PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROMOÇÃO DA SAÚDE - MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM
PROMOÇÃO DA SAÚDE

Emelin Pappen

PESQUISA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *BRAF*, *KRAS* E *NRAS* EM PORTADORES DE CÂNCER COLORRETAL

Santa Cruz do Sul

2017

Emelin Pappen

PESQUISA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *BRAF*, *KRAS* E *NRAS* EM PORTADORES DE CÂNCER COLORRETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde – Mestrado, Área de Concentração em Promoção da Saúde, Linha de Pesquisa em Vigilância em Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC.

Orientadora: Profª. Drª. Jane Dagmar Pollo Renner.

Coorientadora: Profª Drª. Lia Gonçalves Possuelo.

Santa Cruz do Sul

2017

Emelin Pappen

PESQUISA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *BRAF*, *KRAS* E *NRAS* EM PORTADORES DE CÂNCER COLORRETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde – Mestrado, Área de Concentração em Promoção da Saúde, Linha de Pesquisa em Vigilância em Saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC.

Orientadora: Profª. Drª. Jane Dagmar Pollo Renner.

Coorientadora: Profª Drª. Lia Gonçalves Possuelo.

Banca examinadora

Drª. Jane Dagmar Pollo Renner
Professor Orientador – UNISC

Drº Daniel Prá
Professor Examinador – UNISC

Drº Pedro Eduardo Almeida da Silva
Professor Examinador - FURG

Santa Cruz do Sul

2017

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me protegido durante toda a caminhada para o desenvolvimento desta pesquisa, por ter me fornecido tranquilidade nas horas de espera e também em momentos de desespero.

A minha querida orientadora Jane Dagmar Pollo Renner, uma pessoa que admiro muito, por me orientar na pesquisa desde os tempos de graduação e por ter compartilhado comigo um pouco do conhecimento.

A minha querida coorientadora Lia Gonçalves Possuelo por ter me aceitado na pesquisa de câncer colorretal, dividindo comigo um pouco do eu intelecto e das maravilhas da pesquisa sobre o câncer.

A meus pais, Eledir e Sidneyva pelo apoio, incentivo e auxilio sempre oferecidos quando necessário, não importando o momento.

Aos meus irmãos, Morgana e Alisson, pelas horas de compreensão em meio ao caos, que eu possa servir de apoio sempre que vocês necessitarem.

A meu companheiro Igor pela tranquilidade, apoio e palavras de incentivo, mesmo quando tudo parecia perdido e confuso.

A minha amiga Francielle Meinhardt pela amizade de anos, companherismo, compreensão e também pelo incentivo em cursar esta pós-graduação.

Aos amigos Flávia Brasil Dias e Rudimar Isller Meurrer, conquistados no início desta caminhada e que foram de extrema importância para o seu término.

A equipe que trabalha no Centro de Pesquisa e Treinamento em Biotecnologia (CPTBio) da Unisc, englobando funcionário e bolsistas que em algum momento me auxiliaram das mais diversas formas, tornando-se amigos muito queridos.

A Martina Fernanda Gewher, bolsista do projeto câncer colorretal, pelo auxílio durante todas as análises, informações fornecidas, tempo dedicado a esta pesquisa e métodos ensinados.

Aos médicos Mário A. Ferrari, Charles Sudback, Inácio Swarosky e Rudimar I. Meurrer pela aceitação de participaração na pesquisa e colaboração durante o seu desenvolvimento.

A equipe do Hospital Ana Nery, que me auxiliou durante todo o período de desnvolvimento da pesquisa, sempre sendo extremamente atenciosa e colaborativa.

A enfermeira Claudia (COI) muito obrigada por todo o auxílio fornecido e por ser tão prestativa, continue sendo esta profissional e pessoa maravilhosa que és, teus pacientes certamente são agradecidos por seus cuidados.

E por fim, mas não menos importante a minha estimada chefe Tânia Battisti, por todos os momentos de compreensão pelas minhas ausências e também pelo apoio prestado durante esta jornada.

DEDICATÓRIA

"Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes".

Leonardo da Vinci

RESUMO

O desenvolvimento da neoplasia colorretal está associado à exposição a fatores de risco que podem ter sua origem no ambiente, hábitos de vida ou genéticos. Sabe-se que algumas mutações genéticas encontradas no CCR tem influência direta na eficácia do tratamento com anticorpos monoclonais. O objetivo geral desta dissertação é avaliar a prevalência de mutações nos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS*, caracterizar o perfil demográfico e o histórico familiar dos pacientes submetidos à retirada de tumores colorretais e de pólipos por colonoscopia nas regiões central e do vale do Rio Pardo do estado do Rio Grande do Sul. Artigo I: Após a realização da análise dos prontuários dos pacientes pré-cirúrgicos de CCR atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Hospital Ana Nery, os mesmos foram caracterizados e determinou-se a frequencia de CCR entre os municípios da 9ª e 28ª região de saúde do Rio Grande do Sul. Foram incluídos na pesquisa 35 pacientes pré-cirúrgicos de neoplasia colorretal, sendo que a maioria era do sexo masculino, não possuia hábito tabágico, foi diagnosticada no estadiamento II da doença e quando analisado histórico familiar para a neoplasia encontrou-se significância para o desenvolvimento da doença. Artigo II: O objetivo deste artigo foi determinar a frequência de mutações nos genes *KRAS* e *BRAF* nos pacientes pré cirurgicos de CCR atendidos pelo Hospital Ana Nery e os pacientes submetidos a coleta de tecido tumoral durante a colonoscopia em uma clinica de Santa Maria. Foram coletadas 40 amostras, sendo que a média de idade encontrada foi de 60,35 (±13,63) anos e 57,5% dos pacientes foram diagnosticados no estadiamento II da neoplasia colorretal. Ao analisarmos a frequência de mutações, detectamos apenas uma paciente com uma mutação no códon 12/13 do gene KRAS, representando 2,4%. A baixa frequência de mutações pode estar relacionada com a miscigenação das populações estudada e a falta de heteroneidade tumoral.

ABSTRACT

The development of colorectal neoplasia is associated with exposure to risk factors that may have their origin in the environment, lifestyle or genetic. It is known that some genetic mutations found in RCC have a direct influence on the efficacy of monoclonal antibody treatment. The general objective of this dissertation is to evaluate the prevalence of mutations in the BRAF, KRAS and NRAS genes, to characterize the demographic profile and the family history of patients submitted to colorectal tumors and polyps by colonoscopy in the central and the Rio Pardo valley State of Rio Grande do Sul. Article I: After the analysis of the medical records of the pre-surgical patients of CRC attended by the Unified Health System (SUS) at the Hospital Ana Nery, they were characterized and the frequency of CCR Among the municipalities of the 9th and 28th health regions of Rio Grande do Sul. Thirty-five pre-surgical patients with colorectal neoplasia were included in the study, most of them male, non-smoking, diagnosed in stage II disease And when analyzed family history for the neoplasia was found significant for the development of the disease. Article II: The objective of this article was to determine the frequency of mutations in the KRAS and BRAF genes in preoperative CRC patients treated by the Ana Nery Hospital and the patients submitted to collection of tumor tissue during a colonoscopy in a Santa Maria clinic. A total of 40 samples were collected. The mean age was 60.35 (± 13.63) years and 57.5% of the patients were diagnosed in stage II colorectal neoplasia. When we analyzed the frequency of mutations, we detected only one patient with a mutation at codon 12/13 of the KRAS gene, representing 2.4%. The low frequency of mutations may be related to the miscigenation of the populations studied and the lack of tumor heteronicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÕES DO PROJETO

Figura 1: Populações utilizadas no estudo, atendidas pelo Hospital Ana Nery e Clinica de Santa Maria..... 31

Figura 2: Fluxograma das análises realizadas para detecção polimorfismos dos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS..... 38*

ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO 1

Figura 1. Municípios de residência dos pacientes dos pacientes com CCR atendidos pelo Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul – RS..... 73

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO PROJETO

Tabela 1. Fatores e mecanismos que influenciam no CCR.....19

Tabela 2. Frequência de polimorfismos BRAF no mundo.....25

Tabela 3. Frequência de polimorfismos *KRAS* no mundo.....26

Tabela 4. Frequência de polimorfismos *NRAS* no mundo.....27

Tabela 5. Variáveis a serem utilizadas no estudo.....33

Tabela 6. Primers, características da amplificação e alvo.....35

TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1. Características epidemiológicas dos pacientes com CCR atendidos pelo Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul – RS.....71

Tabela 2. Características clínicas dos tumores de pacientes com CCR atendidos pelo Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul – RS.....72

TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela1. Primers e temperaturas de amplificação utilizados na PCR.....77

Tabela 2. Frequência de mutação do gene *KRAS* em diferentes países.....80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	Microlitro
BRAF	B-Raf proto-oncogene; serine/threonine kinase
CA	Antígeno carboidrato
CCR	Câncer colorretal
CEA	Antígeno carcinoembrionário
COI	Centro de oncologia integrada
CRS	Coordenadoria regional de saúde
CPTBio	Centro de Pesquisa e Treinamento em Biotecnologia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
ERK	Quinase reguladora de sinal extracelular
FAP	Polipose heredo-familiar
FAPA	Polipose familiar atenuada
FOLFIRI	Ácido foliníco+fluoracil+irinotecano
FOLFOX	Ácido foliníco+fluoracil+oxaplatina
HNPCC	Polipose não relacionada à polipose heredo-familiar
IDH	Indice desenvolvimento humano
INCA	Instituto nacional do câncer
kD	Kilodalton
KRAS	KRAS proto-oncogene
MgCl2	Cloreto de Magnésio
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Ng	Nanograma
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIB	Produto interno bruto
Raf	Proteinas familia Raf
Ras	Proteinas familia Ras
RS	Rio Grande do Sul
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SNP	Substituição de um nucleotídeo único
SUS	Sistema único de saúde
TCLE	Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido
TNM	Sistema Classification of Malignant Tumours
TBE	Tampão tris/borato/edta
U	Unidade
VEGR	Fator de Crescimento Vascular

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO..... 3
DEDICATÓRIA..... 5
RESUMO..... 6
ABSTRACT..... 7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... 8
LISTA DE TABELAS..... 9
LISTA DE ABREVIATURAS..... 10
APRESENTAÇÃO..... 12

CAPÍTULO I
PROJETO DE PESQUISA..... 13
1 INTRODUÇÃO..... 14
2 MARCO TEÓRICO..... 17
3 OBJETIVOS..... 29
4 MÉTODO 30
5 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO..... 40
6 RECURSOS HUMANOS E INFRAESTRUTURA..... 41
7 ORÇAMENTO..... 42
8 RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS 43
9 RISCOS/DIFICULDADES/LIMITAÇÕES..... 44
10 REFERÊNCIAS..... 45

CAPÍTULO II
RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO..... 52

CAPÍTULO III
ARTIGO I...... 55
ARTIGO II..... 74

CAPÍTULO IV
NOTA A IMPRENSA..... 85

ANEXOS 87
ANEXO A - Questionário para a pesquisa..... 88
ANEXO B - Termo de Consentimento livre e esclarecido..... 89
ANEXO C - Carta aceite Hospital Ana Nery..... 91
ANEXO D - Carta aceite Clínica de endoscopia Caridade..... 92
ANEXO E – Instruções para autores..... 93
ANEXO F - Instruções para autores..... 101

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está dividida da seguinte forma: projeto de pesquisa, relatório do trabalho de campo, artigos, nota para divulgação da pesquisa na imprensa e anexos.

O projeto de pesquisa elucida a justificativa para o desenvolvimento do trabalho, através da fundamentação teórica sobre o assunto abordado. Encontra-se tambem a descrição do método utilizado para o desenvolvimento do estudo, assim como cronograma de trabalho, orçamento, recursos humanos, riscos e dificuldades encontrados e resultados esperados.

O trabalho de campo descreve como foi o desenvolvimento da pesquisa e os percalços encontrados na sua realização.

No capítulo III encontram-se os artigos I e II. O artigo I descreve as caracteristicas dos pacientes submetidos a retirada de tumor colorretal atendidos pelo sistema único de saúde e a prevalência dos casos de CCR entre a 9ª e 28ª região de saúde do Rio Grande do Sul, que são atendidos pelo Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul. O artigo II descreve a frequência de polimorfismos nos genes *KRAS* e *BRAF* nos pacientes submetidos a retirada de tumor colorretal atendidos pelo sistema único de saúde no Hospital Ana Nery e a coleta de tecido tumoral na clinica de endoscopia Santa Maria da cidade de Santa Maria

A nota a imprensa faz um resumo sintetizado da pesquisa em formato de texto de jornal, descrevendo os resultados obtidos fornecendo um retorno de informações para a sociedade, contribuindo para a promoção da saúde dos mesmos.

CAPÍTULO I
PROJETO DE PESQUISA

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma patologia que requer um tratamento individualizado, especializado, longo e caro; portanto, tem grande impacto econômico na sociedade. Por ser uma doença degenerativa que afeta indivíduos em qualquer fase da vida, se caracteriza como um problema de saúde pública. O baixo nível econômico, a falta de políticas de saúde pública que alertem a população para um diagnóstico precoce, o custo elevado dos exames preventivos e pacientes que não possuem informações necessárias sobre os sintomas que a doença causa, são fatores determinantes que levam o indivíduo a um diagnóstico tardio de câncer colorretal (CCR) (BRAMBILLA et al., 2012). A detecção precoce do CCR, aumenta a sobrevida em 5 anos em até 90% dos casos, após o desenvolvimento de metástases a sobrevida em cinco anos diminui para menos de 10%, enquanto a maioria dos portadores de câncer irá desenvolver metástases hepáticas, que quando identificadas tardiamente são fatais (BRUIN et al., 2011; COPPEDÉ et al., 2014).

Estima-se o aparecimento de 33 mil novos casos de câncer colorretal no Brasil nos anos de 2014 e 2015; para o Rio Grande do Sul a estimativa é para o surgimento de 3 mil novos casos (INCA 2014). O desenvolvimento do CCR está ligado a fatores ambientais, geográficos e genéticos; quanto maior é a exposição do indivíduo aos fatores de risco, como ingestão de álcool, excesso de gorduras, carnes vermelhas e industrializadas, baixo consumo de frutas e verduras e sedentarismo maior a probabilidade do desenvolvimento do câncer (CAMPOS; REGADAS; PINHO, 2012; LEVIDOU et al., 2012). As síndromes genéticas ligadas ao CCR são a polipose heredo-familiar e a polipose familiar atenuada não ligada a polipose heredo-familiar (HNPCC), apresentando incidência em torno de 10% no caso desta última (SANTOS JUNIOR, 2007).

Técnicas como pesquisa de sangue oculto nas fezes, teste de DNA fecal e colonoscopia são utilizadas para o rastreamento e diagnóstico do CCR. A colonoscopia é o método de escolha, reduzindo em até 90% a incidência desta neoplasia; em pacientes com risco médio, recomenda-se a realização deste exame a cada 10 anos a partir dos 50 anos (ASSIS, 2011; SANTOS JÚNIOR, 2007). Com o desenvolvimento de medicamentos cada vez mais eficazes para a terapia do câncer,

tornou-se necessária a identificação de marcadores que auxiliem na escolha do tratamento adequado para cada paciente, permitindo o rastreio de portadores de polimorfismos que não irão apresentar a resposta esperada aos esquemas aplicados (GRADY; PRITCHARD, 2013; PANCZYK, 2014). Pesquisas são realizadas em busca do tratamento ideal para cada paciente, melhorando a resposta terapêutica e alcançando maiores taxas de cura (BINEFA et al., 2014).

Nas últimas décadas, o estudo de genes ligados a cânceres vem ganhando espaço na medicina personalizada; devido a este fato, a sobrevida dos pacientes portadores de CCR tem aumentado significativamente (PEREZ et al., 2013). Os testes genéticos realizados em pacientes com câncer colorretal são importantes para a identificação de resistência a terapia utilizadando anticorpos monoclonais e suscetibilidade a apresentação de efeitos tóxicos. Com a identificação de problemas na resposta farmacológica, consegue-se utilizar esquemas de quimioterápicos/farmacológicos mais eficazes, diminuindo-se o custo medicamentoso, custo com internações pós-quimioterapia, melhorando a qualidade de vida do paciente e sua resposta a terapia (GOLDSTEIN; SHAIB; FLOWERS, 2015).

Genes como o *BRAF*, *NRAS* e o *KRAS* apresentam cerca de 10%, 5% e 50% de mutações entre os tumores de CCR, sendo biomarcadores utilizados para determinação de prognóstico e resposta da terapia farmacológica (SHEN et al., 2011; JANCÍK et al., 2010; HAIGIS et al., 2008). Eles fazem parte da cascata de sinalização intracelular Ras/Raf/Mek/Erk, que regula o crescimento e a morte celular (MCCUBREY et al., 2007), podendo ser encontrados de duas formas nos tumores, a selvagem, que irá responder ao tratamento utilizando anticorpos monoclonais e com mutação, na qual este tipo de terapia não terá um sucesso efetivo (HARRIS et al., 2013).

O polimorfismo mais frequente encontrado em *BRAF* está localizada no éxon 15, sendo uma alteração no aminoácido 600 (códon), ocorrendo a troca de uma glutamina por uma valina (HUSSAIN et al., 2014); em *KRAS,* são identificadas alterações especialmente nos códons 12, 13, 61 e 146 do éxon 2 (DOUILLARD et al., 2013) e no gene *NRAS* mutações ocorrem frequentemente no éxon 2, 3, 4, nos códons 12, 13 e 61 (AL-SHAMSI; ALHAZZANI; WOLFF, 2015).

Em terapias anti fator de crescimento epidérmico (EGFR), que utilizam anticorpos monoclonais, estes genes que apresentam polimorfismos são considerados marcadores preditivos negativos, pois o esquema farmacológico irá provar-se ineficaz, aumentando custos com terapia e expondo o paciente ao desenvolvimento de efeitos colaterais sem uma resposta efetiva no controle da neoplasia (HARRIS et al., 2013; GRADY; PRITCHARD, 2013).

Desta maneira, o **problema** de pesquisa proposto é: qual a prevalência de polimorfismos dos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS* em populações da região central e do vale do Rio Pardo no Rio Grande do Sul?

2 FARMACOGENÔMICA NO CÂNCER

2.1 Câncer

Atualmente, dá-se o nome de câncer a doenças que tenham crescimento desordenado, resultado de defeitos na regulação da divisão celular. Estes defeitos, muitas vezes, são resultados de danos genéticos, que podem ser causados por agentes como radiação ionizante e substâncias químicas ou mutações espontâneas (ALBERTS et al., 2011). Em sua maioria, os tumores são decorrentes de mutações somáticas que se acumulam ao longo da vida do indivíduo; quando uma célula sofre uma alteração que afeta a sua taxa de proliferação, ela se divide mais rapidamente que o tecido normal e muitas vezes mais mutações ocorrem na divisão, tornando o tumor mais agressivo (PIERCE, 2011).

Dois tipos de genes estão envolvidos no desenvolvimento de tumores, são eles: genes estimuladores, que quando mutados tornam-se hiperativos, estimulando a divisão celular, recebendo a denominação de oncogene. E os genes inibidores tumorais, que quando mutados tornam-se inativos, perdendo sua função inibitória. Mutações no mecanismo de reparo do DNA podem acarretar o aparecimento de polimorfismos nestes dois tipos de genes, já que as correções não ocorrem corretamente (PIERCE, 2011).

