Na prática clínica, é de extrema importância entender a interação genética de um paciente com o ambiente que ele vive. Fatores exógenos são capazes de modificar estruturas genéticas e aumentar a susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores¹⁵. A relação genótipo fenótipo vai além de conceitos isolados, o levantamento clínico patológico realizado por este estudo demonstrou que 50% dos pacientes possuem histórico de câncer na família. O estudo de Mork et al.(2019) analisou a prevalência de hereditariedade em 143 pacientes, 29,4% apresentavam síndrome do câncer colorretal hereditário¹⁶.

Foi possível relacionar hábitos tabagistas e etilistas ao *CCR*. 25% dos pacientes estudados são etilistas abusivos, 37,5% são tabagistas ativos e outros 37,5% são ex-tabagistas. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2018), o tabaco tem cerca de 60 substâncias carcinogênicas que aumenta a angiogênese favorecendo a proliferação das células cancerosas¹⁷. Seitz et al (2010) afirma que o uso abusivo de álcool aumenta 60% a chance de

desenvolver *CCR* e sua ingestão está associada a formação de pólipos no intestino devido ao efeito permeabilizante de substâncias xenobióticas^{18,19}. Os resultados clínicos patológicos dos pacientes estudados apresentaram a mesma frequência de surgimento de tumores primários na região do cólon ou do reto. Estudo realizado por Stefanon (2018) obteve confirmação anatomopatológica de 47,7% do surgimento de tumores primários no cólon e 49,9% no reto²⁰. A diferenciação histológica dos tumores colorretais apresentou maior prevalência de tumores moderadamente diferenciados (37,5%). O grau de dificuldade de identificar as células normais das células cancerígenas pode determinar a agressividade do câncer. Alves e Muñoz (2017) analisaram 35 lâminas histopatológicas de adenocarcinoma colorretais e 8 (22,9%) apresentaram células pobremente diferenciados, 19 (54,3%) moderadamente diferenciados e 8 (22,9%) bem diferenciados²¹.

Características anatomopatológicas auxiliam nas decisões terapêuticas no tratamento de tumores colorretais. 25% dos pacientes que realizaram a retirada do tumor encontravam-se no estágio III da doença, 12,5% no estágio IV e 12,5% apresentavam carcinomas *in situ* (Tumor intra-epitelial). Estes dados estão de acordo com aqueles apresentados por Berg et al.(2018), onde a maior frequência de casos também eram de estágio III (37,6%), seguido por estágio IV (20,2%) e estágio I (7,9%)²². Na escolha quimioterápica os medicamentos mais utilizados pelos pacientes no estudo foram FOLFOX e Capacetabine. Segundo Schomoll et al.(2012) estes dois citotóxicos são os mais escolhidos para pacientes que se encontram no estágio III da doença, para pacientes que encontram-se em estágio mais avançado, com metástase, é indicado que realizem tratamentos coadjuvantes com a terapia com anticorpos monoclonais *anti-EGFR*, como Cetuximabe²³.

A análise comparativa das técnicas de genotipagem *HRM* e sequenciamento obtiveram a especificidade de 100% com acurácia de 0,625. A interpretação das curvas de *melting* foi realizada através da temperatura de dissociação. As curvas de *melting* são muito sensíveis e reprodutivas e tem como desvantagem detectar a presença de múltiplos domínios de dissociação, pequenas variações entre amostras podem gerar diferentes curvas ao redor da linha base do gráfico diferencial²⁴. As comparações encontradas no estudo de Mack et al.(2016) apresentou concordância de 98,2%. Niya et al (2016) também descreveu a concordância de 100% na comparação das técnicas^{25,26}. As discordâncias obtidas para o gene *KRAS* códons 12 e 13 e para exón 20 do gene *PIK3CA* podem ter ocorrido por falta de otimização da reação de *PCR*. Além disso, a detecção por ser em alta resolução pode identificar pequenas impurezas como excesso de primers, responsáveis por formar *gaps* de

amplificação²⁷. A vantagem de realizar a técnica de HRM é a eficiência e rapidez no resultados de genotipagem, é um método simples e mais barato que permite a análise de múltiplos alvos apenas acrescentando um fluoróforo na reação de PCR¹¹.

A necessidade de qualificar a padronização da técnica de HRM para os genes KRAS códon 12 e 13 e para PIK3CA e o baixo número de pacientes incluídos no estudo foram fatores limitantes. A ausência de mutação na população estudada não permitiu a avaliação da sensibilidade da técnica de HRM. Esta ausência é justificada por causa da baixa taxa de mutação encontrada na região, conforme o estudo realizado por Pappen (2017) que analisou 40 pacientes e somente 2,4% apresentavam alguma mutação²⁸.

CONCLUSÃO

Foi possível identificar durante a análise clínica e patológica dos pacientes a alta frequência de pacientes com histórico familiar de CCR a ocorrência do diagnóstico tardio, normalmente realizado já no estágio III da doença detectando células mais agressivas com potenciais mais difíceis de ser diferenciados e tratados. A realização da padronização das técnicas de HRM e sequenciamento se mostrou uma metodologia rápida e eficaz para a genotipagem dos biomarcadores *KRAS* e *BRAF*.

REFERÊNCIAS

1. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA 2018. Estimativa 2018 para o câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/> Acesso em: 10 Jun de 2019
2. PÉREZ-BÁEZ, W et al. Impact of fixation artifacts and threshold selection on high resolution melting analysis for KRAS mutation screening. *Molecular and cellular probes*, 35, 34-43, 2017.
3. SANTA HELENA, F. et al. Atuais diretrizes do rastreamento do câncer colorretal: revisão de literatura. *Amrigs*, v. 61, n. 1, p. 76-83, 2017. (B4)
4. HUNTER, J. C. et al. Biochemical and structural analysis of common cancer-associated KRAS mutations. *Molecular cancer research*, p. molcanres. 0203.2015, 2015. (A1)

5. KIM, E; CHOI, E. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Archives of toxicology*, v. 89, n. 6, p. 867-882, 2015.
6. BRUERA, G. et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations detected by next generation sequencing, and differential clinical outcome in metastatic colorectal cancer (MCRC) patients treated with first line FIr-B/FOx adding bevacizumab (BEV) to triplet chemotherapy. *Oncotarget*, v. 9, n. 41, p. 26279, 2018. (A1)
7. SCLAFANI, F et al. Analysis of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and TP53 mutations in a large prospective series of locally advanced rectal cancer patients. *Int Journal of Cancer*, 2019
8. OSUMI, H et al. Non V600E BRAF mutations and EGFR signaling pathway in colorectal cancer. *International journal of câncer*, 2019
9. AKIYOSHI, K et al. KRAS mutations in patients with colorectal cancer as detected by high-resolution melting analysis and direct sequencing. *Anticancer research*, v. 33, n. 5, p. 2129-2134, 2013.
10. SUHAIMI, N M et al. Non invasive sensitive detection of KRAS and BRAF mutation in circulating tumor cells of colorectal cancer patients. *Molecular oncology*, v. 9, n. 4, p. 850-860, 2015.
11. EBILI, H O; ILYAS, M. Cancer mutation screening: Comparison of high-resolution melt analysis between two platforms. *ecancermedicalscience*, v. 9, 2015.
12. TOST J. et al. Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry. *Nucleic acids research* 31(9):e50-e50.2003
13. ALMEIDA, N B et al. Caracterização sóciodemográfica e estatus funcional de pacientes com cancer colorretal atendidos em um hospital escola de maceió. *Gep News*, v. 2, n. 5, p. 35-37, 2018.
14. IMAMURA, Y. et al. Analyses of clinicopathological, molecular, and prognostic associations of KRAS codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Molecular cancer*, v. 13, n. 1, p. 135, 2014 (FI: 7.776)
15. MOREIRA, R M M; MELO, D G. Percepções dos médicos a respeito do aconselhamento genético do câncer: o exemplo do câncer colorretal. *Revista Ciência em Extensão*, v. 8, n. 2, p. 46-65, 2012.
16. MORK, M E. et al. Outcomes of disease-specific next-generation sequencing gene panel testing in adolescents and young adults with colorectal cancer. *Cancer genetics*, 2019.
17. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA 2018. Disponível em:

<http://www1.inca.gov.br> Acesso: 15 Jun de 2019.

18. Seitz, H.K.; Stickel, F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: Role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr.* v.5 p.121–128, 2010
19. ROSSI, M et al. Colorectal cancer and alcohol consumption—populations to molecules. *Cancers*, v. 10, n. 2, p. 38, 2018.
20. STEFANON, L R et al. Prevalência de critérios clínicos para síndrome de Lynch em pacientes com diagnóstico de cancer colorretal atendidos no HUSM. 2018.
21. ALVES, A; MUÑOZ, J. Estudo do valor prognóstico do Ki-67 em adenocarcinomas colorretais e sua correlação com parâmetros clínico-patológicos. *Memorias forenses*, n. 1, p. 35-44, 2018.
22. BERG, E M et al. Colorectal adenocarcinoma staging of patients in a public tertiary hospital in the state of Grande do Sul. *Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)*, v. 38, n. 3, p. 221-226, 2018.
23. SCHMOLL, H. J. et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Annals of oncology*, v. 23, n. 10, p. 2479-2516, 2012.
24. BORRÀS, E et al. Clinical pharmacogenomic testing of KRAS, BRAF and EGFR mutations by high resolution melting analysis and ultra-deep pyrosequencing. *BMC cancer*, v. 11, n. 1, p. 406, 2011.
25. MACK, Elisabeth et al. A rational two-step approach to KRAS mutation testing in colorectal cancer using high resolution melting analysis and pyrosequencing. *BMC cancer*, v. 16, n. 1, p. 585, 2016.
26. NIYA, Mohammad Hadi Karbalaie et al. Sensitive high-resolution melting analysis for screening of KRAS and BRAF mutations in Iranian human metastatic colorectal cancers. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, v. 17, n. 12, p. 5147, 2016.
27. VOSSSEN, R. H. Genotyping DNA variants with high-resolution melting analysis. In: *Genotyping*. Humana Press, New York, NY p. 17-28, 2017
28. PAPPEN, E. Pesquisa de polimorfismos dos genes BRAF, KRAS e NRAS em portadores de câncer colorretal. *Repositório UNISC*, Santa Cruz do Sul, 2017.