Os programas de prevenção e rastreamento do câncer devem ser direcionados tanto para pacientes que apresentam sintomas quanto aos que não apresentam, realizando a identificação de casos em estágios iniciais e também monitoramento das populações de risco, que estão expostas a fatores desencadeantes de neoplasias. No Brasil, as ações de prevenção e detecção estão voltadas, principalmente para os cânceres de mama e colo do útero, há recomendações que estas ações aconteçam na rede básica de saúde, alcançando uma faixa maior da população (PARADA et al., 2008) Entretanto a falta de programas de rastreamento mais efetivos, de políticas públicas direcionadas para prevenção e promoção e de recursos para saúde, que somado ao pouco conhecimento dos indivíduos, conduzem ao negligenciamento de sintomas, ocasionando um diagnóstico tardio dos tumores (BRAMBILLA et al., 2012).

2.2 Câncer colorretal (CCR)

O câncer colorretal caracteriza-se pela presença de tumores no colón ou reto, originados geralmente dos pólipos (INCA, 2014); estes são elevações presentes na mucosa intestinal resultantes na maioria das vezes de crescimentos celulares anormais (CAMPOS; REGADAS; PINHO, 2012), devido a ativação de genes oncogenes ou inativação de genes supressores de tumores, como por exemplo o gene *p53*, responsável pela iniciação da apoptose celular (PIERCE, 2011). A estimativa do INCA para os anos de 2014 e 2015 é o aparecimento de 33 mil novos casos de câncer colorretal no Brasil. Na região sul, acredita-se que 2870 homens e 3190 mulheres desenvolveram esta patologia, representando 4,3% e 6,4% do total de casos novos de cânceres. No Rio Grande do Sul, aproximadamente 1390 homens e 1570 mulheres desenvolverão CCR, uma taxa de 25,61/100.000 habitantes e 27,43/100.00 habitantes (INCA, 2014).

Os exames de rastreamento têm por objetivo diagnosticar precocemente a neoplasia, assim como prevenir o seu desenvolvimento. É importante a identificação dos fatores de riscos para se adotar práticas de prevenção, sendo que o risco para o desenvolvimento de CCR é dividido em moderado (pessoas de ambos os sexos com idade acima de 50 anos se encaixam neste grupo, sendo as campanhas de rastreamento direcionadas para este segmento da população; recomenda-se a realização da colonoscopia a cada 10 anos para este grupo); alto (pessoas com algum familiar de primeiro grau que desenvolveu CCR antes dos 45 anos, com adenomas maior que 1 cm e portadores de doenças inflamatórias); e muito alto (pessoas pertencentes a famílias com histórias de neoplasia com características autossômicas dominantes ou de transmissão hereditária). Utilizam-se como técnicas de rastreamento os testes realizados nas fezes, como sangue oculto e pesquisa de DNA fecal e a colonoscopia, sendo esta considerada o padrão ouro de diagnóstico de CCR (CAMPOS; REGADAS; PINHO, 2012; ASSIS 2011; SANTOS JÚNIOR, 2003). Anemias de origem desconhecida, suspeita de perda de sangue nas fezes, diarreia, prisão de ventre, sangramento anal, desconfortos abdominais e sensação de intestino cheio mesmo após evacuação são sintomas do câncer colorretal. O tempo entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico varia de 2 meses até 10 meses (SANTOS JUNIOR, 2008).

A polipose heredo-familiar (FAP), a polipose familiar atenuada (FAPA) e a polipose não relacionada a polipose heredo-familiar (HNPCC) são doenças genéticas ligadas ao desenvolvimento de CCR, porém, a incidência devido a estas causas é baixa, chegando a no máximo 10% no caso da HNPCC. O câncer colorretal esporádico é responsável por aproximadamente 90% dos casos, principalmente localizado no reto e cólon sigmóide (SANTOS JÚNIOR, 2007).

São vários os fatores ligados ao desenvolvimento de câncer colorretal, eles podem ser tanto de origem ambiental, quanto geográfica ou alimentar. Na tabela 1, segue a descrição dos mesmos e suas possíveis influências no desenvolvimento desta neoplasia.

Tabela 1: Fatores e mecanismos que influenciam no CCR.

Fatores	Mecanismos	Referências
Diabetes	Leva a hiperinsulinemia, que exerce um papel de estimulador celular, diminuindo a capacidade apoptótica do tecido, contribuindo na fase inicial da neoplasia.	ORTIZ et al., 2012; CAMPOS; REGADAS; PINHO, 2012.
Sexo	Acredita-se que este fator possa estar ligado ao hábito alimentar, ao estilo de vida e ao efeito protetor que os hormônios femininos (estrogênio, progesterona) exercem.	CAI et al., 2012; ORTIZ et al. 2012.
Obesidade	Hormônios secretados pelo tecido adiposo podem estimular o crescimento celular, propiciando o desenvolvimento de pólipos.	ORTIZ et al., 2012.
Ingestão bebidas alcoólicas	A ingestão de bebidas alcoólicas leva a deficiência de folato, geração de espécies reativas de oxigênio, estimulação de fatores oncogênicos e a supressão do sistema imunológico.	SHRUBSOLE et al., 2008; SANTOS JÚNIOR, 2003.
Tabagismo	O tabagismo ou a nicotina tem sido associada a aumento da atividade da DNA metiltransferase em células cancerosas, sugerindo que o mecanismo na qual ele esteja envolvido seja a instabilidade cromossômica ou inibição de genes supressores tumorais, especialmente na via de instabilidade de microssatélites.	SHRUBSOLE et al., 2008.
Consumo carne vermelha	A carne vermelha, por sua elevada concentração de íons ferro, leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio, que entrando em contato com a mucosa intestinal, acarretam danos oxidativos as células; Além da formação de componentes nitrosos, aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos também prejudiciais.	ZANDONAI; SONOBE; SAWADA, 2012.

Ingestão gorduras	Altas taxas de gordura ingerida estariam ligadas a retenção de ácidos biliares e de colesterol no cólon, gerando substâncias que levariam ao aumento de sinais de replicação celular.	CAMPOS; REGADAS; PINHO, 2012.
Doença intestinal inflamatória	A inflamação sistêmica causada por estas doenças é um fator de risco para desenvolvimento do CCR.	CAMPOS; REGADAS; PINHO, 2012.
Etnia	Afrodescendentes apresentam maior risco para o desenvolvimento de CCR.	ASSIS, 2011.
Idade	O risco aumento conforme a idade.	SANTOS JÚNIOR, 2007.

Existem alimentos e substâncias que atuam como protetores do câncer colorretal a adoção de sua ingestão são benéficos para a prevenção do desenvolvimento deste tipo de neoplasia, alguns deles são o folato e a metionina, que são necessários na síntese, reparo e metilação celular (SANDLER 2010); o cálcio, que liga-se com os ácidos biliares e com os ácidos graxos diminuindo os seus efeitos mitogênicos; a ingestão de fibras, que possibilitam a diluição de compostos nocivos, diminuindo seu contato com a mucosa intestinal e a ingestão de frutas e verduras, que possuem antioxidantes, auxiliando na proteção do DNA contra danos oxidativos (BAROUDI, 2013; SANTOS JÚNIOR, 2007; HAAS; ANTON; FRANCISCO, 2007).

São utilizados dois principais tipos de estadiamento, que levam em consideração o nível de profundidade de infiltração da parede intestinal e a presença ou ausência de metástases linfonodais regionais. A classificação de Dukes utiliza a seguinte divisão: Lesões Dukes A (crescimento neoplásico limitado à parede intestinal); Lesões Dukes B (infiltração na serosa e tecido adiposo); Lesões Dukes C (presença de metástases linfonodais) e Lesões Dukes D (metástases a distância). O sistema Classificação de tumores malignos (TNM) tem as seguintes divisões: T1 (tumor invade submucosa); T2 (tumor invade a musculatura própria); T3 (invasão da subserosa ou tecidos pericólicos e perirretais não peritonizados); T4 (invasão de outros órgãos ou perfura o peritônio visceral); N1a (um linfonodo está comprometido); N1b (2 ou 3 linfonodos estão comprometidos); N1c (nódulos satélites sem metástase linfonodal); N2a (4 a 6 linfócitos regionais afetados); N2b (7 ou mais linfonodos com metástases); M1a (metástase em apenas um órgão); M1b (metástase em mais de um órgão, incluindo o peritônio) (CAMPOS; REGADAS; PINHO, 2012).

Quando detectado precocemente, a sobrevida do paciente em 5 anos é de 90%; após o desenvolvimento de metástases, esta taxa diminui para 10%, desta maneira, há a necessidade de identificação de marcadores que auxiliam no diagnóstico do CCR (COPPEDÉ et al., 2014). Após o desenvolvimento de metástases hepáticas, muito comuns neste tipo de câncer, é indicado a realização de um procedimento chamado ressecção de metástases hepática, além de ser uma possibilidade de cura, há o aumento da taxa de sobrevida global em aproximadamente 50% dos casos, mas por ser um método complexo e caro, é necessária uma identificação rápida; atualmente, utiliza-se exames anatomopatológicos para a identificação das lesões (SCHIRRIPA et al., 2015).

2.2.1 Medicações para tratamento

Durante muito tempo foi utilizado no tratamento quimioterápico a 5-fluorouracil. Nos anos 80, houve a combinação com o ácido folínico (leucovorin®). Com a descoberta do irinotecano (campsar®), no final da década de 90, este passou a ser utilizado nos casos de recidiva do câncer; quando foi associado ao ácido folínico e a 5-fluorouracil, surgiu o esquema chamado FOLFIRI. Nesta mesma época, a oxaplatina foi associada ao ácido folínico e a 5-fluorouracil, originando o esquema FOLFOX. Com o avanço da biologia molecular, desenvolveu-se medicamentos a partir dos anticorpos monoclonais, sendo eles mais específicos e com menos efeitos tóxicos ao usuário. Comercialmente no Brasil, utiliza-se para tratamento de câncer colorretal o cetuximabe (erbitux®), o panitumumabe (vectibix®) e o bevacizumabe (avastin®) (KALIL et al., 2014; TONON; SECOLI; CAPONERO, 2007; VENOOK, 2005).

O anticorpo monoclonal cetuximabe é uma imunoglobulina quimérica IgG1, liga-se a parte extra-celular do receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR), inibindo a fosforilação da cadeia de sinalização, interrompendo as reações bioquímicas necessárias para a proliferação celular (VIEIRA; DI SENA, 2009). O mecanismo de ação do anticorpo panitumumabe é semelhante ao do cetuximabe, a imunoglobulina é do tipo IG2, ela liga-se ao receptor do EGFR, inibindo a sinalização para proliferação celular, e sua administração é por via intravenosa (TAY; WONG; HAWKES, 2015). O anticorpo bevacizumabe liga-se ao receptor extra celular do

fator de crescimento endotelial vascular (VEGR), inibindo esta via de sinalização de proliferação celular (VIEIRA; DI SENA, 2009). Os efeitos colaterais deste tipo de tratamento afetam principalmente os sistemas digestivo, cardiovascular, nervoso central e hematopoiético (DEBBIO; TONON; SECOLI, 2007).

Na oncologia, diretrizes clínicas, programas educacionais e testes moleculares são de fundamental importância para auxiliar os médicos na escolha do tratamento adequado para o paciente (GOLDSTEIN; SHAIB; FLOWERS, 2015). Análises moleculares são realizadas para identificação de polimorfismos, como por exemplo, dos genes da via de sinalização celular (*KRAS, NRAS* e *BRAF,* entre outros) estas informações norteiam o emprego dos anticorpos monoclonais cetuximabe e panitumumabe, que são escolhas de primeira linha para o CCR metastático. A ocorrência de mutações impede a utilização deste tipo de terapia, pois o paciente não responderá ao tratamento além de apresentar os efeitos adversos (HARRIS et al., 2013). A primeira terapia escolhida para o tratamento possui papel fundamental na evolução do paciente com câncer colorretal metastático, pois pode retardar a evolução da doença, proporcionar a cura a alguns usuários e também indicar a eficácia de outros tratamentos (CREMOLINI et al., 2015).

2.3 Marcadores tumorais

Os componentes celulares, estruturais e bioquímicos que podem indicar alterações celulares e moleculares nas células são conhecidos como marcadores tumorais. Eles podem ser identificados e/ou quantificados nos tecidos ou líquidos corporais, sendo o seu aumento ou até aparecimento indicativo de crescimento de células neoplásicas. Muitas vezes, o marcador detectado indica o órgão de origem da neoplasia (CAPELOZZI, 2001; OLIVEIRA; FONSECA, 2011; ALMEIDA et al., 2007).

Os marcadores de prognóstico auxiliam na determinação do estadiamento, prognóstico e possível resposta terapêutica. Já os marcadores de diagnóstico estão presentes no surgimento dos tumores malignos (CAPELOZZI, 2001). Alguns marcadores tumorais utilizados na prática clínica para detecção e acompanhamento do CCR são:

CEA: o antígeno carcinoembrionário é produzido pelas células presentes na mucosa gastrintestinal, seu valor de referência é de 3,5ng/mL, tendo sensibilidade de 40 - 47% e especificidade de 90 – 95% para o câncer de colorretal. Sua dosagem é indicada a cada dois ou três meses durante o tratamento quimioterápico, para controle de eficácia da terapia, sendo a manutenção de níveis elevados, após cirurgia e tratamento farmacológico, é indicativo de metástases (ALMEIDA et al., 2007).

CA 19.9: conhecido como antígeno de Lewis, possui valor de referência de 37U/mL, apresentando sensibilidade de 30-40% nos casos de câncer colorretal, é indicada sua utilização para estadiamento e monitorização do tratamento (OLIVEIRA; FONSECA, 2011). Também pode ser encontrado em níveis alterados em doenças auto-imunes, inflamatórias intestinais, pancreatites (ALMEIDA et al., 2007).

CA 72.4: É um antígeno carboidrato, que possui valor de referência menor ou igual a 6,9U/mL, possui boa especificidade para detecção de tumores gástricos (TOMASICH et al., 2002).

Genes: Estão sendo utilizados para pesquisa de polimorfismos em resposta as terapias utilizadas para tratamento, que quando presentes influenciam na resposta terapêutica e na sobrevida global do paciente (GRADY; PRITCHARD, 2013; KALIA, 2013).

2.4 Farmacogenômica do câncer colorretal

A farmacogenética tem por objetivo o análisar a interação de um gene sobre a resposta terapêutica, enquanto a farmacogenômica leva em consideração a interação entre vários genes e suas respostas aumentando os efeitos benéficos dos fármacos, diminuindo seus efeitos colaterais e tóxicos, proporcionando ao paciente um melhor bem estar e provocando uma maior adesão ao tratamento e principalmente aumentando a eficácia terapêutica (PANCZYK, 2014; DESTENAVES; THOMAS, 2000; METZGER; SOUZA-COSTA; TANUS-SANTOS, 2006,). Com o desenvolvimento de medicamentos cada vez mais efetivos para a terapia do câncer, tornou-se necessária a identificação de marcadores que auxiliem na escolha de um tratamento eficaz para cada paciente, permitindo a identificação de portadores de

polimorfismos que não apresentaram uma resposta esperada aos esquemas aplicados, orientando a escolha de um tratamento personalizado visando a diminuição de custos e a diminuição de efeitos adversos, melhorando o bem estar do paciente (PANCZYK, 2014; GRADY; PRITCHARD, 2013; LA THANGUE; KERR, 2011).

As terapias individuais estão substituindo a utilização ao acaso dos quimioterápicos, melhorando a eficácia e aumentando a sobrevida do paciente, a utilização de uma medicina personalizada melhora a possibilidade do diagnóstico e prognóstico da doença (KALIA, 2013).

2.5 Câncer colorretal e polimorfismos genéticos

A variação mais comum encontrada nos polimorfismos é a substituição de um nucleotídeo único (SNPs), os quais podem ser utilizados como marcadores na construção de mapas genéticos ou mutações relacionadas a doenças específicas (ALBERTS et al., 2011). Utilizando-se técnicas como reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, detecção de microarranjos e sequenciamento de ácidos nucleicos, permite-se fazer a identificação dos polimorfismos dos nucleotídeos (PINHO; SITNIK; MANGUEIRA, 2014; CAMPOS; REGADAS; PINHO, 2012).

A identificação de polimorfismos auxilia na determinação do prognóstico do paciente. No caso dos genes da cascata de sinalização estudados, permite-se a determinação da eficácia do tratamento utilizando-se anticorpos monoclonais e possibilitando a utilização de fármacos desenvolvidos para estas mutações específicas como o caso das encontradas no gene *BRAF* (GRADY; PRITCHARD, 2013).

2.5.1 *BRAF*

O gene BRAF está localizado no braço longo do cromossomo 7. A mutação mais comum está localizada no éxon 15, sendo uma alteração no aminoácido 600, ocorrendo a troca de uma glutamina por uma valina (HUSSAIN et al., 2014). Este gene codifica uma proteína da familia Raf da cascata sinalização celular

RAS/RAF/MEK/ERK, esta via tem por função regular o crescimento e apoptose celular (MCCUBREY et al., 2007).

A identificação de mutações neste gene levaram ao desenvolvimento de fármacos específicos, que atuam na inibição da proteína codificada pelo mesmo, como é o caso do vemurafenibe (Zelboraf®) e do dabrafenibe (Tafinlar®) (JOHANSSON; BRAGE, 2014). O vemurafenibe aumenta a sobrevida global em aproximadamente 80% dos pacientes com melanoma, mas ele não apresenta resultados tão efetivos quando utilizado em pacientes com outros tipos de cânceres, a resposta em portadores de CCR com BRAF mutado é de aproximadamente 5% (GIROTTI; MARAIS, 2013).

Este gene é encontrado mutado em aproximadamente 10% dos cânceres do colorretal, sendo considerado um marcador de prognóstico negativo, independente da terapia farmacológica utilizada (GOLDSTEIN; SHAIB; FLOWERS, 2015; SHEN et al., 2011). Vários estudos realizados pelo mundo demonstram esta informação, alguns são citados na tabela 2 a seguir:

Tabela 2: Frequência de polimorfismos BRAF no mundo.

Mutação	Frequência	Referência
BRAF códon 600	2 (1,7%)	Shen et al. (2011), China
BRAF códon 600	8 (7,2 %)	Cushman-Vokoun et al. (2013), Estados Unidos
BRAF códon 600	12 (12,7%)	Levidou et al. (2012), Grécia
BRAF códon 600	13 (15%)	Loupakis et al. (2009), Itália
BRAF códon 600	17 (6.4%)	Kawazoe et al. (2015), Japão

Fontes: Kawazoe et al. (2015); Cushman-Vokoun et al. (2013); Levidou et al. (2012); Shen et al. (2011); Loupakis et al. (2009).

2.5.2 *KRAS*

O gene *KRAS* está localizado no cromossomo 12; a proteína codificada por ele apresenta tamanho de 21 kD, sendo a mutação mais comum que acontece, a troca de um ácido aspártico por uma guanina no nucleotídeo 12 (ROA et al., 2013). Mutações neste gene fornecem a capacidade da proteína ficar ativada mesmo sem ligantes (MCCUBREY et al., 2007).

O gene *KRAS* quando apresenta polimorfismo, é considerado um marcador preditivo negativo quanto a utilização de terapias com anticorpos monoclonais anti EGFR. Pesquisas clínicas, direcionadas a este gene são de extrema importância, pois polimorfismos encontrados especialmente nos códons 12, 13, 61 e 146 do éxon 2, estão presentes em aproximadamente 50% dos casos de CCR (LOPES; CHAMMAS; IYEYASU, 2013; JANCÍK et al., 2010; DOUILLARD et al., 2013). Mutações em Ras sugerem uma maior incidência de metástases pulmonares e cerebrais (SCHIRRIPA et al., 2015).

Alguns estudos que mostram a frequência de polimorfismos no códon 12 e 13 do gene KRAS são exemplificados na tabela 3.

Tabela 3: Frequência de polimorfismos *KRAS* no mundo.