7 CONCLUSÃO

Foi possível realizar a comparação da técnica de genotipagem por HRM e por sequenciamento para os genes *KRAS* e *BRAF* no qual apresentou a especificidade de 100% e acurácia de 0,625 demonstrando que o HRM é um método eficiente, rápido e de baixo custo para análises genéticas. A caracterização epidemiológica dos pacientes foi realizada com 4 homens e 4 mulheres com idade média de 59 anos, 50% tinham histórico familiar para CCR, 37,5% encontravam-se no estágio III da doença e 37,5% realizam tratamentos quimioterápicos. Não foi encontrado nenhuma mutação nos pacientes estudados indicando que não possuem potencial de resistência ao tratamento com agentes citotóxicos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, v. 26, n. 9, p. 1324, 2007. (A1)

AHRONIAN, L. G. et al. Clinical acquired resistance to RAF inhibitor combinations in BRAF-mutant colorectal cancer through MAPK pathway alterations. *Cancer discovery*, p. CD-14-1518, 2015. (A1)

ÅLGARS, A. et al. EGFR gene copy number predicts response to anti EGFR treatment in RAS wild type and RAS/BRAF/PIK3CA wild type metastatic colorectal cancer. *International journal of cancer*, v. 140, n. 4, p. 922-929, 2017. (FI 6.513)

ALLEGRA, C. J. et al. 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. (A1)

AKIYOSHI, K et al. KRAS mutations in patients with colorectal cancer as detected by high-resolution melting analysis and direct sequencing. *Anticancer research*, v. 33, n. 5, p. 2129-2134, 2013

AMERICAN CANCER SOCIETY - ACS. Cancer Facts and Figures 2014. Disponível em: www.cancer.org Acesso em: 14 de Set de 2018.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER – AJCC 2017 Disponível em: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Pages/default.aspx> Acesso em: 12 Nov de 2018-11-12

BARDELLI, A. ; SIENA, S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology*, v. 28, n. 7, p. 1254-1261, 2010. (A1)

BARRAS, D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update: Supplementary Issue: Biomarkers for Colon Cancer. *Biomarkers in cancer*, v. 7, p. BIC. S25248, 2015. (B2)

BOUVARD, V. et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*, v. 16, n. 16, p. 1599-1600, 2015. (A1)

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2018. (FI 244.585)

BRUERA, G. et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations detected by next generation sequencing, and differential clinical outcome in metastatic colorectal cancer (MCRC) patients treated with first line FIr-B/FOx adding bevacizumab (BEV) to triplet chemotherapy. *Oncotarget*, v. 9, n. 41, p. 26279, 2018. (A1)

BRUHN, Maressa A. et al. AKT-independent PI3-K signaling in cancer—emerging role for SGK3. *Cancer management and research*, v. 5, p. 281, 2013. (A2)

CAMPANA, G. A.; OPLUSTIL, C. P.; DE FARO, L. B. Tendências em medicina laboratorial. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, n. 4, p. 399-408, 2011. (B4)

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, v. 6, n. 4, p. 389, 2000. (A1)

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, v. 407, n. 6801, p. 249, 2000. (A1)

CHEN, R. J. et al. Epigenetic effects and molecular mechanisms of tumorigenesis induced by cigarette smoke: an overview. *Journal of oncology*, v. 2011, 2011. (B1)

COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, v. 30, n. 7, p. 1073-1081, 2009. (A1)

CORVERA, S.; CZECH, M. P. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends in cell biology*, v. 8, n. 11, p. 442-446, 1998. (B3)

DANTAS, E. L. R. et al. Genética do câncer hereditário. *Rev Bras Cancerol*, v. 55, n. 3, p. 263-9, 2009. (B5)

DEL DEBBIO, C. B. et al. Terapia com anticorpos monoclonais: uma revisão de literatura. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, v. 28, n. 1, p. 133, 2007. (B4)

DIXON, K.; KOPRAS, E. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, p. 441-448, 2004. (FI: 10.198)

- DORR, J. B. et al. Task scheduling in genetic sequencing tool. *Journal of Applied Computing Research*, v. 3, n. 2, p. 118-128, 2014. (FI: 0.75)
- DU, L. et al. Overexpression of PIK3CA in murine head and neck epithelium drives tumor invasion and metastasis through PDK1 and enhanced TGF β signaling. *Oncogene*, v. 35, n. 35, 2016. (A1)
- DUKES, C. E. The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 35, n. 3, p. 323-332, 1932. (A1)
- FANG, J. Y. ; RICHARDSON, B. C. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The lancet oncology*, v. 6, n. 5, p. 322-327, 2005. (A1)
- FENIC, I. et al. Analysis of PIK3CA and Akt/protein kinase B in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology reports*, v. 18, n. 1, p. 253-259, 2007. (B1)
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015. (A1)
- FORNASIER, G. et al. An Update of Efficacy and Safety of Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer: A Narrative Review. *Advances in therapy*, p. 1-13, 2018. (B1)
- FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017. (A2)
- GARNIS, C.; BUYS, P.H.; LAM, W. L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. *Molecular Cancer*, v. 3, n. 1, p. 9, 2004. (A1)
- GATTENLOHNER, S. et al. Concordance of KRAS/BRAF Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer before and after Anti-EGFR Therapy. *Journal of Oncology*, v. 2009, n., p. 831626, 2009. (B1)
- GLOBAL CANCER STATISTIC 2018 – GLOBOCAN 2018. Disponível em: <http://www.iacr.com.fr/> Acesso em: 21 de Ago de 2018.
- GUO, F. et al. Mutation status and prognostic values of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA in 353 Chinese colorectal cancer patients. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 6076, 2018. (A1)
- HANAHAN, D. ; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, v. 86, n. 3, p. 353-364, 1996. (A1)

HANAHAN, D. ; WEINBERG, R. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000. (A1)

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011. (A1)

HAO, Y. et al. Oncogenic PIK3CA mutations reprogram glutamine metabolism in colorectal cancer. *Nature communications*, v. 7, p. 11971, 2016. (A1)

HARRISS, D. J. et al. Lifestyle factors and colorectal cancer risk (2): a systematic review and meta analysis of associations with leisure time physical activity. *Colorectal Disease*, v. 11, n. 7, p. 689-701, 2009. (A2)

HORNE, S. D. et al. Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer. *International journal of cancer*, v. 136, n. 9, p. 2012-2021, 2015. (FI: 6.513)

HUANG, C. J. et al. Prognostic significance of C-reactive protein polymorphism and KRAS/BRAF in synchronous liver metastasis from colorectal cancer. *PloS one*, v. 8, n. 6, p. e65117, 2013. (A1)

HUNTER, J. C. et al. Biochemical and structural analysis of common cancer-associated KRAS mutations. *Molecular cancer research*, p. molcanres. 0203.2015, 2015. (A1)

HUSSAIN, M. R. M. et al. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi journal of biological sciences*, v. 22, n. 4, p. 359-373, 2015. (B5)

IMAMURA, Y. et al. Analyses of clinicopathological, molecular, and prognostic associations of KRAS codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Molecular cancer*, v. 13, n. 1, p. 135, 2014 (FI: 7.776)

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br> Acesso: 06 Nov de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA 2018. Estimativa 2018 para o câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/> Acesso em: 10 Set de 2018.

JORDE, L. B. et al. The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data. *The American Journal of Human Genetics*, v. 66, n. 3, p. 979-988, 2000.

- KALLURI, R. ; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, 2009. (A1)
- KHAN, S. A. et al. EGFR gene amplification and KRAS mutation predict response to combination targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *Pathology & Oncology Research*, v. 23, n. 3, p. 673-677, 2017 (B2)
- KIM, E. K.; CHOI, E. J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Archives of toxicology*, v. 89, n. 6, p. 867-882, 2015. (A1)
- KIM, M. P. et al. Mutant p53: multiple mechanisms define biologic activity in cancer. *Frontiers in oncology*, v. 5, p. 249, 2015. (A1)
- KRAUSE, D. S.; VAN ETTEN, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *New England Journal of Medicine*, v. 353, n. 2, p. 172-187, 2005. (FI: 79.258)
- KUFE, D. W; HAIT, W; HOLLAND, J. F; FREI, E; POLLOCK, R. E. *Holland Frei cancer medicine 6* (Vol. 6). PMPH-USA, 2003
- LABI, V.; ERLACHER, M. How cell death shapes cancer. *Cell death & disease*, v. 6, n. 3, p. e1675, 2016. (A1)
- LASOTA, J. et al. Frequency and clinicopathologic profile of PIK3CA mutant GISTs: molecular genetic study of 529 cases. *Modern Pathology*, v. 29, n. 3, p. 275, 2016. (A1)
- LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, v. 132, n. 1, p. 27-42, 2008. (A1)
- LOUPAKIS, F. et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*, v. 101, n. 4, p. 715, 2009. (FI: 5.922)
- LUO, J. et al. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, v. 136, n. 5, p. 823-837, 2009. (A1)
- LYNCH, T. J. et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*, v. 350, n. 21, p. 2129-2139, 2004. (FI: 79.258)
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews cancer*, v. 9, n. 3, p. 153, 2009. (A1)

- MARTINEZ, C. A. R. et al. Influência da localização do tumor na expressão tecidual da proteína p53 em doentes com câncer colorretal: estudo de 100 casos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 35, n. 4, p. 235-243, 2018. (B3)
- MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, v. 529, n. 7586, p. 298, 2016. (A1)
- MCCUBREY, J. A. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1773, n. 8, p. 1263-1284, 2007. (A1)
- MITSUDOMI, T. Molecular epidemiology of lung cancer and geographic variations with special reference to EGFR mutations. *Translational lung cancer research*, v. 3, n. 4, p. 205, 2014. (FI:1.157)
- MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. *Genes & development*, v. 21, n. 22, p. 2861-2873, 2007.
- MOK, T. S. et al. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, v.361, n.10, p. 947-957, 2009. (FI 79.258)
- NEGRINI, S. et al. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 11, n. 3, p. 220, 2010. (A1)
- NISHII, T. et al. Prognostic value of EGFR mutations in surgically resected pathological stage I lung adenocarcinoma. *Asia Pacific Journal of Clinical Oncology*, v. 13, n. 5, p. e204-e211, 2017. (FI: 1.494)
- NYBERG, P.; XIE, L.; KALLURI, R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer research*, v. 65, n. 10, p. 3967-3979, 2005. (A1)
- ODDO, D. et al. Molecular landscape of acquired resistance to targeted therapy combinations in BRAF mutant colorectal cancer. *Cancer research*, p. canres. 0396.2016, 2016. (A1)
- OLIVEIRA, P. A. et al. Chemical carcinogenesis. *Anais da academia brasileira de ciências*, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007. (B3)
- PAEZ, J. G. et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, v. 304, n. 5676, p. 1497-1500, 2004. (A1)