Mutação	Frequência	Referência
***KRAS* códon 12/13**	28/12(33,9%)	Shen et al. (2011), China
***KRAS* códon 12/13**	22 (23,4%)	Levidou et al. (2012), Grécia
***KRAS* códon 12/13**	217 (28%)	Rosty et al. (2012), Austrália
***KRAS* códon 12/13**	51 (36,95%)	Loupakis et al. (2009), Itália

Fonte: Levidou et al. (2012); Rosty et al. (2012); Shen et al. (2011); Loupakis et al. (2009).

2.5.3 *NRAS*

O gene NRAS pertence à família das proteínas Ras, sendo que os polimorfismos que ocorrem neste gene são considerados preditores negativos para a terapia anti-EGFR (DOUILLARD et al., 2013). Análises genéticas devem ser consideradas antes do início do tratamento para CCR metastático, pois a identificação de algum polimorfismo leva a escolha personalizada da terapia, diminuindo custos e melhorando os benefícios do paciente na utilização da terapia farmacológica. As mutações mais comuns ocorrem no éxon 1, 2, 3, 4 (AL-SHAMSI; ALHAZZANI; WOLFF, 2015), em aproximadamente 5% dos cânceres do colorretal (HAIGIS et al., 2008).

Alguns estudos exemplificam a frequência de polimorfismos no códon 12,13 e 61 do gene *NRAS,* como mostrado na tabela 4.

Tabela 4: Frequência de polimorfismos *NRAS* no mundo.

Mutação	Frequência	Referência

***NRAS* códons 12, 13, 61**	9 (4.1%)/ 10 (3.8%)/ 11 (4.2%)	Kawazoe et al. (2015), Japão
***NRAS* códons 12 e 13, 61**	11 (1,75%)/ 13 (2,02%)	Shen et al. (2011), China

Fonte: Kawazoe et al (2015); Shen et al (2011).

2.6 Interdisciplinaridade

A preparação e administração segura dos fármacos quimioterápicos entre eles os anticorpos monoclonais, deve contar com a participação de uma equipe treinada, composta por enfermeiros, médicos e farmacêuticos, pois os mesmos são capacitados para identificar situação em que o paciente encontra-se em risco devido a aplicação destes fármacos, podendo minimizar as intercorrências, garantindo a eficácia terapêutica do esquema (DEBBIO; TONON; SECOLI, 2007).

A qualidade de vida do paciente com câncer deve ser avaliado também como um indicador de resposta e adesão ao tratamento. O seu bem estar físico, mental, social e suas esperanças frente a recuperação devem ser levados em consideração para se alcançar o sucesso do tratamento (NICOLUSSI; SAWADA, 2010). Deve-se promover com o paciente, assim como com sua família e comunidade em geral, a adoção de hábitos alimentares saudáveis, prática de atividade física, visitas médicas regulares, consultas a psicólogos, quando necessário; enfim, maneiras de se obter um maior alcance nas práticas de se evitar o câncer colorretal ou de se fazer seu diagnóstico o mais inicial possível (CAMPOS; REGADAS; PINHO, 2012).

No estudo dos polimorfismos, que é o objeto de estudo, a relação interdisciplinar é percebida desde o momento da suspeita do diagnóstico, passando pela etapa de tratamento e chegando até a alta ou cuidados paliativos. Desta forma, são necessários vários profissionais para a realização de um cuidado individual e completo, como por exemplo, médicos, atuando no diagnóstico, escolha de terapia adequada e realização das biópsias; enfermeiros, realizando o acolhimento e detectando quando o paciente está apresentando muito efeitos colaterais devido a terapia; técnicos de enfermagem participam da aplicação de alguns dos esquemas farmacoterapêuticos e também identificam intercorrências da terapia; farmacêuticos, manipulam os esquemas terapêuticos e realizam as análises para identificação de

polimorfismos, juntamente com os biomédicos; psicólogos, avaliam a qualidade de vida e aceitação do paciente em tratamento. Todos os profissionais atuam de forma integrada, agregam saberes e práticas no cuidado ao paciente, sempre visando proporcionar segurança, incentivo, adesão ao tratamento, alento para os momentos difíceis e força para vencer a batalha da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a prevalência de mutações nos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS*, caracterizar o perfil e o histórico familiar dos pacientes submetidos à retirada de tumores colorretais e de pólipos por colonoscopia nas regiões central e do vale do Rio Pardo do estado do Rio Grande do Sul.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a presença de polimorfismos nos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS* em pacientes com tumores colorretais;
- ✓ Avaliar a presença de polimorfismos nos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS* em pacientes submetidos a retirada de pólipos por colonoscopia;
- ✓ Avaliar o perfil demográfico dos pacientes com câncer colorretal;
- ✓ Avaliar o histórico familiar dos pacientes com câncer colorretal;
- ✓ Comparar a frequência de polimorfismos dos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS* entre pacientes com pólipos e pacientes com tumores colorretais.

4 MÉTODO

4.1 População e amostra

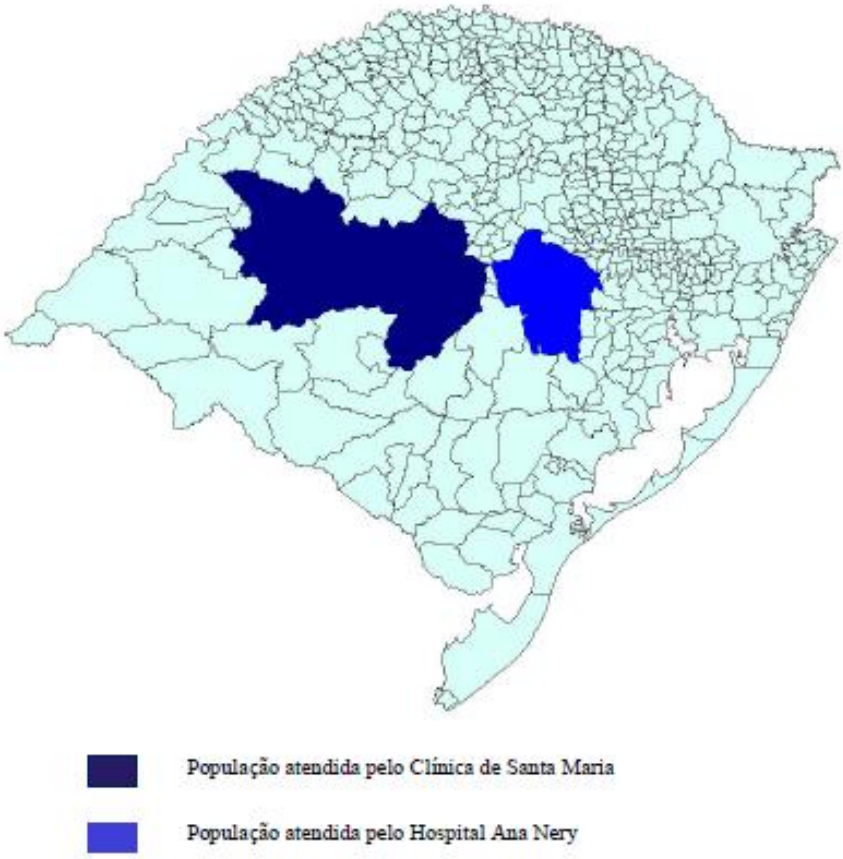
Localizado no vale do Rio Pardo, o município de Santa Cruz do Sul está a 155 km de Porto Alegre. A população é estimada em 118.374 habitantes (IBGE, 2010), sendo um dos principais núcleos da colonização alemã do Rio Grande do Sul (PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTA CRUZ DO SUL, 2014). Tem como indicadores IDH 0,561; PIB R$ 3.287.130,272 mil e PIB per capita R$ 27.128,70 (IBGE, 2010; PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTA CRUZ DO SUL, 2014).

Santa Maria localiza-se na região centro ocidental do estado do Rio Grande do Sul, a 290 km de Porto Alegre. A população é estimada em 261.031 habitantes (IBGE, 2010); sua população é alemã (PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTA MARIA, 2014). Tem como indicadores IDH 0,784; PIB R$ 3.493.225 mil e PIB per capita R$12 200,00 (IBGE, 2010; PREFEITURA MUNICIPAL SANTA MARIA, 2014).

O Hospital Ana Nery está localizado na cidade de Santa Cruz do Sul, foi fundado em 1955 e desde então presta serviços para a comunidade. É o hospital de referência em oncologia para as regiões do vale do Rio Pardo, Centro-Serra e algumas cidades da região carbonífera, atendendo assim a 28ª região de saúde e a 9ª região de saúde. Para atendimento destes pacientes, possui o centro de oncologia integrada (COI), que atua no atendimento, prevenção, diagnóstico, cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Atende em média de 950 pacientes na quimioterapia (sendo 94% SUS) e 100 pacientes na radioterapia (84,7% SUS) (HOSPITAL ANA NERY, 2015).

A população de estudo foram os pacientes submetidos à cirurgia de retirada de tumor colorretal no hospital Ana Nery, de Santa Cruz do Sul, e os que foram submetidos a colonoscopia na clinica endoscopia Caridade de Santa Maria durante o período de novembro de 2015 a outubro de 2016.

Figura 1: Populações utilizadas no estudo, atendidas pelo Hospital Ana Nery e Clinica de Santa Maria.



4.1.1 Critérios de inclusão

Foram critérios de inclusão pessoas com idade acima de 18 anos de ambos os sexos portadores de câncer colorretal e pacientes que apresentaram pólipos no exame de colonoscopia, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foi critério de exclusão a quantidade insuficiente de tecido coletado e falta de qualidade do DNA obtido na extração.

4.1.3 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado no OpenEpi Versão 2 (http://www.OpenEpi.com). Ao se considerar que no Rio Grande do Sul são 11,2 milhões de habitantes e que a estimativa de casos de câncer colorretal nesta população é de 2260 casos por ano, e que na região estudada a população é de em torno de 860.000 habitantes, o número estimado de casos de CCR seria de 173 casos por ano. Para um erro esperado de 5 pontos percentuais, com poder de 80% e alfa de 95%, e uma prevalência dos polimorfismos estudados de 20%, a amostra final será de 66 casos. Adicionam-se 10% para perdas e recusas, ficando com um total de 72 casos de câncer colorretal.

4.2 Delineamento metodológico

A presente pesquisa consistiu em um estudo do tipo transversal observacional prospectivo. Este tipo de estudo é realizado por um curto período e mede a prevalência do desfecho pesquisado, sem fazer qualquer intervenção (HULLEY et al., 2015).

4.3 Hipóteses e variáveis

O presente estudo levanta as seguintes hipóteses:

H1: A frequência de polimorfismos do gene *BRAF, KRAS* e *NRAS* nos paciente submetidos a cirurgia de retirada de tumor colorretal são maiores que naqueles pacientes submetidos a retirada de pólipos;

H2: A prevalência de polimorfismos do gene *BRAF*, do gene *KRAS* e do gene *NRAS* nos pacientes submetidos a cirurgia de retirada de tumor colorretal tem ligação com histórico familiar;

H3: A frequência de polimorfismos em *BRAF*, *KRAS* e *NRAS* é igual a que é descrita na literatura para pacientes caucasianos;

H4: A frequência de polimorfismos encontrada nos pacientes oncológicos atendidos pelo hospital Ana Nery difere dos pacientes oncológicos atendidos pela clinica de endoscopia Caridade de Santa Maria.

As variáveis a serem utilizadas no estudo, estão descritas, separadas por categoria, na tabela 5, a seguir:

Tabela 5: Variáveis a serem utilizadas no estudo.

Variável independente		
Variável	Descrição	Tipo
Idade	Anos completos obtidos através da data nascimento.	Quantitativa contínua
Sexo	masculino ou feminino	Qualitativa nominal
Cor da Pele	Cor da pele referida	Qualitativa dicotômica
Histórico familiar	Parentesco de primeiro grau	Qualitativa dicotômica
Comorbidade	Presença ou ausência de comorbidade	Qualitativa dicotômica
Tabagismo	Presença ou ausência hábito tabágico	Qualitativa dicotômica
Variável dependente		
Presença polimorfismos KRAS	Presença ou ausência de polimorfismos	Qualitativa dicotômica
Presença polimorfismos BRAF	Presença ou ausência de polimorfismos	Qualitativa dicotômica
Presença polimorfismos NRAS	Presença ou ausência de polimorfismos	Qualitativa dicotômica

Fonte: HULLEY et al., 2015.

4.4 Procedimentos metodológicos

O presente estudo foi realizado nas seguintes etapas:

1ª etapa: Revisão literária do tema proposto para dissertação;

2ª etapa: Elaboração do projeto de pesquisa;

3ª etapa: Apresentação do projeto ao centro de oncologia integrado (COI) do Hospital Ana Nery e na Clinica Caridade de Santa Maria para obtenção das cartas de aceite;

4ª etapa: Encaminhamento do projeto para aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa;

5ª etapa: Coleta das amostras e dos dados demográficos e clínicos;

6ª etapa: Realização de análises dos polimorfismos dos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS* através de sequenciamento;

7ª etapa: Análise e discussão dos dados;

8ª etapa: Elaboração da dissertação;

9ª etapa: Defesa da dissertação;

10ª etapa: Divulgação dos resultados.

4.5 Técnicas e instrumentos de coleta

4.5.1 Coleta de dados

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi utilizado um questionário próprio para coleta de dados do paciente, como idade, sexo, presença de comorbidade, hábito tabágico e histórico familiar de câncer do colorretal.

4.5.2 Coleta das amostras biológicas

A coleta da biópsia foi realizada pelo médico responsável na sala de cirurgia do hospital participante do estudo e da clinica, após a assinatura do TCLE pelo paciente. Em seguida, uma amostra de 100 mg do tumor foi separada e acondicionada em tubos contendo tampão EDTA, sendo encaminhado aos laboratórios Centro de Pesquisa e Treinamento em Biotecnologia (CPTBio) para as análises moleculares.

4.5.1 Extrações de DNA a partir da biópsia

As amostras de biópsia foram acondicionadas em solução de TE e a extração foi realizada utilizando o seguinte protocolo padronizado no CPTBio, adaptado de Tosti et al (2003): Usar 12 mg de amostra (tecido tumoral) e macerar; adicionar 180 µL de tampão de lise celular; Incubar por 10 minutos a 100ºC; adicionar 40 µL de proteinase K (10mg/mL); incubar por 3 horas a 55ºC (A cada 30 minutos passar no vórtex); adicionar 600 µL de lise celular; Passar no vórtex por 15 segundos; incubar por 30 minutos a 65ºC; 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.

4.5.2 Quantificação do DNA

Após a extração do DNA foi realizada a quantificação das amostras de DNA no equipamento Nanodrop e a concentração final de DNA foi ajustada para 100ng/µl. Depois, foi estocada a -20°C, até ser utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR).

4.5.4 Reações da PCR

A PCR foi padronizada utilizando 20 ng de DNA, sendo que as reações foram preparadas com os seguintes reagentes: 1,5mM $MgCl_2$; 0,2 mM dNTP; Tampão 10x; 0,2 mM de cada primer; 0,5U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As condições de ciclagem utilizadas, de acordo com cada par de primer, consta na tabela 6.

Tabela 6: Primers, características da amplificação e alvo.

Gene	Sequência do primer 5`-3`	Fragmento	Ciclo de Amplificação	Alvo	Ref
KRAS	*F*5` GTATTAACCTTATGTGTGACA 3` *R* 5` GTCCTGCACCAGTAATATGC 3`	222pb	94°C 5' , 94°C 1', 53°C 1', 72°C 1', 72°C 10', 40 ciclos	Códons 12 e 13	Tong et al.(2014),
KRAS	*F* 5`TCTGAAGATGTACCTATGGTCCTAGT3 *R* 5` AAGAAGCAATGCCCTCTCAA 3´	288pb	94°C 5' , 94°C 1', 58°C 1', 72°C 1', 72°C 10', 40 ciclos	Códon 146	Tong et al.(2014),
KRAS	F 5´TGCACTGTAATAATCCAGACTGTG 3` R 5`TTTAAACCCACCTATAATGGTGAA 3`	229pb	94°C 5' , 94°C 1', 57°C 1', 72°C 1', 72°C 10', 40 ciclos	Códon 61	Tong et al.(2014),
BRAF	*F* 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' R 5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3'.	116pb	95ºC 10' 95ºC 30'', 56ºC 30'', 72ºC 45'' , 72ºC 10', 38 ciclos	Éxon 15	Quiu et al.(2015)
NRAS	*F5'-* GGTGTGAAATGACTGAGTAC R 5' – GGGCCTCACCTCTATGGTG	128pb	95°C 8', 95°C 20'', 58°C 30'',	Éxon 2	Irahara et al. (2010)

			72ºC 1', 72ºC 3', 45 ciclos		
NRAS	*F5'*- AAACAAGTGGTTATAGATGGT R5' – CACAGAGGAAGCCTTCGCCT	97pb	95°C 8', 95°C 20'', 58°C 30'', 72ºC 1', 72ºC 3', 45 ciclos	Éxon 3	Irahara et al. (2010)
NRAS	*F5'* – CTTGCACAAATGCTGAAAGC R5' - TTTGCCAACAAGGACAGTTG	124 pb	95°C 8', 95°C 20'', 58°C 30'', 72ºC 1', 72ºC 3',45 ciclos	Éxon 4	Irahara et al. (2010)

4.5.5 Eletroforese

Após a extração de DNA e amplificação do material genético, foi realizada a técnica de eletroforese em gel de agarose 2% com tampão Tris, EDTA e ácido bórico (TBE 1x), aplicando-se 8µl de produto de PCR e 2 µl de tampão de corrida (azul de bromofenol), utilizando como referência a escala de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen), em seguida corado com brometo de etídeo e visualizado em luz ultravioleta, para verificação da presença do fragmento desejado.

4.5.6 Purificações do Produto de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com PEG8000/2,5M NaCl. Mistirar 2,5µL do produto da PCR e 2,5µL de PEG8000/2,5M NaCl em um microtubo; Misturar no vortex; Incubar em banho maria a 37 ºC durante 15minutos; Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos; Descartar o sobrenadante; Adicionar 500µL de etanol 50%; Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos**;** Descartar o sobrenadante e secar levemente a boca do tubo; Deixar evaporar por uma hora (observar se esta seco, senão deixar mais tempo); Adicionar 30µL de água MiliQ (ultrapura); Incubar em banho maria a 37ºC por 30 minutos; Guardar a -20ºC.