- PANJKOVIĆ, M. et al. Protein expression, gene amplification, epidermal growth factor receptor mutations and lung carcinoma. *Vojnosanitetski pregled*, v. 71, n. 7, p. 679-684, 2014. (FI: 0.405)
- PAPPEN, E. Pesquisa de polimorfismos dos genes BRAF, KRAS e NRAS em portadores de câncer colorretal. *Repositório UNISC*, Santa Cruz do Sul, 2017.
- PEDRERO, J. M. G. et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3 K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of cancer*, v. 114, n. 2, p. 242-248, 2005. (B4)
- PINHO, M. S. L. Estadiamento molecular do câncer colorretal: o futuro se aproxima. *Revista brasileira de Coloproctologia*, v. 25, n. 3, 2005. (B4)
- PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *The FASEB journal*, v. 5, n. 9, p. 2280-2286, 1991. (A1)
- QIU, T. et al. Detection of BRAF mutation in Chinese tumor patients using a highly sensitive antibody immunohistochemistry assay. *Scientific Reports*, v. 5, 2015. (B2)
- REITER, J. L. et al. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics*, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001. (B1)
- ROOCK, W. et al. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The lancet oncology*, v. 12, n. 6, p. 594-603, 2011. (A1)
- ROSTY, C. et al. Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. *Modern Pathology*, v. 26, n. 6, p. 825, 2013. (FI:6.655)
- ROSTY, C. et al. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PloS one*, v. 8, n. 6, p. e65479, 2013. (FI: 3.057)
- SALETTI, P. et al. EGFR signaling in colorectal cancer: a clinical perspective. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*, v. 5, p. 21-38, 2015. (B3)
- SAMUELS, Y. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, v. 304, n. 5670, p. 554-554, 2004. (A1)

- SANTA HELENA, F. et al. Atuais diretrizes do rastreamento do câncer colorretal: revisão de literatura. *Amrigs*, v. 61, n. 1, p. 76-83, 2017. (B4)
- SANTOS JÚNIOR, J. C. M. Câncer ano-reto-cólico: aspectos atuais III—câncer de reto—terapêutica neoadjuvante. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v. 28, n. 1, 2008. (B3)
- SARTORE-BIANCHI, A. et al. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer research*, 2009. (A1)
- SCHMOLL, H. J. et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Annals of oncology*, v. 23, n. 10, p. 2479-2516, 2012. (FI: 13.926)
- SHACTER, E. et al. Chronic inflammation and cancer. *Oncology-williston park then huntington*, v. 16, n. 2, p. 217-229, 2002. (B1)
- SOUZA, W. F. et al. Sinalização celular em câncer. *Ciência e Cultura*, v. 66, n. 1, p. 30-33, 2014. (B5)
- STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature medicine*, v. 12, n. 8, p. 895, 2006. (A1)
- STEPHENS, L. et al. A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Cell*, v. 77, n. 1, p. 83-93, 1994. (A1)
- STRACQUADANIO, G. et al. The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. *Nature reviews Cancer*, v. 16, n. 4, p. 251, 2016. (A1)
- TOL, J. et al. High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of KRAS mutations in colorectal cancer tissue. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 14, n. 8, p. 2122-2131, 2010 (A1)
- TONG, J. H. et al. Characterization of rare transforming KRAS mutations in sporadic colorectal cancer. *Cancer Biology & Therapy*, v. 15, n. 6, p. 768-776, 2014. (A2)
- TROSKO, J. E. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *BMB Reports*, v. 36, n. 1, p. 43-48, 2003. (B1)
- UMEDA, Y. et al. Poor prognosis of KRAS or BRAF mutant colorectal liver metastasis without microsatellite instability. *Journal of Hepato Biliary Pancreatic Sciences*, v. 20, n. 2, p. 223-233, 2013. (FI 2.877)

- VALARINI, S. B. M. et al. Correlation between location, size and histologic type of colorectal polyps at the presence of dysplasia and adenocarcinoma. *Journal of Coloproctology*, v. 31, n. 3, p. 241-247, 2011. (B4)
- VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, v. 147, n. 2, p. 275-292, 2011. (A1)
- VOLINIA, S. et al. Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 α (PIK3CA) gene. *Genomics*, v. 24, n. 3, p. 472-477, 1994. (B1)
- WANG, S. E. et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer cell*, v. 10, n. 1, p. 25-38, 2006. (A1)
- WILBUR, M. A. et al. Cancer implications for patients with endometriosis. *Seminars in reproductive medicine*. p. 110-116, 2017 (IF 2.670)
- WITSCH, E. et al. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*, v. 25, n. 2, p. 85-101, 2010. (A1)
- WITTWER, C. T. High resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human mutation*, v. 30, n. 6, p. 857-859, 2009. (A1)
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO 2018. Disponível em: who.int/gho/database/en/. Acesso em 21 de Agosto de 2018.
- YANG, Y. et al. HIFs, angiogenesis, and cancer. *Journal of cellular biochemistry*, v. 114, n. 5, p. 967-974, 2013. (FI: 3.444)
- YATABE, Y. et al. EGFR mutation testing practices within the Asia Pacific region: results of a multicenter diagnostic survey. *Journal of Thoracic Oncology*, v. 10, n. 3, p. 438-445, 2015. (FI: 10.336)
- YE, X.; WEINBERG, R. A. Epithelial–mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends in cell biology*, v. 25, n. 11, p. 675-686, 2015. (A1)
- ZHAO, L. ; VOGT, P. K. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*, v. 27, n. 41, p. 5486, 2008. (A1)

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM HRM E SEQUENCIAMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA*

Prezado senhor/Prezada senhora

O/A senhor/a está sendo convidado/a para participar como voluntário do projeto de pesquisa intitulado “COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM HRM E SEQUENCIAMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA*”. Esse projeto é desenvolvido por estudantes e professores do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, e é importante porque pretende comparar a prevalência de mutações nos genes *KRAS*, *BRAF* e *PIK3CA* identificadas por HRM e por sequenciamento e caracterizar perfil epidemiológico de pacientes que realizaram a retirada cirúrgica de tumores colorretais no hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul. Para que isso se concretize, o senhor/a será contatado/a pelos pesquisadores para averiguar a aplicação do questionário epidemiológico e a coleta de amostra de tumor retirado pelo patologista durante o procedimento ao qual irá se submeter. Nessa condição, é possível que alguns desconfortos aconteçam, como é o caso, por exemplo ao responder as perguntas dos questionários aplicados pessoalmente ao paciente. Porém para a redução deste risco é necessário a adoção de postura qualificada, ética e técnica do pesquisador aos participantes da pesquisa. Por outro lado, se o senhor/a aceitar participar dessa pesquisa, benefícios futuros para a área de Farmácia poderão acontecer, tais como: a identificação da presença destas mutações, sendo possível evoluir na busca de uma melhor terapia para tratamentos de câncer do colorretal. Para participar dessa pesquisa o senhor/a não terá nenhuma despesa com transporte, alimentação, exames, materiais a serem utilizados ou despesas de qualquer natureza.

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido eu, _____ declaro que autorizo a minha participação neste projeto de pesquisa, pois fui informado/a, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios, assim como das alternativas às quais poderia ser submetido, todos acima listados. Ademais, declaro que, quando for o caso, autorizo a

utilização de minha imagem e voz de forma gratuita pelo pesquisador, em quaisquer meios de comunicação, para fins de publicação e divulgação da pesquisa, desde que eu não possa ser identificado através desses instrumentos (imagem e voz).

Fui, igualmente, informado/a:

- a) da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- b) da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu cuidado e tratamento;
- c) da garantia de que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações obtidas serão utilizadas apenas para fins científicos vinculados ao presente projeto de pesquisa;
- d) do compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade em continuar participando;
- e) da disponibilidade de tratamento médico e indenização, conforme estabelece a legislação, caso existam danos a minha saúde, diretamente causados por esta pesquisa; e,
- f) de que se existirem gastos para minha participação nessa pesquisa, esses serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

O pesquisador responsável por este Projeto de Pesquisa é Martina Fernanda Gewehr (Fone 51- 9 8207-9915) e Dr^a Lia Gonçalves Possuelo (Fone 51- 9 8471-3720).

O presente documento foi assinado em duas vias de igual teor, ficando uma com o voluntário da pesquisa ou seu representante legal e outra com o pesquisador responsável.

O Comitê de Ética em Pesquisa responsável pela apreciação do projeto pode ser consultado, para fins de esclarecimento, através do telefone: (051) 3717- 7680.

Local: _____ Data ____/____/____

Assinatura do voluntário/ Responsavel

Assinatura do coordenador da pesquisa

ANEXO B - Concordância do local da Pesquisa

Santa Cruz do Sul, 11 de fevereiro de 2019.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UNISC)

Prezados senhores,

Declaramos para os devidos fins conhecer o projeto de pesquisa intitulado: “COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM HRM E SEQUENCIAMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES KRAS BRAF E PIK3CA”, desenvolvido pela acadêmica Martina Fernanda Gewehr, do curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul-UNISC, sob orientação da professora Lia Gonçalves Possuelo, bem como os objetivos e a metodologia da pesquisa e autorizamos o desenvolvimento no Hospital Ana Nery Santa Cruz do Sul.

Informamos concordar com o parecer ético que será emitido pelo CEP-UNISC, conhecer e cumprir a Resolução do CNS 466/12 e demais resoluções Éticas Brasileiras. Esta instituição está ciente das suas corresponsabilidades como instituição coparticipante 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,

Dr. Luiz Alberto Hawth
Diretor Médico
Hospital Ana Nery Santa Cruz do Sul

ANEXO C – QUESTIONÁRIO DE PESQUISA**TÍTULO DA PESQUISA: COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE GENOTIPAGEM HRM E SEQUENCIAMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES *KRAS BRAF e PIK3CA***

1. Nome do paciente: _____

2. Data de Nascimento: _____

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

8. Cor da pele: (1) Branco (2) Não branco 9. Presença comorbidade: () Sim () Não

Qual: _____ Medicamentos: _____

10. Fumante: () Sim () Não () Ex Tempo: _____

11. Data da primeira consulta: _____

12. Patologia: (1) bem diferenciado (2) Moderadamente diferenciado

(3) Pobremente diferenciado (4) Não diferenciado (5) Não disponível

Material de cirurgia:

13. Qual é o sítio do tumor primário: (1) cólon (2) reto (3) não disponível

14. Data da cirurgia para retirada do tumor: _____

15. Linfonodos regionais: (1) Sim (2) Não (3) Não disponível Quantos: _____

16. Metástase no diagnóstico: (1) Sim (2) Não Localização das metástases: _____

17. Estadiamento: (1)I (2)II (3)III (4)IV

Se quimioterapia: Esquema terapêutico de primeira linha recebido

Anticorpos Monoclonais () Sim () Não Qual: _____

Outro esquema () Sim () Não Qual: _____

18. Data início tratamento: _____

19. Finalidade do tratamento: (1) Curativa (2) Prévia (3) Controle (4) Adjuvante (5)

Paliativa (6) Invasivo (7) Sem informação.

ANEXO D – Normas da Revista Brasileira De Coloproctologia



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

ISSN 2237-9363

Scope and Policy

Journal of Coloproctology (JCOL) Publish articles that may contribute to the improvement and the development of the practice, research, and teaching of coloproctology and related specialities.

As from vol. 31, n.3, issued in 2011, the **Journal of Coloproctology** has been published in English. Manuscripts should be submitted in Portuguese or English and should be unedited. Submission should be exclusively to the **Journal of Coloproctology**. Simultaneous submission of full or partial texts, figures or tables is strictly prohibited, except for abstracts or preliminary reports published in Scientific Meeting Proceedings.

The norms are based on the format proposed by the International Committee of Medical Journal Editors and published in the article: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals, which was updated in April 2010 and is available on the Website (<http://www.icmje.org>).

Journal of Coloproctology supports clinical trial registration policies by the World Health Organization - WHO and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Thus, clinical research articles will only be accepted if they received an identification number from one of the Clinical Essay databases, validated by the criteria set by WHO and ICMJE, whose addresses are available at (<http://www.icmje.org>). The identification number should be registered at the end of the abstract.

In case of research involving human beings, the authors should send a copy of the approval received from the Institutional Review Board, recognized by the National Research Ethics Committee (CONEP), in compliance with National Health Council - CNS Resolution 196/96 or an equivalent entity in the study's country of origin.

Authorship criteria:

An individual may be considered an author of an article submitted for publication only if having made a significant intellectual contribution to its execution. It is implicit that the author has participated in at least one of the following phases: 1) conception and planning of the study, as well as the interpretation of the findings; 2) writing or revision of all preliminary drafts, or both, as well as the final revision; and 3) approval of the final version.

Simple data collection or cataloging does not constitute authorship. Likewise, authorship should not be conferred upon technicians performing routine tasks, referring physicians, doctors who interpret routine exams or department heads who are not directly involved in the research. The contributions made by such individuals may be recognized in the acknowledgements.

The author(s) are fully responsible for their manuscripts and should sign and forward the **Declaration of Accountability and Copyright Transfer**.

Manuscript categories accepted by the Journal of Coloproctology:

Editorial: manuscripts on topics of interest to the historical moment, with repercussions for coloproctology and related specialties. **Original article:** research work with unedited results that add value to Coloproctology and related specialties.

Clinical Informations: Case reports, introduction of new techniques, methods and equipments.

Review: systematic review and integrative review. **Special article:** Articles not fall into the categories above and are of interest for coloproctology and related specialties. Will be held at the invitation of the Editorial Board.

Description of procedures:

Each manuscript submitted to the Journal is initially analyzed for compliance with the standards presented in the Instructions to Authors, and returned in case of non-compliance. If approved, the manuscript is forwarded for review to two reviewers, who analyze the document based on the Analysis and Opinion Instrument, specifically elaborated for this purpose. They also opine on the methodological rigor of the adopted approach. In case of

disagreement between opinions, the manuscript is forwarded to a third reviewer. Anonymity is guaranteed across the judgment process. The Editorial Board analyzes the opinions and, if necessary, indicates the necessary changes. Manuscripts are only forwarded for publication after the reviewers and Editorial Board's final approval.

Form and preparation of manuscripts

Checklist

Preparation of manuscripts:

Title Page: It must contain: a) Title of the article, which must be concise, but informative; b) full name of each author and institutional affiliations; c) name of the department and Institution to which the work must be attributed; d) name, address, fax and e-mail of the author responsible for the article and to whom should the mail be sent, e) sources that support the research, f) potential conflicts of interest.

Abstract: The second page must contain the abstract, in Portuguese and English, with no more than 200 words. The abstract should present the information in such a way that the reader can easily understand without referring to the main text. Abstracts should be structured as follows: Objective, Methods, Results and Conclusion. Abstracts for Clinical Informations and especial articles may be unstructured.

Keywords: Three to six keywords defining the subject of the study should be included as well as the corresponding. Keywords in must be based on the Health and Science Keywords (DeCS), published by Bireme and available at (<http://decs.bvs.br>), and Medical Subject Headings (MeSH) is the Nation Library Medicine controlled vocabulary thesaurus used for indexing articles for PubMed at (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Editorial: should not exceed 900 words and 5 references. **Original article:** the text (excluding the title page, abstracts, references, tables, figures and figure legends) should consist of 3000 words. Its structure should contain:

Introduction: should be short, define the research problem, highlighting its importance and knowledge gaps. **Methods:** the methods used, study population, data source and selection criteria should be described objectively and completely. Include the Institutional Review Board approval protocol number and inform that the research was conducted in compliance

with ethical requirements.