4.5.7 Sequenciamento

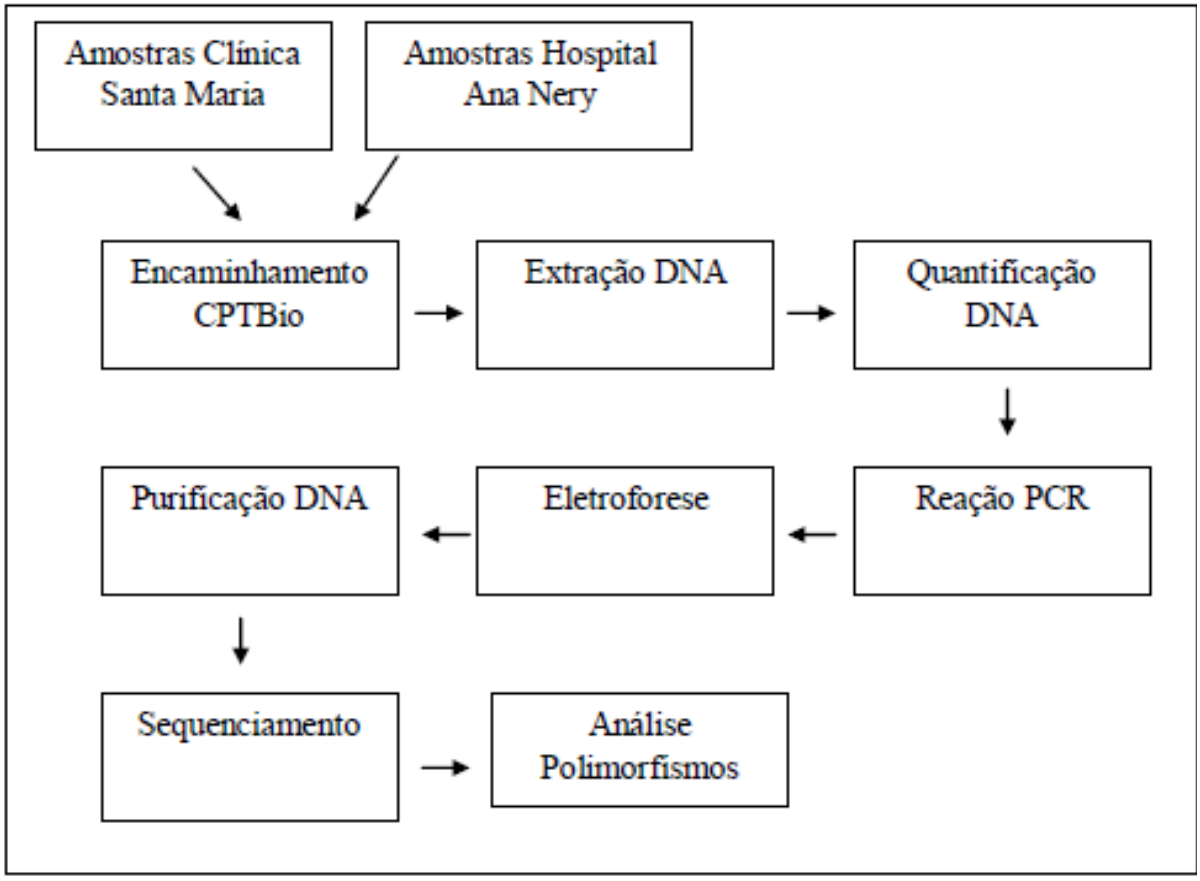
Os mesmos primers utilizados na PCR foram utilizados para a reação de sequenciamento, o qual foi realizado no CPTBio (bloco 55 da UNISC), utilizando o

equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do primer e 1 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 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 96ºC por 1 min seguida de 35 ciclos de 96ºC por 15 seg, 50ºC por 15 seg e 60ºC por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas com protocolo utilizando isopropanol e eletroinjetadas no sequenciador automático.

4.5.8 Análises dos polimorfismos

Depois de realizada as técnicas de extração de DNA, PCR e sequenciamento, foi construído um banco de dados no Excel. As sequências obtidas foram analisadas pelo programa Chromas^{TM} versão 2.3, através dos cromatogramas fornecidos após o sequenciamento. O alinhamento das sequências foi realizado no programa DNASTAR - Lasergene 7, e a análise comparativa foi realizada no BLAST. Na figura 1 está ilustrado o fluxograma das análises realizadas para detecção dos polimorfismos dos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS.*

Figura 2: Fluxograma das análises realizadas para detecção polimorfismos dos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS.*



Legenda: CPTBio: Centro de Pesquisa em Ensino de Biotecnologia.

4.6 Processamento e análises de dados

A análise das informações foi tabulada no Programa SPSS (v. 20, IBM, Armonk, NY, USA). Todas as informações foram comparadas entre o grupo de pacientes portadores de câncer do colorretal de Santa Cruz do Sul e Santa Maria. Nas análises descritivas foram relacionados número absoluto, frequência, médias, desvio padrão e medianas. Para comparação das variáveis categóricas, foi utilizado teste de qui-quadrado ou teste de Fisher. Para análises de variáveis contínuas foi

utilizado teste t de student. Intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados quando necessários, sendo considerado estatisticamente significativo o $p<0,05$.

4.7 Considerações éticas

Primeiramente, o projeto foi encaminhado para o 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 foi possivel após os mesmos assinarem o Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido (ANEXO B), o qual os explica sobre a pesquisa, bem como assegura sobre a garantia do sigilo. Além de que as informações obtidas só poderão ser utilizadas para fins científicos, vinculados ao projeto. A pesquisa cumpriu com as exigências da Resolução CNS 466/12 e demais resoluções éticas Brasileiras.

A pesquisa foi realizada por meio de pesquisa em prontuários e coleta de amostras biológicas. A coleta de dados foi realizada em ambiente hospitalar (Hospital Ana Nery e Clinica de endoscopia Caridade de Santa Maria), onde foi feito também a captação do material biológico.

5 CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividades/Etapas Metodológicas	2015		2016		2017
	1º sem.	2º sem.	1º sem.	2º sem.	1° sem.
Revisão de literatura	X	X	X	X	
Elaboração do projeto	X	X			
Defesa do projeto		X			
Encaminhamento ao Comitê de Ética		X			
Coleta de dados		X	X		
Análises laboratoriais			X		
Digitação dos dados			X	X	
Análise e discussão dos dados			X	X	
Redação final da dissertação				X	
Pré-defesa da dissertação				X	
Encaminhamento do artigo para publicação					X
Defesa da dissertação					X

6 RECURSOS HUMANOS E INFRAESTRUTURA

Os recursos humanos que foram utilizados: mestranda, orientadora, coorientadora e colaboradores. Os colaboradores foram um bolsista do ensino médio, um bolsista de iniciação científica, os médicos coloproctologistas que realizaram as cirurgias no Hospital Ana Nery e um médico coloproctologista de Santa Maria.

A infraestrutura utilizada foi: as dependências do Centro de Pesquisa em Ensino de Biotecnologia (CPTBio). As coletas foram realizadas no bloco cirúrgico do Hospital Ana Nery e na Clinica de endoscopia Caridade de Santa Maria. As reuniões com os orientadores e colaboradores foram realizadas tanto na sala de estudo do CPTBio, como também nas dependências do Prédio 42, onde está localizado o Mestrado de Promoção da Saúde.

7 ORÇAMENTO

Especificações	Quantidade	Valor unitário (R$)	Valor total (R$)	Fonte Viabilizadora
Primers KRAS códon 12 e 13; 61 e 146	06	43,63	261,80	Pesquisador
Primers BRAF códon 600	02	40,94	81,88	Pesquisador
Primers NRAS éxon 2, 3, 4	06	37,38	224,28	Pesquisador
Dntp mix	1	350,00	350,00	Pesquisador
Taq DNA Polimerase	01	219,00	219,00	Pesquisador
Microtubos 1,5 ml 500 un.	01	36,00	36,00	Pesquisador
Ponteira p 1000/ 500 un.	01	32,50	32,50	Pesquisador
Ponteira p 200/ 500 un.	01	21,00	21,00	Pesquisador
Kit purificação de PCR Exosap	01	220,00	220,00	Pesquisador
Tampão catodo (kit com 4 unidades)	01	645,00	645,00	Pesquisador
Tampão anodo (kit com 4 unidades)	01	468,00	468,00	Pesquisador
Conditioning Reagent (1 unidade)	4	117,00	468,00	Pesquisador
Hi-Di™ Formamide 25 mL	1	148,00	148,00	Pesquisador
POP-7™ 384 samples pouch	1	831,00	831,00	Pesquisador
Água livre de nuclease 500 mL	1	226,00	226,00	Pesquisador
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	1	4546,00	4546,00	Pesquisador
Placas de 0,2 mL de 96 amostras. Caixa com 10 unidades	1	362,40	362,40	Pesquisador
TOTAL			9.135,86	Pesquisador

8 RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

A realização deste estudo proporcionou dados sobre a prevalência de polimorfismos nos genes BRAF, NRAS e KRAS nos pacientes portadores de câncer colorretal atendidos pelos hospitais Ana Nery e na Clínica de endoscopia Caridade de Santa Maria. Portanto, pode-se realizar um diagnóstico situacional, a partir dos resultados, assim contribuindo para as ações tomadas em relação a pacientes com câncer do colorretal nos municípios de Santa Cruz do Sul/RS e Santa Maria/RS, os quais são referência para atendimento da 13ºCRS e 4º CRS. Essa pesquisa objetivou contribuir para ações interdisciplinares de promoção a saúde, como identificação precoce de resistência ao tratamento com anticorpos monoclonais utilizados no CCR, melhorar a resposta ao tratamento, diminuir os custos de internação e promover mudanças de estilos de vida a este grupo de pacientes nos municípios citados e também em regiões das quais eles fazem parte.

9 RISCOS/DIFICULDADES/LIMITAÇÕES

Como risco encontrado para o estudo pode-se citar: não obtenção de DNA em condições ideais para a realização das análises (DNA íntegro).

As dificuldades encontradas foram a obtenção da padronização da técnica de PCR e sequenciamento utilizada nas análises e o término de reagentes para o sequenciamento.

Como limitação cita-se amostra insuficiente, não podendo caracterizar a população estudada.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. *Fundamentos da biologia celular.* 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ALMEIDA, J.R.C. et al. Marcadores tumorais: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.Qualis: B2

AL-SHAMSI, H. O.; ALHAZZANI, W.; WOLFF, R. A. Extended RAS testing in metastatic colorectal cancer—Refining the predictive molecular biomarkers. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, v. 6, n. 3, p. 314, 2015. Qualis: B2

ASSIS, R. V. B. F. Rastreamento e Vigilância do Câncer Colorretal: Guidelines Mundiais. *Gastroenterologia Endoscópica Digestiva*, v. 30, n. 2, p. 62-74, 2011. Qualis: B3

BAROUDI, O. et al. Polymorphisms (C677T and A1298C) of MTHFR Gene in Sporadic Gastro-intestinal Cancers in Tunisian Population: Interaction with Dairy Products, Treatment and Prognostic Factors. *Journal Cancer Science Therapy*, v. 6, p. 001-008, 2014.

BINEFA, G et al. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 22, p. 6786, 2014. Qualis: A2

BRAMBILLA, E et al. Staging of colorectal cancer in the private service versus Brazilian National Public Health System: what has changed after five years? *Journal of Coloproctology* (Rio de Janeiro), v. 32, n. 2, p. 144-147, 2012. Qualis: B2

BRUIN, S. C. et al. Molecular alterations associated with liver metastases development in colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, v. 105, n. 2, p. 281-287, 2011. Qualis: A1

CAI, S.-R. et al. Gender disparities in dietary status and its risk factors in underserved populations. P*ublic Health*, v. 126, n. 4, p. 324-331, 2012.Qualis: B2

CAMPOS, F.G.C.M.; REGADAS, F. S. P.; PINHO, M. *Tratado de coloproctologia*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. *Journal de Pneumologia*, v. 27, n. 6, p. 321, 2001.

COPPEDÈ, F. et al. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 4, p. 943, 2014. Qualis: A2

CREMOLINI, C. et al. First-line chemotherapy for mCRC [mdash] a review and evidence-based algorithm. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2015. Qualis: A1

CUSHMAN-VOKOUN, A. M. et al. Clinical utility of KRAS and BRAF mutations in a cohort of patients with colorectal neoplasms submitted for microsatellite instability testing. *Clinical Colorectal Cancer*, v. 12, n. 3, p. 168-178, 2013. Qualis; B1

DEBBIO, C. B. del; TONON, L. M.; SECOLI, S. R. Terapia com anticorpos monoclonais: uma revisão de literatura. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, v. 28, n. 1, p. 133-142, 2007. Qualis: B1

DESTENAVES, B.; THOMAS, F. New advances in pharmacogenomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 4, n. 4, p. 440-444, 2000. Qualis: A1

DOUILLARD, J.Y. et al. Panitumumab–FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. New England Journal of Medicine*, v. 369, n. 11, p. 1023-1034, 2013. Qualis: A1

GIROTTI, M. R.; MARAIS, R. Deja Vu: EGF receptors drive resistance to BRAF inhibitors. *Cancer Discovery*, v. 3, n. 5, p. 487-490, 2013. Qualis: C

GOLDSTEIN, D. A.; SHAIB, W. L.; FLOWERS, C. R. Costs and Effectiveness of Genomic Testing in the Management of Colorectal Cancer. *Oncology* (Williston Park, NY), v. 29, n. 3, 2015. Qualis: B1

GRADY, W. M.; PRITCHARD, C. C. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicologic Pathology*, p. 0192623313505155, 2013. Qualis: B1

HAAS, P.; ANTON, A.; FRANCISCO, A. Câncer colo retal no Brasil: consumo de grãos integrais como prevenção. *Revista Brasileira de Análises Clinicas*, v. 39, n. 3, p. 231-235, 2007. Qualis: B4

HAIGIS, K. M. et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature Genetics*, v. 40, n. 5, p. 600-608, 2008. Qualis: A1

HARRIS, J. N. et al. Oncologists' attitudes toward KRAS testing: a multisite study. *Cancer Medicine*, v. 2, n. 6, p. 881-888, 2013.

HOSPITAL ANA NERY (2014). Disponível em: http://www.hospitalananery.com.br/. Acesso em: 15 jun 2015.

HULLEY, S. B. et al. *Delineando a pesquisa clínica.* 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

HUSSAIN, M. R. M. et al. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2014. Qualis: B5

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE 2010. Disponível em: http://cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=. Acesso em: 13 jun 2015

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA 2014. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao+ Acesso em: 05 abr 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Estimativa 2014 para o câncer no Brasil. Disponivel em : http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/.Acesso 05 abr 2015.

IRAHARA, N. et al. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology*, part B, v. 19, n. 3, p. 157, 2010. Qualis: B1

JANČÍK, S. et al. Clinical relevance of KRAS in human cancers. *BioMedicine Research International*, v. 2010, 2010.

JOHANSSON, C. H.; BRAGE, S.E. BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 142, n. 2, p. 176-182, 2014. Qualis; A1

KALIA, M. Personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism*, v. 62, p. S11-S14, 2013.

KALIL, A. N. et al. The association between preoperative chemotherapy and the prevalence of hepatic steatosis in hepatectomy for metastatic colorectal cancer. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo),* v. 27, n. 2, p. 120-125, 2014.

KAWAZOE, A. et al. A retrospective observational study of clinicopathological features of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Biomed Central Cancer*, v. 15, n. 1, p. 258, 2015. Fator Impacto: 3,36

LA THANGUE, N. B.; KERR, D. J. Predictive biomarkers: a paradigm shift towards personalized cancer medicine. *Nature reviews Clinical oncology*, v. 8, n. 10, p. 587-596, 2011.Qualis: A1

LEVIDOU, G. et al. ERK/pERK expression and B-raf mutations in colon adenocarcinomas: correlation with clinicopathological characteristics. *World Journal of Surgical Oncology*, v. 10, p. 47, 2012. Qualis: A2

LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, H. *Oncologia para a Graduação***.** 3. ed. São Paulo: Lemar, 2013.

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. 715-721, 2009. Qualis: 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. Qualis: A1

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. *Medicina (Ribeirao Preto. Online),* v. 39, n. 4, p. 515-521, 2006.

NICOLUSSI, A. C.; SAWADA, N. O. Fatores que influenciam a qualidade de vida de pacientes com câncer de cólon e reto. *Acta Paulista Enfermagem*, v. 23, n. 1, p. 125-30, 2010. Qualis: A2

OLIVEIRA, G. G.; FONSECA, C. A. Uso de marcadores tumorais no diagnostico e acompanhamento do tratamento do câncer. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 8, n. 2, p. 15,
2011. Qualis: B4

ORTIZ AP. et al. Insulin resistance, central obesity and risk of colorectal adenomas. *National Institutes of Health* Public Access. 2012

PANCZYK, M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 29, p. 9775, 2014. Qualis: A2

PARADA, R.. et al. A política nacional de atenção oncológica e o papel da atenção básica na prevenção e controle do câncer. *Revista. APS*, v. 11, n. 2, 2008.Qualis: B3

PEREZ, K. et al. Heterogeneity of colorectal cancer (CRC) in reference to KRAS proto-oncogene utilizing WAVE technology. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 95, n. 1, p. 74-82, 2013. Qualis: A2

PIERCE, B. A. *Genética*: um enfoque conceitual. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 774 p. 2011.

PINHO, J. R. R.; SITNIK, R.; MANGUEIRA, C. L. P. Medicina personalizada e o laboratório clínico. 2014.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTA CRUZ DO SUL. 2014. Disponível em: http://www.santacruz.rs.gov.br/. Acesso em: 13 junh 2015.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTA MARIA. 2014. Disponível em: http://www.santamaria.rs.gov.br/. Acesso em: 13 junh 2015.

QIU, T. et al. Detection of BRAF mutation in Chinese tumor patients using a highly sensitive antibody immunohistochemistry assay. *Scientific Reports*, v. 5, 2015. Qualis: B2

ROA, I. et al. Mutación del gen KRAS en el cáncer de colon y recto. *Revista Médica de Chile*, v. 141, n. 9, p. 1166-1172, 2013. Qualis: B2

ROSTY, C. et al. Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. *Modern Pathology*, v. 26, n. 6, p. 825-834, 2013. Qualis: A1

SANDLER, R.S., Dietary and lifestyle measures to lower colorectal cancer risk. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2010. Qualis: A1

SANTOS JÚNIOR JCM.Contribuição à campanha nacional de conscientização sobre o câncer do intestino grosso - A questão da prevenção e do diagnóstico precoce. *Revista Brasileira de Coloproctologia* v.23, n.1, p. 32-40, 2003. Qualis: B3

SANTOS JÚNIOR, J. C. Câncer ano-reto-cólico: aspectos atuais IV-câncer de colón-fatores clínicos, epidemiológicos e preventivos. *Revista Brasileira de Coloproctologia*, v. 28, p. 378-85, 2007. Qualis: B3

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. Qualis: B3

SCHIRRIPA, M. et al. BRAF and RAS mutations as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection. *British Journal of Cancer*, v.112, p. 1921-1928, 2015. Qualis: A1

SHEN, H. et al. Clinical significance of K-ras and BRAF mutations in Chinese colorectal cancer patients. *World journal of Gastroenterology: WJG*, v. 17, n. 6, p. 809, 2011. Qualis: A2

SHRUBSOLE, M. J. et al. Alcohol drinking, cigarette smoking, and risk of colorectal adenomatous and hyperplastic polyps. *American Journal of Epidemiology.* v. 167, n. 9, p. 1050-1058, 2008. Qualis: A1

TAY, Rebecca Y.; WONG, Rachel; HAWKES, Eliza A. Treatment of metastatic colorectal cancer: focus on panitumumab. *Cancer management and research*, v. 7, p. 189, 2015.

TOMASICH, F. D. S. et al. Correlação entre os marcadores tumorais CEA e CA 72-4 e a profundidade de invasão no câncer gástrico.*Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, n. 1, p. 57-62, 2002. Qualis: B2

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. Qualis: A2

TONON, L. M.; SECOLI, S. R.; CAPONERO, R. Câncer colorretal: uma visão da abordagem terapêutica com bevacizumabe. *Revista Brasileira Cancerologia*, v. 53, n. 2, p. 173-82, 2007. Qualis: B2

TOST, Jörg et al. Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry. Nucleic acids research, v. 31, n. 9, p. e50-e50, 2003.

VENOOK, A. Critical evaluation of current treatments in metastatic colorectal cancer. *The Oncologist*, v. 10, n. 4, p. 250-261, 2005. Qualis: A1

VIEIRA, F. M. A. C.; DI SENA, V. O. Câncer colorretal metastático: papel atual dos anticorpos monoclonais e a individualização de seu uso. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, v. 22, n. 1, p. 45-9, 2009. Qualis: B2

ZANDONAI, A. P.; SONOBE, H. M.; SAWADA, N. O. Os fatores de riscos alimentares para câncer colorretal relacionado ao consumo de carnes. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 46, n. 1, p. 234-239, 2012. Qualis: A2

CAPÍTULO II

RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO

RELATO DE CAMPO

Ao se delinear o projeto intitulado “Pesquisa de polimorfismos dos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS* em portadores de câncer colorretal” buscou-se pensar em centros que teriam um fluxo adequado de pacientes atendidos, para se conseguir um número significativo de amostras. Desta maneira, optou-se por uma clinica de endoscopia de Santa Maria para coleta de pólipos, na qual o Dr Rudimar Issler Meurer seria parceiro e o Hospital Ana Nery para coleta de biópsias colorretal, ao qual o Dr Inácio Swarowsky seria parceiro.

Em relação a aceitação da clinica de Santa Maria, não se teve problemas para a assinatura do consentimento para a coleta de pólipos durante as colonoscopias realizadas pelo Dr Rudimar.

Na reunião realizada no dia 23 de outubro de 2015 com o Dr Luiz Alberto Hauth, diretor médico do Hospital Ana Nery, Laura, responsável pelos recursos humanos do hospital e a enfermeira Claudia, centro de oncologia integrado, obteve-se a aprovação para a captação de amostras de tumor cólon e reto dos pacientes da clinica SUS. O Dr Hauth sugeriu-nos que convidássemos os outros dois médicos cirurgiões que realizam o mesmo tipo de cirurgia que o Dr Inácio Swarowsky, que são o Dr Mário Antonio Ferrari e o Dr Charles Sudbrack, ficando a enfermeira Claudia responsável por marcar este encontro.

Obteve-se a aprovação do comitê ética em pesquisa em novembro de 2016, após isso, prossegui-se com os contatos no Hospital Ana Nery para criar-se o fluxograma de coleta de biopsias. No final do mês de Novembro foi realizada uma reunião com a enfermeira Vanessa, chefe da enfermagem, enfermeira Suzeline, enfermeira chefe do bloco cirúrgico, Laura, representante RH. Ficou acertado que quando um dos três médicos marcasse cirurgia, a mestranda receberia um email da central de marcação, avisando a data e o horário; A mestranda e/ou bolsista iria no dia anterior conversar com o paciente, este já internado, para apresentação do estudo, assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e realização do questionário; No dia da cirurgia, a mestranda e/ou bolsista estaria no bloco pra

entregar o tubo para coleta e posteriormente recolhê-lo, encaminhando-o para o laboratório do CPTBio.

A reunião com o Dr Mário e o Dr Charles foi realizada no inicio de Janeiro, pois os mesmos estavam de recesso em virtude do final do ano. Após a apresentação do projeto e aceitação de participação, foi orientando que as cirurgias ocorriam no final da tarde, por volta de 17horas e as quartas feiras.

As coletas das biopsias foram realizadas por seis meses, a mestranda contou com a total colaboração da equipe do Hospital Ana Nery envolvida na pesquisa, sempre auxiliando da melhor forma possível.

Após este período, prosseguiu-se com a análise dos prontuários dos pacientes. Foi realizada uma alteração no instrumento de pesquisa, onde foi incluido a presença de comorbidade e hábito tabágico.

Ao iniciar-se o mês de setembro os reagentes do sequenciador terminaram, o que gerou uma certa apreensão por parte da mestranda, pois ainda faltavam dois genes para serem sequenciados, *BRAF* e *NRAS*. Com relação a amplificação e purificação tudo ocorreu conforme o planejado. Os reagentes chegaram no inicio de novembro prosseguindo-se com as análises.

Em dezembro o capilar do sequenciador teve que ser trocado. A compra foi providenciada ainda no mesmo mês, mas somente chegou em janeiro de 2017. Devido a este problema, as análises do gene *NRAS* não foram concluídas até o prazo final de entrega desta dissertação. Portanto, os resultados das análises deste gene não constam nos artigos que estão anexados. Sendo que vão ser terminadas posteriormente.

CAPÍTULO III

ARTIGOS

ARTIGO I

Caracterização de pacientes pré-cirúrgicos com neoplasia colorretal atendidos pelo sistema único de saúde em um hospital do interior do estado do Rio Grande do Sul

Revista Brasileira de Epidemiologia

Caracterização de pacientes pré-cirúrgicos com neoplasia colorretal atendidos pelo sistema único de saúde em um hospital do interior do estado do Rio Grande do Sul

Emelin Pappen[1,4], Lia Gonçalves Possuelo[1], Martina Fernanda Gewher[2], Eliara Folleto[2], Marcelo Luis Dotto[3], Inácio Swarosky[3], Charles Sudback[3], Mário Antônio Ferrari[3], Jane Dagmar Pollo Renner[1]

1. Mestrado de Promoção da Saúde da Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC
2. Faculdade de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC
3. Hospital Ana Nery
4. Bolsista BIPPS do programa de Mestrado em Promoção da Saúde

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal é a terceira causa de morte entre homens e a segunda entre as mulheres no Brasil. Devido a falta de politicas públicas específicas e o seu desenvolvimento lento, seus sintomas são negligenciados, determinando um diagnóstico tardio, reduzindo as chances de cura. O objetivo deste estudo foi caracterizar os pacientes pré-cirúrgicos de câncer colorretal atendidos pelo sistema único de saúde (SUS) no Hospital Ana Nery e a distribuição dos casos entre os municípios da 9ª e 28ª região de saúde do Rio Grande do Sul. Metodologia: Estudo transversal composto por 35 pacientes atendidos no período de janeiro a junho de 2016 pelo Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul – RS. Os dados demográfico e clínicos dos pacientes foram obtidos a partir da revisão dos prontuários e de entrevista utilizando questionário estruturado. **Resultados:** A média de idade dos pacientes foi de 58,68±13,45, 60% eram do sexo masculino, 62,9% não eram tabagistas O histórico familiar de CCR foi maior entre as mulheres (p=0,04).O tipo de

tumor mais comum foi localizado no cólon (51,4%), 45,7% tinham estadiamento II e 65,7% tiverem tratamento terapêutico adjuvante. **Conclusão:** O histórico familiar de CCR foi maior entre mulheres e o diagnóstico foi realizado em um estadiamento mais precoce, possibilitando melhores chances de cura para os portadores.

Descritores: Câncer colorretal; Estadiamento; Quimioterapia Adjuvante.

ABSTRACT

Introduction: Colorectal cancer is the third cause of death among men and the second among women in Brazil. Due to the lack of specific public policies and its slow development, its symptoms are neglected, determining a late diagnosis, reducing the chances of cure. The objective of this study was to characterize the pre-surgical patients of colorectal cancer attended by the single health system (SUS) at the Hospital Ana Nery and the distribution of cases among the municipalities of the 9th and 28th health region of Rio Grande do Sul. Methodology: A cross-sectional study comprised of 35 patients attended from January to June 2016 by the Ana Nery Hospital of Santa Cruz do Sul - RS. The demographic and clinical data of the patients were obtained from the review of the medical records and the interview using a structured questionnaire. Results: The mean age of the patients was 58.68 ± 13.45, 60% were male, 62.9% were not smokers. The family history of RCC was higher among women ($p = 0.04$). The most common tumor type was located in the colon (51.4%), 45.7% had staging II, and 65.7% had adjuvant therapy. Conclusion: The

family history of RCC was higher among women and the diagnosis was made in an earlier staging, allowing better chances of cure for the patients.

Key words: Colorectal neoplasm; Neoplasm staging; Chemotherapy, adjuvant

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, passou-se a diagnosticar na América do Sul, com maior frequência os tipos de câncer tipicamente dos países desenvolvidos, como o câncer de colorretal (CCR). O CCR é a terceira causa de morte no mundo, e no Brasil, para o anos de 2016/2017, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) é que ocorra o aparecimento de 16.660 e 17.720 novos casos entre homens e mulheres, respectivamente. Estima-se que no Rio Grande do Sul sejam diagnosticados 3.190 novos casos de CCR para o mesmo ano.

O surgimento de CCR origina-se do desenvolvimento hiperproliferativo de células do epitélio intestinal, que muitas vezes acumulam mutações nos genes supressores de tumores ou nos oncogenes. Os fatores associados ao desenvolvimento desta neoplasia podem ter sua origem na alimentação, no ambiente ou no local de moradia do paciente, como por exemplo, presença de comorbidades, ingestão de ácool etílico, tabagismo, consumo elevado de gorduras e carnes vermelhas, etnia, idade e o sexo[2,4,5,6].

Os programas de prevenção e rastreio de câncer devem abranger pacientes que apresentem ou não sintomas objetivando o diagnóstico precoce da doença, ainda em estadiamento inicial. O estadiamento é realizado levando em consideração a presença dos linfonodos comprometidos e de metástases em outros órgãos, sendo

essencial para a escolha do tratamento [6,7]. A falta de informação, somada à carência de programas efetivos de rastreamento e prevenção do câncer de CCR no Brasil, levam a um negligenciamento dos sintomas ocasionando um diagnóstico tardio e estadiamento mais avançado da doença [8,9].

Diante do exposto acima, o objetivo do estudo foi caracterizar os pacientes pré-cirúrgicos de câncer colorretal atendidos pelo sistema único de saúde (SUS) no Hospital Ana Nery e a distribuição dos casos entre os municípios da 9ª e 28ª região de saúde do Rio Grande do Sul.

METODOLOGIA

Foi realizado um estudo transversal e observacional com os pacientes pré-cirúrgicos de CCR, atendidos pelo Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul – RS pelo sistema único de saúde (SUS), nos meses de janeiro a junho de 2016. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) sob o protocolo nº 110866/2015 e seguiu as recomendações da Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 466, 12 de dezembro de 2012.

O Hospital Ana Nery está localizado na cidade de Santa Cruz do Sul, sendo a referência em oncologia da 28ª região se saúde e desde 2013, após a publicação da resolução 108/13[10] passou também a atender pacientes oncológicos pertencentes a 9ª região de saúde do Rio Grande do Sul. Possui o Centro de Oncologia Integrada (COI), que atua no atendimento, prevenção, diagnóstico, cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Atende em média 950 pacientes na quimioterapia (sendo 94% SUS) e 100 pacientes na radioterapia (84,7% SUS) por mês[11].

O Rio Grande do Sul (RS) é composto por 30 regiões de saúde, que agrupam municípios com o intituito de melhorar o acesso á saúde. A 9º região de saúde, conhecida como região carbonífera, faz parte da 2ª coordenadoria regional de saúde do estado, é composta por 19 municípios, atendendo uma população de aproximadamente 407.298 pessoas e apresentando um IDH médio de 0,680. A 28ª região de saúde, chamada também de vale do rio pardo, faz parte da 13ª coordenadoria regional de saúde do RS, é composta por 13 municípios, atendendo aproximadamente 346.698 pessoas e possuindo um IDH médio de 0,680[12,13]. A população total atendida por estas duas regiões totaliza 753 996 pessoas, correspondendo a 6,6% da população do Rio Grande do Sul.

Os dados demográficos e clinícos dos pacientes participantes foram obtidos através de entrevista, realizada 24 horas antes do procedimento cirúrgico, sendo as seguintes váriáveis pesquisadas: sexo; idade; cor pele; cidade de residência, histórico familiar de câncer colorretal; presença de comorbidades, ocupação e tabagismo. Na análise de prontuário obteve-se os dados referentes ao tumor e ao tratamento, foram identificadas variáveis como localização do tumor, presença de metástase, localização da metástase, estadiamento da doença, patologia do tumor, finalidade do tratamento empregado e esquema terapêutico utilizado. Foram excluídos do estuda pacientes que apresentavam no resultado do exame histopapológico presença de tumor não adenocarcinoma. Para análise espacial da distribuição dos pacientes com CCR foi utilizado o software TabWin 4.13 (http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=060805&item=3), disponibilizado pelo Ministério da Saúde do país, sendo confeccionado mapas da 9ª e da 28ª região de saúde, indicando os municípios e a frequencia de CCR em cada municipio.

A análise das informações foi tabulada no Programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences,* IBM, Armonk, NY, USA) v. 20. O nível de significância foi avaliado utilizando o teste qui-quadrado, sendo considerado o intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$). Os resultados foram apresentados por meio de estatísticas descritivas, utilizando números absolutos, frequências e média.

RESULTADOS

Foram realizadas no período do estudo 40 cirurgias para retirada de CCR, 35 pacientes pré-cirúrgicos, atendidos pelo SUS aceitaram participar do estudo, sendo 60% do sexo masculino. O tempo médio de espera entre o cadastro no sistema de regulação de consultas e o primeiro atendimento no COI foi de 17,9 dias, sendo que seis pacientes realizaram primeiro a cirurgia, devido ao risco de obstrução intestinal. A cirurgia para retirada do tumor colorretal foi realizada em média após 54,5 dias, depois de realizada a primeira consulta e oinício do tratamento ocorreu em média 47,68 dias após a realização do procedimento cirúrgico de retirada da neoplasia colorretal.

A idade média dos participantes do estudo foi 58,6 (±13,45), com predomínio da faixa etária de 50 anos ou mais. A presença de histórico familiar para CCR encontrada foi de 22,9%, sendo que entre as mulheres essa frequência foi de 75% ($p=0,04$) e destas 5 (83,3 %) referiram a presença de CCR em parentes de primeiro grau (Tabela 1). A presença de comorbidades foi identificada em 65,7% dos pacientes, sendo mais comuns nos homens(57,2%). As comorbidades mais frequentemente relatadas foram hipertensão e depressão.

A Figura 1 ilustra a distribuição espacial dos casos de CCR no período e a frequêncianos locais que possuíram pacientes. A 9ª região de saúde, mesmo sendo composta por 19 municípios apresentou uma baixa frequência (8,7%) de pacientes pré-cirurgicos, quando comparada a 28ª região de saúde.

O sítio primário do tumor encontrado na maioria dos pacientes foi o colón (51,4%), 94,3% eram tumores moderadamente diferenciado e o estadiamento II da neoplasia colorretal (TNM) foi o mais frequente (45,7%). Do total de participantes do estudo, 15 (42,8%) apresentaram metástases, sendo o fígado o órgão mais efetado (58,7%). A finalidade de tratamento adjuvante representou 65,7% das prescrições, enquanto o esquema terapêutico mais indicado pelos oncologistas foi o Flox (18,8%). Do total de tratamentos prescritos, três não se obteve a informação e três possuíam indicação de follow up (Tabela 2).

DISCUSSÃO

O estudo procurou caracterizar os pacientes, atendidos pelo SUS, submetidos à cirurgia de retirada de tumor colorretal em um hospital do interior do estado do Rio Grande do Sul. Entre as características identificadas destaca-se a maioria dos pacientes eram homens, sem hábito tabágico (54,28%), com doença diagnosticada em estadiamento II. O tempo entre o diagnóstico e início do tratamento foi menor que o preconizado pelo Ministério da Saúde. A análise do histórico familiar indicou relação com o desenvolvimento de CCR.

A lei federal nº 12732[14], de novembro de 2012, determina que o tratamento para neoplasia maligna pelo sistema único de saúde deve ser iniciado em no máximo 60 dias após o diagnóstico em laudo patológico. Neste estudo, o tempo de espera para o inicio do tratamento farmacológico foi de 47,7 dias, sendo inferior ao

estipulado na legislação e de acordocom o que foi descrito em outros estudos da literatura[15,16]. Para seguir uma determinação do governo federal, o hospital Ana Nery implantou em 2014 o sistema de regulação de consultas (SISREG) que permite ao município de residência do paciente fazer o agendamento da primeira consulta no centro oncológico, diminuindo o tempo de espera no agendamento, possibilitando o cumprimento das legislações vigentes [15,17].

A predominância do sexo masculino entre os pacientes com CCR identificada em nosso estudo, também foi observada por outros autores[18,19], o que pode ser explicada devido a homens possuirem uma dieta menos saudavel, com menor ingestão de fibras e frutas, do que as mulheres[20] Souza et al. (2016)[16], descreveram que a maioria dos participantes do estudo que analisou fatores interferentes no diagnóstico de CCR e que foi realizado em um Hospital Universitário de Curitiba, Paraná entre 2012 e 2013, era do sexo feminino (57,5%), assim como descrito em outras pesquisas[21,22].

A idade é considerada um fator de risco para o desenvolvimento desta neoplasia, geralmente mais incidente em pessoas com idade superior a 50 anos. A idade média encontrada neste estudo foi de 58,68 anos corroborando o que está descritos na literatura[23,24-25].

O tabagismo está relacionado como fator de risco para vários tipos de neoplasias, inclusive para o CCR. Presume-se que a nicotina esteja envolvida em mecanismos de inibição de genes supressores de tumores e também na instabilidade cromossômica[26]. Em um estudo norueguês[27] foi detectado risco aumentado de mortalidade por neoplasia de colon para as mulheres fumantes, fato este encontrado por outros autores[28,29]. Hang et al. (2015)[30] observaram que o

tabagismo não foi relacionado ao risco de CCR, assim como o que foi encontrado nesta pesquisa, onde a maior parte dos pacientes não era tabagista (p = 0,68).

Indivíduos que possuem histórico familiar de CCR são considerados pacientes de risco moderado para o desenvolvimento desta doença, quando é analisado somente este parâmetro[31]. Kim et al (2016)[32] realizaram um estudo na Coreia, no qual foi avaliado os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer colorretal, eles identificaram que a presença de histórico familiar de CCR está relacionado ao aparecimento da doença, assim como neste estudo. Parra-Pérez et al. (2015)[33] encontraram que a presença de histórico familiar para CCR não foi relacionada com o surgimento da neoplasia colorretal.

Han et al. (2016)[34] analisaram 902 pacientes chineses, destes 38,6% apresentaram como sitio primário do tumor o reto, o que foi descrito por outros estudos[35,36,37]. Em um estudo conduzido por Foletto et al. (2016)[15] com 50 pacientes para determinação do itinerário terapêutico, o colón foi a localização mais frequente de tumor primário (64%). Este dado também foi encontrado por outros autores[16,38] e encontrado na presente pesquisa. Em um estudo de coorte[39] realizado no Reino Unido, mostrou que a maior parte dos tumores estava localizada no cólon.

O estágio III foi o mais frequente (66,3%) encontrado em um estudo realizado por Mrabti et al. (2016)[40] utilizando dados dos centros de tratamento de câncer colorretal do Marrocos entre os anos de 2009 e 2011. Segundo alguns autores, é no estadiamento III/IV (TNM) que os CCR são frequentemente diagnosticados[15,41,42]. Esta informação não foi encontrada neste estudo pois a maior parte dos pacientes foram diagnosticados no estadiamento II da doença, fato este que pode ser explicado devido a contratação de mais um médico no atendimento aos pacientes

com CCR no COI e mudanças na forma de agendamento de consultas. O diagnóstico precoce tambem é verificado emoutros da literatura[24,43]. ,

O tratamento farmacológico de carater adjuvante foi prescrito em 65,71% dos casos. A utilização da terapia adjuvante para pacientes no estadiamento II é controverso. A cirugia de retirada do tumor é considerada curativa, mas em torno de 20% dos pacientes acaba apresentando recidiva da doença[44]. Em um estudo realizado por Eisenhardt et al. (2012)[42] foi encontrado um total de 89,5% das prescrições dos esquemas terapêuticos com o objetivo adjuvante, independente do estadiamento da doença do paciente. Após a publicação da portaria nº 420/10[45], que aumentou o repasse financeiro para utilização de quimioterapia adjuvante em adenocarcinomas de cólon em estádio II e III, e notou-se um aumento de prescrições do esquema terapêutico Flox[46], assim como encontrado neste estudo.

CONCLUSÃO

Ao caracterizarmos os pacientes atendidos pelo sistema público de saúde de um hospital no interior do Rio Grande do Sul, identificamos que o diagnóstico de CCR foi realizado principalmente em estadiamento II da doença. O diagnóstico precoce ilustra que com o passar dos anos as políticas públicas desenvolvidas para a oncologia melhoraram o acesso da população a esta area específica da saúde. Ainda há um longo caminho a ser percorrido, mas percebemos uma diminuição no tempo de espera pelo atendimento, o que por sua vez, possibilita um diagnóstico e tratamento mais cedo, melhorando as chances de cura da doença.