Results: should be presented clearly and objectively, describing only the data found, without interpretations or comments. This section can be easier to understand if accompanied by tables, charts and pictures. The text should complement but not repeat what is described in the illustrations.

Discussion: should be limited to the obtained data and achieved results, emphasizing new and important aspects observed in the research and discussing agreements with and differences from previously published studies.

Conclusion: should correspond to the study goals or hypotheses, based on the results and discussion, in line with the title, proposal and method.

Clinical Informations: Case reports, introduction of new techniques, methods and equipments. The text should be composed of:

Introduction: should be brief and to point out the relevance of the topic. **Presentation of clinical case or technique or method or equipment:** must be described clearly and objectively. Present significant data for coloproctology and related specialties, have a maximum of five figures including tables.

Discussion: This should be substantiated in the literature.

Not exceed 1500 words, excluding title page, abstract, references and illustrations. It is recommended that any and all information that might identify the patient be withheld, and that only those laboratory exams that are important for the diagnosis and discussion be presented. The total number of illustrations (figures or tables) should not exceed three, and the number of references should be limited to 20. When the number of cases presented exceeds three, the manuscript will be classified as a Case Series, and the same rules applicable to an original article will be applied.

Review:

Systematic review: broad research method, conducted through the strict synthesis of original quantitative or qualitative research. Aims to clearly answer a specific question relevant to coloproctology and related specialties. Describes the process of seeking original studies in

details, the criteria used to select those publications included in the review and the procedures used to summarize the results obtained by the reviewed studies which may include meta-analyses or not.

Integrative review: research method that presents the synthesis of multiple studies published and permits general conclusions about a specific study area, contributing to deepen knowledge on the study theme. Strict methodological standards need to be adopted. Also, clarity is needed in the results presentation, so that readers can identify the actual characteristics of the studies included in the review. Integrative review steps: elaboration of guiding question, literature search or sampling, data collection, critical analysis of included studies, presentation of integrative review and discussion of results.

The text should not exceed 5000 words, excluding references and illustrations (figures or tables). The total number of illustrations should not exceed eight. The number of references should not exceed 60.

Special article: Should contain up to 2,000 words and 30 references.

In all categories citation of authors in the text must be numerical and sequential, using Arabic numbers between brackets and superscripted, avoid indicating the authors' names.

Citations in the text and references cited in tables and figure legends must be consecutive numbered according to the order in which they appear in the text, with Arabic numbers (index numbers). The reference number must only be included, without any other information.

Tables: Each table must be sent on a separate sheet. Tables must be consecutive numbered, with Arabic numbers, on the order they have been cited in the text, having an appropriate title. They must be cited in the text, without duplication of information. Tables, with the title and footnotes, must be self-explanatory. Tables originated from other sources must have footnotes informing the original references.

Figures and graphs: Illustrations (photographs, graphs, drawings etc.) must be sent individually. They must be consecutive numbered with Arabic numbers; on the order they have been cited in the text and must be sufficiently clear in order to allow their reproduction. Photocopies will not be allowed.

Statistical analysis: The authors must demonstrate that the statistical procedures used were

not only appropriate for the trials of the studied hypothesis, but were also correctly interpreted. The levels of statistical significance (ex. $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$) must be mentioned.

Abbreviations: Abbreviations must be indicated in the text when they are first used. After that, the full name must not be repeated.

Name and medicaments: The generic name must be used.

Acknowledgments: Must include collaboration of people, groups or institutions that deserve acknowledgments, when their inclusion as authors has not been justified; acknowledgments for financial support, technical support, etc.

References: Must be consecutive numbered on the same order they were cited in the text and identified with Arabic numbers. The presentation must be based on the " Vancouver Style" format, and Journal titles must be abbreviated according to the style presented by the List of Journal Indexed in Index Medicus, of the National Library of Medicine, which are available in the following Website: <http://www.nlm.gov/tsd/serials/lji.html>.

The authors must check that the references cited in the text are registered in the reference list with the exact dates and author's names correctly written. The authors are responsible for the exact bibliographic references. Personal communications, unpublished or ongoing works may be cited when absolutely necessary, but must not be included in the bibliographic reference list; can only be cited in the text or in the footnotes.

For all references, mention all authors up to six. More than six, mention the first six, followed by the expression et al.

We ask the authors to submit texts that are as concise as possible. Short texts require less time for revision and layout, reducing the interval between submission and publication.

Send of the manuscripts

1. Option - Online submission

The manuscript should be sent directly site <http://submission.scielo.br/index.php/jcol/index>.

2. Option - Submitted by email

The manuscript, checklist and documents shall be submitted. E-mail: jcoloproctol@sbc.org.br.

3. Option - print

The manuscript must be submitted on CD-Room, the program word accompanied by two copies of printed paper.

The **Declaration of Responsibility and Assignment of Copyright, the checklist and other documents** shall be submitted by mail to the address of the SBCP - Av Marechal Câmara, 160 - sala 916 - Ed Orly - 20020-080 Rio de Janeiro - RJ – Brazil.

There is no fee for submission and review articles.