REFERÊNCIAS

1. Sierra MS,Forman D. Burden of colorectal cancer in Central and South America. Cancer Epidemiology 2016; 44: S74-S81.

2. De Rosa M, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Niglio A, Izzo P, et al. The biological complexity of colorectal cancer: insights into biomarkers for early detection and personalized care. Therapeutic Advances in Gastroenterology 2016; 9(6): 861-886.

3. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativa 2016 – Incidência de Câncer no Brasil. http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/

4. Leshno A, Moshkowitz M, David M, Galazan L, Neugut AI, Arber N, et al. Prevalence of colorectal neoplasms in young, average risk individuals: A turning tide between East and West. World Journal of Gastroenterology 2016; 22(32): 7365.

5. Veettil SK, Lim KG, Chaiyakunapruk N, Ching SM, Hassan MR A. Colorectal cancer in Malaysia: Its burden and implications for a multiethnic country. Asian Journal of Surgery 2016.

6. Santos Jr JC. Câncer ano-reto-cólico: aspectos atuais IV-câncer de colón-fatores clínicos, epidemiológicos e preventivos. Revista Brasileira de Coloproctologia 2007; 28: 378-85.

7. Molina-Barceló A, Peiró-Pérez R, Vanaclocha M, Vallés G, Guaita L, Salas D. Informed participation in the Valencian Community Colorectal Cancer Screening Programme from a gender perspective. Gaceta Sanitaria 2016.

8. Parada R, de Assis M, da Silva RCF, Abreu MF, da Silva MAF, Dias MB K, et al. A política nacional de atenção oncológica e o papel da atenção básica na prevenção e controle do câncer. Revista de APS 2008;11(2):199.

9. Brambilla E, Ponte MD, Ruschel LG, Bosi HR, Braga GLD, Silva PGD. Staging of colorectal cancer in the private service versus Brazilian National Public Health System: what has changed after five years?. Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro) 2012; 32(2):144-147.

10. Rio Grande do Sul. Secretaria Estadual da Saúde. Resolução CIB/RS, n. 108/13, Portaria SAS/MS n 741/05. Dispões sobre a necessidade de encaminhamentos e deliberações junto às CIR's: 1ª, 10ª, 13ª, 18ª e 19ª coordenadorias regionais de saúde e aprova a proposta de referências na Alta Complexidade em Oncologia. Disponível em: http://www.saude.rs.gov.br/upload/1366219550_cibr108_13.pdf. Acesso em 04 de janeiro de 2017.

11.Hospital Ana Nery (2014). Disponível em: http://www.hospitalananery.com.br/. Acesso em: 1º novembro 2016.

12. Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em: http://www.saude.rs.gov.br/ . Acesso em: 28 Novembro de 2016.

13. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Disponível em: http://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=43&search=rio-grande-do-sul. Acesso em: 28 Novembro de 2016.

14. Brasil, Ministério da Saúde, Lei federal nº12732, 22 de Novembro de 2012. Dispõe sobre o primeiro tratamento de paciente com neoplasia maligna comprovada e estabelece prazo para seu início. Brasilía: Diário Oficial 23 de Novembro de 2012.

15. Foletto EF, Jackisch SE, Dotto ML, Severo C, Pappen E, de Moura Valim AR, et al. Therapeutic itinerary of colorectal cancer patients treated in the state of Rio Grande do Sul. Journal of Coloproctology 2016; 36(2): 91-96.

16. Souza RHS, Maluf EMCP, Sartor MC,Carvalho DSD. Colorectal cancer: factors related to late diagnosis in users of the public health system treated at an Universitary Hospital in Curitiba, Paraná State, Brazil. Arquivos de Gastroenterologia 2016; 53(2): 68-75.

17. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 1559, de 1º de agosto de 2008. Institui a Política Nacional de Regulação do Sistema Único de Saúde - SUS.Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil; 2008.

18. Mullany LE, Herrick JS, Wolff RK, Stevens JR, Slattery ML Association of cigarette smoking and microRNA expression in rectal cancer: Insight into tumor phenotype. Cancer Epidemiology 2016;45: 98-107.

19. Fernandes GMDM, Leme CVD, Ruiz-Cintra MT, Pavarino ÉC, Netinho J G, Goloni-Bertoll EM. Clinical and epidemiological evaluation of patients with sporadic colorectal cancer. Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro) 2014; 34(4):216-223.

20. Cai SR, Zhu HH, Li QR, Ma XY, Yao KY, Zhang SZ, et al. Gender disparities in dietary status and its risk factors in underserved populations. public health 2012;126(4): 324-331.

21. Shalaby M, Di Lorenzo N, Franceschilli L, Perrone F, Angelucci GP, Quareisma S, et al. Outcome of colorectal surgery in elderly populations. Annals of Coloproctology 2016; 32(4): 139-143.

22. Volpato MG, Koch KDS. Bad prognostic factors on the operatory peace of patients submitted to surgical treatment of colorectal cancer. Revista Brasileira de Coloproctologia 2008; 28(4): 414-424.

23. Valadão M, Leal RA, Barbosa LC, Carneiro M, Muharre RJ. Perfil dos pacientes portadores de câncer colorretal operados em um hospital geral: necessitamos de um programa de rastreamento acessível e efetivo. Rev Bras Coloproctol 2010; 30: 160-6.

24. Cisz KC, Moreira ADL, Fialho LDO, Aguero HJV, Paiva DDD, Oliveira A VD, et al. Lymph nodes identification after colorectal cancer resection. ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo) 2011; 24(2):103-106.

25. Salimzadeh H, Bishehsari F, Amani M, Ansari R, Sotoudeh M, Delavari, A, et al. Advanced colonic neoplasia in the first degree relatives of colon cancer patients: A colonoscopy-based study. International Journal of Cancer 2016; 139(10): 2243-2251.

26. Shrubsole MJ, Wu H, Ness RM, Shyr Y, Smalley WE, Zheng W Alcohol drinking, cigarette smoking, and risk of colorectal adenomatous and hyperplastic polyps. American journal of epidemiology 2008;167(9): 1050-1058.

27. Parajuli R, Bjerkaas E, Tverdal A, Le Marchand L, Weiderpass E, Gram, IT. Cigarette smoking and colorectal cancer mortality among 602,242 Norwegian males and females. Munin open research archive 2014.

28. Lee SE, Jo HB, Kwack WG, Jeong YJ, Yoon YJ, Kang HW. Characteristics of and risk factors for colorectal neoplasms in young adults in a screening population. World journal of gastroenterology 2016; 22(10): 2981.

29. Stegeman I, de Wijkerslooth TR, Stoop EM, van Leerdam ME, Dekker E, van Ballegooijen M, et al. Colorectal cancer risk factors in the detection of advanced adenoma and colorectal cancer. Cancer epidemiology 2013; 37(3): 278-283.

30. Hang J, Cai B, Xue P, Wang L, Hu H, Zhou Y, et al. The joint effects of lifestyle factors and comorbidities on the risk of colorectal cancer: A large Chinese retrospective case-control study. PloS one 2015;10(12): e0143696.

31. Gimeno-García AZ, Hernández-Álvarez-de-Buylla N, Nicolás-Pérez D, Carrillo M, Hernández G, Quintero E. Colorectal cancer screening in the familial risk population: Is colonoscopy still the strategy of choice?. Gastroenterología y Hepatología 2016; 39(5): 352-360.

32. Kim JY, Jung YS, Park JH, Kim HJ, Cho YK, Sohn CI, et al. Different risk factors for advanced colorectal neoplasm in young adults. World journal of gastroenterology 2016; 22(13): 3611.

33. Parra-Pérez V, Watanabe-Yamamoto J, Nago-Nago A, Astete-Benavides M, Rodríguez-Ulloa C, Valladares-Álvarez G, et al. Factors related to advanced colorectal neoplasm at the Policlínico Peruano Japonés. Revista de Gastroenterología de México (English Edition) 2015; 80(4): 239-247.

34. Han Y, Lu S, Yu F, Liu X, Sun H, Wang J, et al. A comparative analysis and guidance for individualized chemotherapy of stage II and III colorectal cancer patients based on pathological markers. Scientific Reports 2016:6.

35. Neto T, da Rocha J, Teixeira FR, Prudente ACL, Silvino CJ, Arciere JS, et al. Demographic study of colon and rectum cancer in the state of Sergipe. Revista Brasileira de Coloproctologia 2008;28(2): 215-222.

36. Rossoni MD, Telles JEQ, de Oliveira Rossoni AM, Matias JEF. Risk factors for recurrence of stage I/II (TNM) colorectal adenocarcinoma in patients undergoing surgery with curative intent. Journal of Coloproctology 2013; 33(1): 28-32.

37. Araújo RF, Lira GA, Guedes HG, Cardoso MA, Cavalcante FJ, Araújo ALM, et al. Lifestyle and family history influence cancer prognosis in Brazilian individuals. Pathology-Research and Practice 2013; 209(12): 753-757.

38. Chambers SK, Baade P, Meng X, Youl P, Aitken J, Dunn J. Survivor identity after colorectal cancer: antecedents, prevalence and outcomes. Psycho-Oncology 2012; 21(9): 962-969.

39. Burón Pust A, Alison R, Blanks R, Pirie K, Gaitskell K, Barnes I, et al. Heterogeneity of colorectal cancer risk by tumour characteristics: Large prospective study of UK women. International Journal of Cancer 2016.

40. Mrabti H, Amziren M, ElGhissassi I, Bensouda Y, Berrada N, Abahssain H, et al. Quality of life of early stage colorectal cancer patients in Morocco. BMC gastroenterology (2016); 16(1): 131.

41. Dianatinasab M, Ghaem H, Rezaianzadeh A, Vahid, Hosseini HK. Colorectal Cancer Mortality in Shiraz, Iran. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2016; 17(8): 4101-4105.

42. Eisenhardt M, Huwe F, Dotto ML, Severo C, Fontella JJ, Valim ARDM, et al. Clinical and epidemiological evaluation of patients with colorectal cancer from Rio Grande do Sul. Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro) 2012; 32(2): 136-143.

43. Hanyuda A, Kim SA, Martinez-Fernandez A, Qian ZR, Yamauchi M, Nishihara R, et al. Survival benefit of exercise differs by tumor IRS1 expression status in colorectal cancer. Annals of surgical oncology 2016; 23(3): 908-917.

44. Chun P, Wainberg ZA. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer: the role of molecular markers in choosing therapy. Gastrointestinal cancer research: GCR 2009; 3(5): 191.

45. Portaria nº 420, 25 de Agosto de 2010. Dispõe sobre a alteração de valores na tabela de procedimentos e outras providências. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil; 2010.

46. Riveros BS, Wiens A, Correr CJ. Análise de Custo-Utilidade do Tratamento Adjuvante de Câncer de Cólon Estádio III (Dukes C). Revista Brasileira de Cancerologia 2012; 58(4): 629-637.

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos pacientes pré cirurgicos de CCR atendidos pelo SUS no Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul – RS.

	Feminino N(%)	Masculino N(%)	Total N(%)	*P*
Idade média (DP)	54,71 ±13,32	61,33 ±13,19	58,69 ±13,46	0,15[1]
Faixa etária				
Abaixo 50 anos	4 (28,6)	4 (19,1)	8 (22,8)	0,39[2]
Acima 50 anos	10 (71,4)	17 (80,9)	27 (77,2)	
Histórico Familiar CCR	6 (42,9)	2 (9,5)	8 (22,9)	0,04[2]
Tipo parentesco				
Primeiro grau	5 (83,3)	2 (100,0)	7 (87,5)	0,75[2]
Segundo Grau	1 (16,7)	0 (0)	1 (12,5)	
Cor Pele				
Branca	13 (92,9)	15 (71,4)	28 (80,0)	0,20[2]
Não- Branca	1(7,1)	6 (28,6)	7 (20,0)	
Presença Comorbidade	11 (78,6)	12 (57,1)	23 (65,7)	0,28[2]
Tipo de Comorbidade				
Hipertensão	2 (18,2)	10 (83,3)	12 (52,2)	
Depressão	3 (27,2)	0 (0,0)	3 (13,0)	0,006
Hipertensão+Depressão	4 (36,4)	0 (0,0)	4 (17,4)	
Outros*	2 (18,2)	2 (16,7)	4 (17,4)	
Hábito tabágico	2 (14,3)	4 (19,1)	6 (17,1)	0,68[2]
Ocupação				
Aposentado	6 (42,9	10 (47,6)	16 (45,8)	
Agricultor	2 (14,2)	4 (19,1)	6 (17,1)	0,129[2]
Outros**	6 (42,9)	7 (33,3)	13 (37,1)	

Legenda: Testes estatísticos utilizados: [1] Teste qui-quadrado com intervalo de confiança de 95% (p<0,05).; [2] Teste t student.*Asma, Diabete + Hipertensão e Artrite + Hipertensão. *Auxiliar de serviços gerais, dona de casa, representante comercial, cabelereira, safrista, pedreiro, diarista e motorista.

Tabela 2: Características clínicas dos tumores dos pacientes pré-cirúrgicos com CCR atendidos pelo Hospital Ana Nery de Santa Cruz do Sul – RS

	Feminino N(%)	Masculino N(%)	Total N(%)	*P*
Sítio Tumor primário				
Cólon	7 (50,0)	11 (52,4)	18 (51,4)	
Reto	7 (50,0)	10 (47,6)	17 (48,6)	1[1]
Patologia Tumor				
Moderadamente diferenciado	13 (92,9)	20 (95,2)	33 (94,2)	0,33[1]
Estadiamento Doença				
II	7 (50,0)	9 (42,9)	16 (45,7)	
III	4 (28,6)	7 (33,3)	11 (31,4)	0,91[1]
IV	3 (21,4)	5 (23,8)	8 (22,9)	
Presença Metástases	6(42,9)	9 (42,9)	15 (42,9)	1[1]
Localização Metastases*				
Fígado	2(40,0)	5 (71,4)	7 (58,3)	0,40[1]
Peritônio	3 (60,0)	2 (28,6)	5 (41,7)	
Finalidade Tratamento utilizado após cirurgia				
Curativa	1 (7,1)	2 (9,5)	3 (8,6)	
Adjuvante	10 (71,4)	13 (61,9)	23 (65,7)	0,84[1]
Paliativa	3 (21,5)	6 (28,6)	9 (25,7)	
Tratamento farmacológico aplicado				
Flox	1 (7,7)	5 (26,3)	6 (18,8)	
FOLFOX	3 (23,1)	2 (10,5)	5 (15,6)	0,19[1]
Outros**	9 (69,2)	12 (63,2)	21 (65,6)	

Legenda: Teste estatistico utilizado: [1] Teste qui quadrado *A diferença de valor se deve aos tecidos que apresentaram somente um caso, sendo eles, vagina, pulmão e tecido adiposo.** Outros tratamentos farmacológicos utilizados foram Xeloda; Nordic Flox ; LV + 5FU; Radioterapia; Radioterapia + Xeloda; Xelox; Radioterapia + Flox; Radioterapia + LV + 5FU; Follow up.

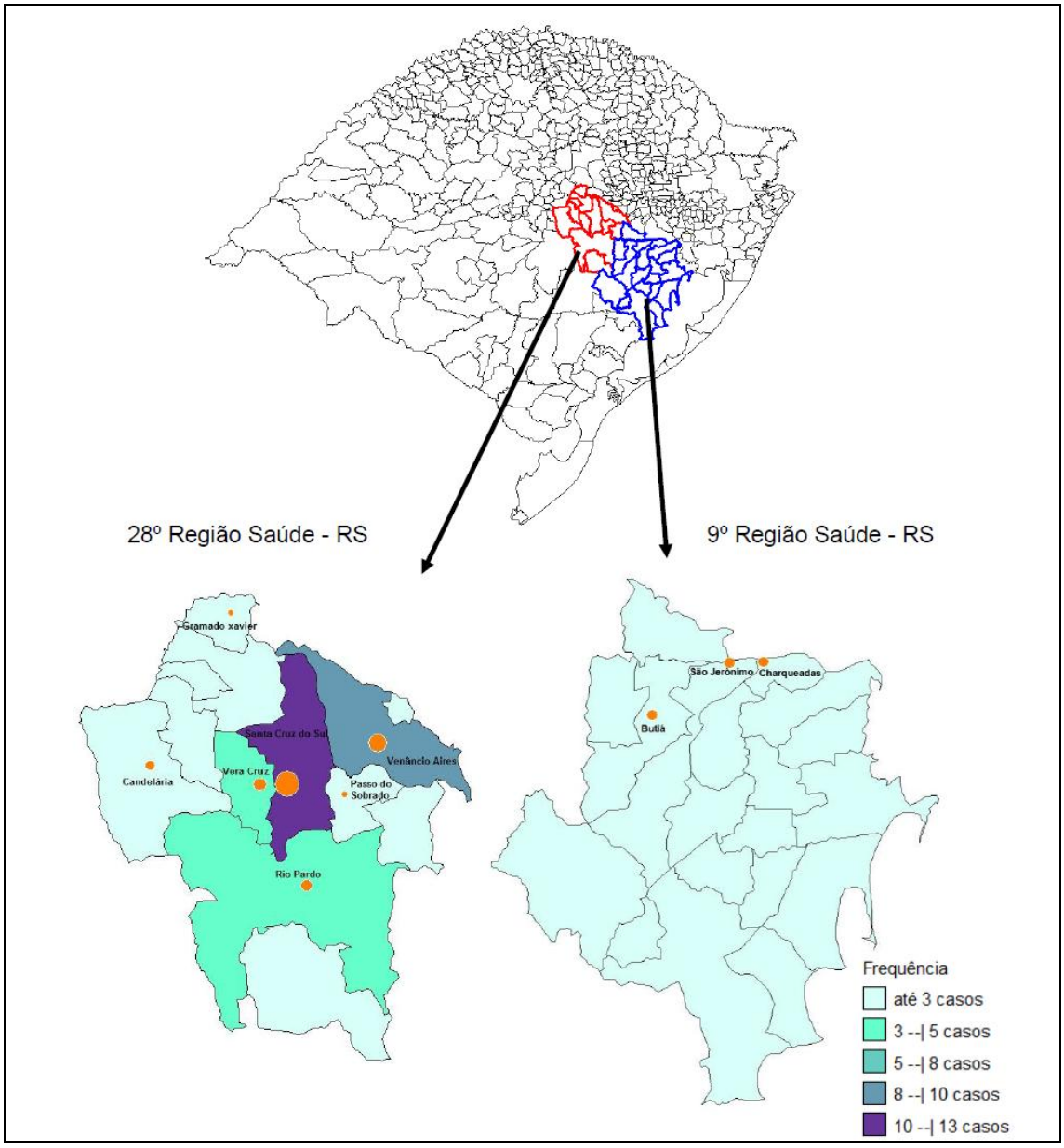


Figura 1: Frequência de casos de CCR nos municípios da 28ª e 9ª região de saúde – RS no periodo de realização do estudo.

ARTIGO II

SHORT COMMUNICATION: BAIXA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES EM *KRAS* em uma população DE PACIENTES COM CCR do interior do Rio Grande do Sul

Anais da Academia Brasileira de Ciências

SHORT COMMUNICATION

BAIXA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES EM *KRAS* em uma população DE PACIENTES COM CCR do interior do Rio Grande do Sul

Emelin Pappen[1], Lia Gonçalves Possuelo[1], Martina Fernanda Gewher[4], Eliara Folleto[4], Marcelo Luis Dotto[2], Inácio Swarosky[2], Charles Sudback[2], Mário Antônio Ferrari[2], Rudimar Issler Meurer[3], Luciana de Souza Nunes[4], Jane Dagmar Pollo Renner[1]

1. Programa de Pós graduação em Promoção da saúde, Universidade de Santa Cruz do Sul
2. Hospital Ana Nery
3. Clínica Caridade de Santa Maria
4. Faculdade de Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é uma doença geneticamente complexa, aproximadamente 55% dos tumores apresentam alteração na via de sinalização celular Ras/Raf/Mek/Erk. O objetivo deste estudo foi estimar a frequência de mutações nos genes *KRAS e BRAF* dos pacientes submetidos à retirada de tumores colorretais e coleta de tecido tumoral por colonoscopia nas regiões central e do vale do Rio Pardo do estado do Rio Grande do Sul. Foram analisadas amostras de 40 pacientes com neoplasia colorretal sendo encontrada uma frequência de mutação de 2,4% para o gene KRAS. A baixa frequência de mutação pode ser devido a miscigenação da população e a falta de heterogeneidade tumoral da amostra.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é uma doença heterogênea e geneticamente complexa, em que as mutações ocorrem nos genes que codificam as proteinas que controlam a diferenciação, proliferação e morte celular, proporcionando a estas células uma proliferação descontrolada (Punt, Koopamn, Vermeulen 2016; Fang, Richardson 2005).

Em torno de 55% dos tumores colorretais observam-se alterações na via de sinalização celular Ras/Raf/Mek/Erk, o que pode levar ao desenvolvimento desta neoplasia (Peeters et al. 2015). A ocorrência de alterações genéticas na família das proteínas Ras e Raf leva a ausência de resposta a terapia anti-EGFR, que utiliza anticorpos monoclonais para tratamento do câncer colorretal (CCR) (Rosty et al. 2013). Cerca de 40% dos casos de CCR apresentam mutações no gene *KRAS*, enquanto que aproximadamente 2% dos tumores apresentam alterações no gene *NRAS*, os dois são responsáveis por codificar proteínas da família Ras (Douillard et al. 2013; Haigis et al. 2008). O gene *BRAF* codifica para uma proteína da família Raf, encontra-se alterado em aproximadamente 10% das neoplasias colorretais (Goldstein, Shaib, Flowers 2015; Mccubrey et al. 2007).

No Brasil a taxa de mutação encontrada em tumores colorretal para o gene *KRAS* é em torno de 34% (Ferreira et al. 2014) e para *BRAF* é de aproximadamente 8,7% (Yamane et al. 2014). Portanto o objetivo desta pesquisa foi estimar a frequência de mutações nos genes *KRAS e BRAF* dos pacientes submetidos à retirada de tumores colorretais e coleta de tecido tumoral por colonoscopia nas regiões central e do vale do Rio Pardo do estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal observacional com duas populações de pacientes, atendidos durante o período de novembro de 2015 a outubro de 2016. A primeira população foi de pacientes submetidos à cirurgia de retirada de tumor colorretal, atendidos pelo sistema único de saúde (SUS) no hospital Ana Nery, de Santa Cruz do Sul – RS, e a segunda, com pacientes que realizaram o exame de colonoscopia na clínica de endoscopia Caridade de Santa Maria - RS coleta de tecido tumoral.

Os dados demográficos e clinícos dos pacientes como idade, faixa etária, sexo, histórico familiar para CCR, comorbidade e tabagismo foram obtidos através de entrevista. Para obtenção dos dados relacionados ao tumor como sitio primário, patologia do tumor, presença de metastase, órgão com metástase, estadiamento da doença, tratamento utilizado e finalidade da terapia utilizada foi realizada uma análise de prontuários médicos. Após a obtenção dos tecidos “in natura”, os mesmos foram submetidos a extração de DNA pelo protocolo descrito por Tost et al (2003) com modificações. A qualidade e a concentração de DNA das amostras foram examinadas utilizando Nanodrop (Thermo Scientific Nano Drop 2000c), conforme instruções do fabricante. A concentração final de DNA foi ajustada para 100 ng/µL. A reação em cadeia da polimerase (PCR) (Irahara et al. 2010) foi realizada conforme descrito na Tabela 1. A purificação dos produtos de PCR foi realizada com PEG8000/2,5M NaCl. O sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer com capilares de 50cm e polímero POP 7 (Applied Biosystems). Os produtos da PCR foram marcados utilizando reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Após marcadas, as amostras foram purificadas com protocolo de precipitação utilizando EDTA e etanol, sendo então eletroinjetadas no sequenciador automático. As sequências obtidas foram analisadas utilizando programa Chromas^{TM} versão 2.3. O alinhamento das sequências foi realizado no programa DNASTAR - Lasergene 7, e a análise comparativa, realizada no BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.).

Tabela1: Primers e temperaturas de amplificação utilizados na PCR

Gene	Sequência do primer 5`-3`	Ciclo de Amplificação	Alvo
KRAS	*F*5` GTATTAACCTTATGTGTGACA 3` *R* 5` GTCCTGCACCAGTAATATGC 3`	94°C 5’ , 94°C 1’ 53°C 1’, 72°C 1’, 72°C 10’, 40 ciclos	Códons 12 e 13
KRAS	*F* 5`TCTGAAGATGTACCTATGGTCCTAGT3 *R* 5` AAGAAGCAATGCCCTCTCAA 3´	94°C 5’ , 94°C 1’ 58°C 1’, 72°C 1’, 72°C 10’. 40 ciclos	Códon 146
KRAS	F 5´TGCACTGTAATAATCCAGACTGTG 3` R 5`TTTAAACCCACCTATAATGGTGAA 3`	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’.	95ºC 10’,95ºC 30’’,56ºC 30’’,72ºC 45’’, 72ºC 10’, 38	Éxon 15

ciclos

A análise dos dados foi realizada utilizando o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences,* IBM, Armonk, NY, USA) v. 20. O nível de significância foi avaliado utilizando o teste qui-quadrado, sendo considerado o intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$). Os resultados foram apresentados por meio de estatísticas descritivas, utilizando números absolutos, frequência e média.

RESULTADOS

Foram incluídos na análise 40 pacientes com diagnóstico confirmado de CCR, 62,5% da amostra era do sexo masculino, a média de idade entre todos os participantes foi de 60,35 (±13,63) anos, sendo predominante a faixa etária acima de 50 anos. A presença de histórico familiar para CCR encontrada foi de 22,5%, sendo mais frequente no sexo feminino (38,9%). Se autodenominaram brancos 84,4% dos pacientes, sendo predominantemente de regiões da etnia germanica e 65% apresentaram algum tipo de comorbidade, sendo a mais comum a hipertensão (46,2%). O sítio primário do tumor encontrado na maioria dos pacientes foi o colón (52,5%), 95% dos tumores classificava-se como moderadamente diferenciado e o estadiamento II da neoplasia colorretal (TNM) foi o mais frequente (57,5%).

Foi realizado o sequenciamento de 77,5% das amostras para o códon 12/13 do gene *KRAS*, 82,5% das amostras para o códon 61 do gene *KRAS* e 97,5% das amostras para o códon 146. Para o gene *BRAF* foram sequenciadas 27 (67,5%) das amostras. Foi encontrada uma paciente feminina com CCR, com mutação no gene *KRAS* códon 12/13 (2,4%), idade acima de 50 anos, sem histórico familiar para CCR. Foi diagnosticada no estadiamento III da doença e, após o procedimento cirúrgico para retirada do tumor, foi submetida ao tratamento de carater adjuvante anti-hemorrágico com terapia farmacológica utilizando o esquema Flox.

DISCUSSÃO

A frequência de polimorfismos nos genes *KRAS e BRAF*, em portadores de câncer colorretal atendidos no Hospital Ana Nery e também nos pacientes que foram submetidos a exame de colonoscopia foi de 2,4%. A presença de histórico familiar para CCR foi detectada em 22,5% dos pacientes sendo que a comorbidade mais

relatada foi à hipertensão e o estadiamento II da doença foi detectado em 57,5% da amostra. O histórico familiar é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de CCR, neste estudo 38,9% das pacientes do sexo feminino afirmaram possuir algum membro da familia que já desenvolveu a doença, corroborando o que consta na literatura (Pinsky et al. 2003). Plath et al. (2016) realizaram um estudo na Alemanha onde as mulheres relataram mais frequentemente possuir algum parente com CCR, eles explicaram este fato devido ao sexo feminino ser mais atento a saúde dos familiares.

A presença de comorbidade pode influenciar na escolha do tratamento, e também no desenvolvimento da neoplasia (Hsieh et al 2016). Lu et al. (2015) observou que a presença de sindrome metabólica, assim como aumento nos níveis de triglicerídeos, obesidade e de hipertensão, estão associados ao desenvolvimento de adenocarcinoma colorretal. Neste estudo foi observado que a comorbidade mais comum apresentada foi a hipertensão.

Sabe-se que quanto mais precocemente o CCR for diagnoticado, maiores são as chances de cura pelo paciente, 57,5% dos participantes foram diagnosticados em estadimento II da doença, o que tambem foi encontrado por Cisz et al. (2011) em seu estudo. Folleto et al. (2016) descreveram que 40% dos pacientes foram diagnosticados em um estágio mais avançado da neoplaia, assim como descrito por outros autores (Eisenhardt et al. 2012; Dianatinasab et al. 2016).

A utilização da terapia com anticorpos monoclonais que possui como alvo os receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), melhoraram a sobrevida de pacientes com câncer colorretal metastático. Pacientes que apresentam mutações no gene *KRAS* e que utilizam esta terapia farmacológica tendem a apresentar uma piora no quadro da doença, devido a isso mostra-se a importância de realização dos testes para detecção de mutações em Ras antes do início do tratamento (Douillard et al. 2013; Van Krieken et al. 2016), estas análises fazem parte das diretizes de tratamento da Sociedade Europeia de Oncologia Médica e da Sociedade Alemã de Tratamento Oncológico, entre outras (Van Krieken et al. 2016; Van Cutsem et al. 2014). A personalização da terapia empregada tem por objetivo minimizar a toxicidade dos fármacos empregados e melhorar a eficacia do tratamento (Heinemann et al. 2013).

Mâcedo et al. (2015) realizaram um estudo com 422 pacientes do A. C. Camargo Cancer Center, em São Paulo, eles detectaram a presença de mutação no gene *KRAS* em 33% das amostras, sendo que a maior parte estava localizada no códon 12. Na Tabela 2 está ilustrado a frequência de mutação do gene *KRAS* em populações de diferentes etnias, onde percebemos uma variação de frequência de 21% (Abdulkareem et al. 2011) a 44% (Díaz-Rubio et al.2012). No presente estudo, identificamos uma frequência de 2,4%. A baixa taxa de detecção de mutação no gene *KRAS* nesta população pode estar relacionada com a falta de heterogeneidade intratumoral, pois neste estudo foi recolhida somente uma amostra do tumor. O ideal seria ter múltiplas amostras recolhidas de uma mesma neoplasia, o que evitaria um erro de amostragem, assim como foi descrito por Jo et al. (2016). A heterogeneidade de células que apresentem mutação *KRAS* presente nos tumores pode diferir entre os individuos o que pode influenciar a capacidade de prever a resposta terapêutica utilizando anticorpos monoclonais anti-EGFR (Vincenzi et al. 2015). Outra hipótese, relacionada à baixa taxa de mutação em KRAS, refere-se à população do Rio Grande do Sul ser composta principalmente por indivíduos que são descendentes de imigrantes europeus, vindos principalmente de Portugal, Alemanha e Itália. Talvez a miscigenação entre estes diferentes grupos etnicos e afrodescendentes possa ter contribuido para a baixa taxa de mutação encontrada (Contu et al. 2009; Marrero et al. 2005; Alves-Silva et al. 2000). A combinação de fatores relativos a heterogeneidade tumoral e miscigenação podem ter resultado em uma dimuição na frequência destas alterações genéticas estudadas. Entretanto estudos com maior tamanho amostral devem ser realizados para confirmação destes dados.

Tabela 2: Frequência de mutação do gene *KRAS* em diferentes países.

% mutação *KRAS*/Total pacientes do estudo	País	Autor
38/150	Alemanha	Kartaus et al. 2016
31,9/8.234	Brasil	Ferreira et al. 2014
38,9/501	Porto Rico	Ruiz-Candelaria et al. 2014
28/776	Austrália	Rosty et al. 2013
31/1989	EUA	Phipps et al. 2013

44/394	Espanha	Díaz-Rubio et al. 2012
23,4/201	Portugal	Guedes et al. 2012
43/209	Itália	Bozzao et al. 2011
21/200	Nigéria	Abdulkareem et al. 2011
27/89	França	Lièvre et al. 2008
2,4/42	Brasil	Presente estudo

REFERÊNCIAS

ABDULKAREEM FB, ET AL. 2011. KRAS and BRAF mutations in Nigerian colorectal cancers. *West African journal of medicine 31*(3): 198-203.

ALVES-SILVA J, ET AL. 2000. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *The American Journal of Human Genetics 67*(2): 444-461.

ANDERSON BJ, ET AL. 2016. The impact of metabolic syndrome on outcome and response to neoadjuvant chemoradiation in locally advanced rectal cancer patients. International Journal of Surgery 33:8-12.

BOZZAO C, ET AL. 2011. Survey of KRAS, BRAF and PIK3CA mutational status in 209 consecutive Italian colorectal cancer patients. The International journal of biological markers 27(4): e366-74.

CISZ ET AL. 2011. Lymph nodes identification after colorectal cancer resection. ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo) 24(2):103-106.

CONTU SS, ET AL. 2009. Lack of correlation between p53 codon 72 polymorphism and anal cancer risk. *World J Gastroenterol 15*(36):4566-4570

DIANATINASAB M. ET AL. 2016. Colorectal Cancer Mortality in Shiraz, Iran. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 17(8): 4101-4105.

DÍAZ-RUBIO E, ET AL. 2012. Role of Kras status in patients with metastatic colorectal cancer receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a TTD group cooperative study. *PloS one 7*(10): e47345.

DOUILLARD J.Y. ET AL. 2013. Panitumumab–FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer*.* *New England Journal of Medicine* 369(11): 1023-1034.

EISENHARDT MF. ET AL. 2012. Clinical and epidemiological evaluation of patients with colorectal cancer from Rio Grande do Sul. Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro) 32(2):136-143.

FANG JY; RICHARDSON BC. 2005. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. The lancet oncology 6(5):322-327.

FERREIRA CG. ET AL. 2014. KRAS mutations: variable incidences in a Brazilian cohort of 8,234 metastatic colorectal cancer patients. BMC gastroenterology 14(1): 73.

FOLETTO EF. ET AL. 2016. Therapeutic itinerary of colorectal cancer patients treated in the state of Rio Grande do Sul. Journal of Coloproctology 36(2):91-96.

GOLDSTEIN DA; SHAIB WL; FLOWERS CR. 2015. Costs and Effectiveness of Genomic Testing in the Management of Colorectal Cancer. *Oncology* (Williston Park, NY) 29(3).

GUEDES JG. ET AL. 2013. High resolution melting analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA in KRAS exon 2 wild-type metastatic colorectal cancer. BMC cancer *13*(1):169.

HAIGIS KM. ET AL. 2008. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature Genetics* 40(5): 600-608.

HEINEMANN V, DOUILLARD JY, DUCREUX M, & PEETERS M .2013. Targeted therapy in metastatic colorectal cancer–an example of personalised medicine in action. Cancer treatment reviews *39*(6): 592-601.

HSIEH M., ET AL. 2016. The effect of comorbidity on the use of adjuvant chemotherapy and type of regimen for curatively resected stage III colon cancer patients. Cancer medicine.

IRAHARA N, ET AL. 2010. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology*, part B 19*(3): 157.

JO P, et al. 2016. Heterogeneity of KRAS Mutation Status in Rectal Cancer. *PloS one 11*(4): e0153278.

KARTHAUS M, ET AL. 2016. Impact of tumour RAS/BRAF status in a first-line study of panitumumab+ FOLFIRI in patients with metastatic colorectal cancer. British Journal of Cancer *115*(10): 1215-1222.

LIÈVRE A, ET AL. 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. Journal of Clinical Oncology *26*(3):374-379.

LU Y, ET AL. 2015. Metabolic predispositions and increased risk of colorectal adenocarcinoma by anatomical location: a large population-based cohort study in Norway. American journal of epidemiology kwv141.

MACÊDO, MP, ET AL. 2015. KRAS gene mutation in a series of unselected colorectal carcinoma patients with prognostic morphological correlations: a pyrosequencing method improved by nested PCR. *Experimental and molecular pathology 98*(3): 563-567.

MARRERO AR, ET AL. 2005. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. American Journal of Human Biology *17*(4):496-506.

MCCUBREY JA. 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* 1773(8):1263-1284, 2007.

PEETERS M, ET AL. 2015.. Analysis of KRAS/NRAS mutations in a phase III study of panitumumab with FOLFIRI compared with FOLFIRI alone as second-line treatment for metastatic colorectal cancer. Clinical Cancer Research 21(24)5469-5479.

PHIPPS AI, ET AL. A. 2013. KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. British journal of cancer *108*(8):1757-1764.

PINSKY PF. ET AL. 2003. Reported family history of cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial. American journal of epidemiology 157(9): 792-799, 2003.

PLATH J. ET AL. 2016. Frequency of a positive family history of colorectal cancer in general practice: a cross-sectional study. Family Practice 118.

PUNT CJA; KOOPMAN M; VERMEULEN L. 2016. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. Nature Reviews Clinical Oncology.

ROSTY C, ET AL. Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. Modern Pathology 26(6): 825-834.

ROSTY C, ET AL. 2013. Colorectal carcinomas with KRAS mutation are associated with distinctive morphological and molecular features. Modern Pathology *26*(6):825-834.

RUIZ-CANDELARIA, Y, MIRANDA-DIAZ, C, & HUNTER-MELLADO, RF. 2013. K-RAS mutation profile in Puerto Rican patients with colorectal cancer: trends from April 2009 to January 2011. The International journal of biological markers *28*(4):e393.

TOST J. ET AL. 2003. Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry. Nucleic acids research *31*(9):e50-e50.

VAN CUTSEM E, ET AL. 2014. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology, mdu260.

VAN KRIEKEN J, ET AL. 2016. RAS testing in metastatic colorectal cancer: advances in Europe. Virchows Archiv *468*(4): 383-396.

VINCENZI B, ET AL. 2015. Prognostic significance of K-Ras mutation rate in metastatic colorectal cancer patients. Oncotarget *6*(31): 31604.

YAMANE LS. ET Al. KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy. Oncology reports 32(4): 1419-1426, 2014.

CAPÍTULO IV

NOTA A IMPRENSA

NOTA A IMPRENSA

O programa de pós-graduação Mestrado em Promoção da Saúde da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) divulgou os resultados de uma pesquisa sobre frequência de polimorfismos nos genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS* em pacientes portadores de câncer colorretal. A pesquisa contou com a participação da equipe do Centro Oncológico Integrado (COI) do Hospital Ana Nery, de Santa Cruz do Sul e também da clinica endoscopida Caridade de Santa Maria, durante os meses de novembro de 2015 a junho de 2016.

Os pacientes do estudo, atendidos pelo Hospital Ana Nery, foram diagnosticados mais precocemente da neoplasia colorretal, representando um melhor prognóstico. O tempo de espera entre a primeira consulta no centro de oncologia integrado e a cirurgia para retirada do tumor é inferiror ao preconizado na legislação vigente no país. Isso ilustra que o paciente é atendido mais rapidamente, permanecendo um menor tempo na fila de espera dos sistema de saúde pública, o que representa um aumento da possibilidade de cura da doença.

Também foi estudado, no tecido tumoral dos pacientes, a frequência das mutações dos genes das proteínas receptoras de hormônios que regulam o crescimento das células tumorais por uma metodologia de sequenciamento de DNA. As alterações destas proteínas são de fundamental importância no início de certos tratamentos dos pacientes com câncer colorretal metastático. A frequência de mutações nos genes ou alterações das proteínas nos pacientes do estudo foram baixas. O sequenciamento de DNA para estudos de tumor colorretal é ainda uma técnica promissora, ainda não sendo amplamente empregada para avaliação molecular de pacientes do sistema público de saúde.

ANEXOS

ANEXO A – QUESTIONÁRIO PARA PESQUISA

PESQUISA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *BRAF*, *KRAS* E *NRAS* EM PORTADORES DE CÂNCER DO COLORRETAL

Material colhido de ( ) Cirurgia ( ) Colonoscopia

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 Se sim, qual parentesco:
8. Cor da pele: (1) Branco (2) Não branco

Presença comorbidade: ( ) Sim ( ) Não

Qual: Medicamento:

Fumante: ( ) Sim ( ) Não ( ) Ex Tempo:

9. Data da primeira consulta:
10. Patologia: (1) bem diferenciado (2) Moderadamente diferenciado (3) Pobremente diferenciado (4) Não diferenciado (5) Não disponível

Somente se material de cirurgia

11. Qual é o sitio do tumor primário: (1) cólon (2) reto (3) não disponível
12. Data da cirurgia para retirada do tumor:
13. Linfonodos regionais: (1) Sim (2) Não (3) Não disponível Quantos:
14. Metástase no diagnóstico: (1) Sim (2) Não Localização das metástases:
16. 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:

Dose de cada um:

18. Data inicio tratamento:
19. Tempo em meses (Número ciclos) para utilização deste esquema:
20. Finalidade do tratamento: (1) Curativa (2) Prévia (3) Controle (4) Adjuvante (5) Paliativa (6) Invasivo (7) Sem informação

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento livre e esclarecido

Nome do paciente:_____

Pesquisa: PESQUISA DE POLIMORFISMOS DOS GENES BRAF, KRAS E NRAS EM PORTADORES DE CÂNCER DO COLORRETAL.

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

Procedimentos: A amostra será recolhida do tecido retirado (quando cirurgia) ou do pólipo (quando colonoscopia).

Local de estudo: Este estudo será realizado na cidade de Santa Cruz do Sul com pacientes que são tratados no Hospital Ana Nery, referência em oncologia para o interior do estado e pacientes tratados pela Clínica de endoscopia Caridade de Santa Maria.

Riscos: A participação no estudo não envolve nenhum risco. Pois o material colhido será fracionado do tecido colhido na cirurgia ou colonoscopia, quando for o caso, que é rotineiramente enviado para biopsia. Fica garantida a disponibilidade de tratamento médico e indenização, conforme estabelece a legislação, caso existam danos a minha saúde, diretamente causados por esta pesquisa.

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

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

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo: Este termo de consentimento explica o estudo que está sendo proposto e convida os indivíduos a participar; no entanto, se houver alguma dúvida, estas poderão ser esclarecidas, pela equipe do estudo pelos telefones: 51- 97268981 (Pesquisadora Emelin), 51- 9826- 3124 (Profª Jane) ou 51- 8471- 3720 (Profª Lia). Demais dúvidas também poderão ser esclarecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santa Cruz do Sul (CEP), pelo telefone (51) 3717-7680.

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

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

_____

Assinatura do pai/responsável. Data:

_____

Assinatura do Coordenador do estudo. Data:

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

ANEXO C – Carta da Instituição Hospital Ana Nery.

Carta da Instituição Hospital Ana Nery.

Santa Cruz do Sul, 23 de outubro de 2015.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UNISC)

Prezados Senhores,

Declaramos para os devidos fins conhecer o protocolo de pesquisa intitulado: "PESQUISA DE POLIMORFISMOS DOS GENES *BRAF*, *KRAS* E *NRAS* EM PORTADORES DE CÂNCER DO COLORRETAL", desenvolvido pela acadêmica Emelin Pappen do Curso de Promoção da Saúde, da Universidade de Santa Cruz do Sul- UNISC, sob a orientação da professora Jane D. P. Renner, bem como os objetivos e a metodologia de pesquisa e autorizamos o desenvolvimento no Hospital Ana Nery.

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

Atenciosamente,

Assinatura e carimbo do responsável institucional

Luiz Alberto Hauth
Diretor Médico
Hospital Ana Nery

ANEXO D – Carta da Clínica de Endoscopia Caridade

Clínica de Endoscopia
Hospital de Caridade

Carta Da Clinica de Endoscopia Caridade

Santa Cruz do Sul, 23 de outubro de 2015.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UNISC)

Prezados Senhores,

Declaramos para os devidos fins conhecer o protocolo de pesquisa intitulado: "PESQUISA DE POLIMORFISMO DOS GENES *BRAF, KRAS* E *NRAS* EM PORTADORES DE CÂNCER COLORRETAL", desenvolvido pela mestranda EmelinPappen do Curso do Mestrado de Promoção da Saúde, da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC, sob a orientação da professora Jane D. P. Renner, bem como os objetivos e a metodologia de pesquisa e autorizamos o desenvolvimento na CLINICA DE ENDOSCOPIA CARIDADE (empresa CLINICA DE ENDOSCOPIA CARIDADE)

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

Atenciosamente,

Dr. Daniela Costa
CRM 19535

Assinatura e carimbo do responsável institucional

Central de Diagnósticos e Tratamentos - Hospital de Caridade Dr. Astrogildo de Azevedo
Av. Presidente Vargas, 2291 - 1º andar - (55) 3286-4032
videoendoscopia@hotmail.com

ANEXO E – Instrução para autores

Revista Brasileira de Epidemiologia

Escopo e política

A Revista Brasileira de Epidemiologia tem por finalidade publicar **Artigos Originais** e inéditos (máximo de 21.600 caracteres), inclusive os de **revisão** crítica sobre um tema específico, que contribuam para o conhecimento e desenvolvimento da Epidemiologia e ciências afins. Serão aceitas somente Revisões Sistemáticas e Metanálises; não serão aceitas Revisões Integrativas.

Publica, também, artigos para as seguintes seções:

- **Artigos originais com resultados de pesquisas**
- **Metodológicos:** Artigos que se dedicam a analisar as diferentes técnicas utilizadas em estudos epidemiológicos;
- **Debate:** destina-se a discutir diferentes visões sobre um mesmo tema, que poderá ser apresentado sob a forma de consenso/dissenso, artigo original seguido do comentário de outros autores, reprodução de mesas redondas e outras formas semelhantes;
- **Notas e Informações:** notas prévias de trabalhos de investigação, bem como breves relatos de novos aspectos da epidemiologia, além de notícias relativas a eventos da área, lançamentos de livros e outros (máximo de 6.450 caracteres);
- **Cartas ao Editor:** comentários de leitores sobre trabalhos publicados na Revista Brasileira de Epidemiologia (de 3.260 até 4.570 caracteres).

Os manuscritos apresentados devem destinar-se exclusivamente à Revista Brasileira de Epidemiologia, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. Após o envio do parecer, os autores devem assinar uma declaração, de acordo com modelo fornecido pela RBE (Declaração de Exclusividade, Declaração de Direitos Autorais e Declaração de Conflito de Interesses). Os

conceitos emitidos em qualquer das seções da Revista são de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

Os manuscritos publicados são de responsabilidade da Revista, sendo vedada a reprodução — mesmo que parcial — em outros periódicos, assim como a tradução para outro idioma sem a autorização do Conselho de Editores. Assim, todos os trabalhos, quando aprovados para publicação, deverão ser acompanhados de documento de transferência de direitos autorais contendo a assinatura dos autores, conforme modelo fornecido posteriormente pela Revista.

Cada manuscrito é apreciado por no mínimo dois relatores, indicados por um dos Editores Associados, a quem caberá elaborar um relatório final conclusivo a ser submetido ao Editor Científico. Na primeira etapa da submissão, a secretaria verifica se todos os critérios estabelecidos foram atendidos, e entra em contato com o autor. O manuscrito é encaminhado para a apreciação dos editores somente se atender a todas as normas estabelecidas pela RBE.

A Revista Brasileira de Epidemiologia não cobra taxas para a submissão de manuscritos, ou para a avaliação ou publicação de artigos.

Aprovação por Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Medida exigida desde o início da publicação da RBE e que reafirmamos, exigindo especial menção no texto dos artigos. Tal exigência pode ser dispensada em alguns tipos de estudo que empregam apenas dados agregados, sem identificação de sujeitos, disponíveis em bancos de dados e tão comuns na área da saúde. Nenhuma instância é melhor que um CEP para analisar a natureza das propostas de investigação, seguindo a orientação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/CNS/MS). O CEP que aprova a investigação deve ser registrado na CONEP.

Em particular, devem ser contempladas as seguintes Resoluções:

- 196/96, reformulada pela 446/11, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;

- 251/97, sobre Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos para a área temática de Pesquisa com Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos;
- 292/99 e sua Regulamentação de agosto de 2002, que dizem respeito à área temática especial de Pesquisas Coordenadas do Exterior ou com Participação Estrangeira e Pesquisas que Envolvam a Remessa de Material Biológico para o Exterior.

A Revista Brasileira de Epidemiologia apoia as políticas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) para registro de ensaios clínicos, reconhecendo a importância dessas iniciativas para o registro e divulgação internacional de informação sobre estudos clínicos, em acesso aberto. Sendo assim, a partir de 2007, serão aceitos para publicação somente os artigos de pesquisa clínicas que tenham recebido um número de identificação em um dos Registros de Ensaios Clínicos validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE, cujos endereços estão disponíveis no site do ICMJE. O número de identificação/aprovação deverá ser registrado na Folha de rosto.

As entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são:

- Australian New Zealand Clinical Trials Registry (ANZCTR)
- ClinicalTrials.gov
- International Standard Randomised Controlled Trial Number (ISRCTN)
- Nederlands Trial Register (NTR)
- UMIN Clinical Trials Registry (UMIN-CTR)

WHO International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP)

Apresentação do manuscrito

Os manuscritos são aceitos em português, espanhol ou inglês. Os artigos em português e espanhol devem ser acompanhados do resumo no idioma original do

artigo, além de *abstract* em inglês. Os artigos em inglês devem ser acompanhados do *abstract* no idioma original do artigo, além de resumo em português.

O manuscrito deve ser acompanhado de documento a parte com carta ao editor, justificando a possível publicação.

Os manuscritos devem ter o máximo de 21.600 caracteres e 5 ilustrações, compreendendo Introdução, Metodologia, Resultados, Discussão, Conclusão (Folha de rosto, Referências Bibliográficas e Ilustrações não estão incluídas nesta contagem). O arquivo deve apresentar a seguinte ordem: Folha de rosto, Introdução, Metodologia, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências Bibliográficas e Ilustrações. O manuscrito deve ser estruturado, apresentando as seções: Folha de rosto, Resumo, Abstract, Introdução, Metodologia, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências e Ilustrações. O arquivo final completo (folha de rosto, seções, referências e ilustrações) deve ser submetido somente no formato DOC (Microsoft Word), e as tabelas devem ser enviadas em formato editável (Microsoft Word ou Excel), devendo respeitar a seguinte formatação:

- Margens com configuração “Normal” em todo o texto (superior e inferior = 2,5 cm; esquerda e direita = 3 cm);
- Espaçamento duplo em todo o texto;
- Fonte Times New Roman, tamanho 12, em todo o texto;
- Não utilizar quebras de linha;
- Não utilizar hifenizações manuais forçadas.

Folha de Rosto

Os autores devem fornecer os títulos do manuscrito em português e inglês (máximo de 140 caracteres), título resumido (máximo de 60 caracteres), dados dos autores*, dados do autor de correspondência (nome completo, endereço e e-mail), agradecimentos, existência ou ausência de conflitos de interesses, financiamento e número de identificação/aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. Deve ser especificada, também, a colaboração individual de cada autor na elaboração do manuscrito.

*A indexação no SciELO exige a identificação precisa da afiliação dos autores, que é essencial para a obtenção de diferentes indicadores bibliométricos. A identificação da afiliação de cada autor deve restringir-se a nomes de entidades institucionais, Cidade, Estado e País (sem titulações dos autores).

O financiamento deve ser informado obrigatoriamente na Folha de rosto. Caso o estudo não tenha contato com recursos institucionais e/ou privados, os autores devem informar que o estudo não contou com financiamento.

Os Agradecimentos devem ter 460 caracteres no máximo.

Resumo e Abstract

Os resumos devem ter 1600 caracteres no máximo, e devem ser apresentados na a forma estruturada, contemplando as seções: Introdução, Metodologia, Resultados, Discussão, Conclusão. As mesmas regras aplicam-se ao *abstract*.

Os autores deverão apresentar no mínimo 3 e no máximo 6 palavras-chave, bem como as respectivas *Keywords*, que considerem como descritores do conteúdo de seus trabalhos, no idioma em que o artigo foi apresentado e em inglês. Esses descritores devem estar padronizados conforme os DeCS (http://decs.bvs.br/).

Ilustrações

As tabelas e figuras (gráficos e desenhos) deverão ser inseridas no final do manuscrito, não sendo permitido o envio em páginas separadas. Devem ser suficientemente claras para permitir sua reprodução de forma reduzida, quando necessário. Fornecer títulos em português e inglês, inseridos fora das ilustrações (não é necessário o corpo da tabela e gráficos em inglês). Deve haver quebra de página entre cada uma delas, respeitando o número máximo de 5 páginas dedicadas a Tabelas, Gráficos e Figuras. Apresentá-las após as Referências, no final do manuscrito (em arquivo único).

As ilustrações podem no máximo ter 15 cm de largura e devem ser apresentadas dentro da margem solicitada (configuração nomeada pelo Word como “Normal”). Não serão aceitas ilustrações com recuo fora da margem estabelecida.

Imagens

- Fornecer as fotos em alta resolução;
- Fornecer os gráficos em formato editável (preferencialmente PDF).

Tabelas, Equações, Quadros e Fluxogramas

- Sempre enviar em arquivo editável (Word ou Excel), nunca em imagem;
- Não formatar tabelas usando o TAB; utilizar a ferramenta de tabelas do programa;
- Nas tabelas, separar as colunas em outras células (da nova coluna); não usar espaços para as divisões.

Abreviaturas

Quando citadas pela primeira vez, devem acompanhar o termo por extenso. Não devem ser utilizadas abreviaturas no título e no resumo.

Referências

Devem ser numeradas de consecutiva, de acordo com a primeira menção no texto, utilizando algarismos arábicos. A listagem final deve seguir a ordem numérica do texto, ignorando a ordem alfabética de autores. Não devem ser abreviados títulos de livros, editoras ou outros. Os títulos de periódicos seguirão as abreviaturas do Index Medicus/Medline. Devem constar os nomes dos 6 primeiros autores, seguidos da expressão et al. quando ultrapassarem esse número. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências, sendo apresentados somente no corpo do texto ou em nota de rodapé. Quando um artigo estiver em vias de publicação, deverá ser indicado: título do periódico, ano e outros dados disponíveis, seguidos da expressão, entre parênteses “no prelo”. As

publicações não convencionais, de difícil acesso, podem ser citadas desde que os autores indiquem ao leitor onde localizá-las. A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS

Artigo de periódico

Szklo M. Estrogen replacement therapy and cognitive functioning in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Am J Epidemiol 1996; 144: 1048-57.

Livros e outras monografias

Lilienfeld DE, Stolley PD. Foundations of epidemiology. New York: Oxford University Press; 1994.

Capítulo de livro

Laurenti R. Medida das doenças. In: Forattini OP. Ecologia, epidemiologia e sociedade. São Paulo: Artes Médicas; 1992. p. 369-98.

Tese e Dissertação

Bertolozzi MR. Pacientes com tuberculose pulmonar no Município de Taboão da Serra: perfil e representações sobre a assistência prestada nas unidades básicas de saúde [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1991.

Trabalho de congresso ou similar (publicado)

Mendes Gonçalves RB. Contribuição à discussão sobre as relações entre teoria, objeto e método em epidemiologia. In: Anais do 1º Congresso Brasileiro de Epidemiologia; 1990 set 2-6; Campinas (Br). Rio de Janeiro: ABRASCO; 1990. p. 347-61.

Relatório da OMS

World Health Organization. Expert Committee on Drug Dependence. 29th Report. Geneva; 1995. (WHO - Technical Report Series, 856).

Documentos eletrônicos

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics. [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computorized Systems; 1993.

OBSERVAÇÃO

A Revista Brasileira de Epidemiologia adota as normas do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (estilo Vancouver), publicadas no New England Journal of Medicine, 1997; 336: 309, e na Revista Panamericana de Salud Publica, 1998; 3: 188-96 (http://www.icmje.org/urm_main.html).

Envio de manuscritos

Os manuscritos são submetidos online, através da plataforma SciELO (http://submission.scielo.br/index.php/rbepid/editor/submission/11821).

Não há taxa para submissão e avaliação de artigos.

ANEXO F – Instrução para autores

Anais da Academia Brasileira de Ciências

The journal Anais da Academia Brasileira de Ciências from 2012 onwards only considers online submissions. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, please visit the new, improved online submission website at https://mc04.manuscriptcentral.com/aabc-scielo. Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper are as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. Papers must be clearly and concisely written in English.

Aim and editorial policy

All submitted manuscripts should contain original research not previously published and not under consideration for publication elsewhere. The primary criterion for acceptance is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon, and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Articles accepted for publication become property of the journal.

Texts can be published as a review, a full paper (article) or as a short communication. Issues appear in March, June, September and December.

Types of Papers

Reviews

Reviews are published by invitation only. However, a proposal for a Review may be submitted in the form of a brief letter to the Editor at any time. The letter should state the topics and authors of the proposed review, and should state why the topic is of particular interest to the field.

Articles

Whenever possible the articles should be subdivided into the following parts: 1. Front Page; 2. Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); 3. Introduction; 4. Materials and Methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Acknowledgments, if applicable; 8. References. Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals.

Short communications

Short communications aim to report on research which has progressed to the stage when it is considered that results should be divulged rapidly to other workers in the field. A short communication should also have an Abstract and should not exceed 1,500 words. Tables and Figures may be included but the text length should be proportionally reduced. Manuscripts submitted as articles but found to fit these specifications will be published as short communications upon the author's agreement.

After the first screening, the articles will be evaluated by at least two reviewers, them being from educational and/or national and international research institutions, with proven scientific production. After due corrections and possible suggestions, the paper may be accepted or rejected, considering the reviews received.

We use the integrated Crossref Similarity Check program to detect plagiarism.

There are no APC and submission charges in the AABC.

Preparation of manuscripts

All parts of the manuscript should be double-spaced throughout. After acceptance, no changes will be made in the manuscript so that proofs require only corrections of

typographical errors. The authors should send their manuscript in electronic version only.

Length of manuscript

While papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability.

Tables and Illustrations

Only high-quality illustrations will be accepted. All illustrations will be considered figures including drawings, graphs, maps, photographs as well as tables with more than 12 columns or more than 24 lines (**maximum of 5 figures free of charge**). Their tentative placement in the text should be indicated.

Digitalized figures

Figures should be sent according to the following specifications: 1. Drawings and illustrations should be in format EPS (PostScript) or AI (Adobe Illustrator) and never be inserted in text; 2. Images or figures in grayscale should be in format TIF and never be inserted in text; 3. Each figure should be saved in a separate file; 4. Figures should be submitted at high quality (minimum resolution of 300dpi) at the size they are to appear in the journal, i.e., 8 cm (one column) or 16.5 cm (two columns) wide, with maximal height for each **figure and respective legend smaller than or equal to 22 cm.** The legends to the figures should be sent double-spaced on a separate page. Each linear dimension of the smallest characters and symbols should not be less than 2 mm after reduction; 5. Manuscripts on Mathematics, Physics or Chemistry may be typesetted in , or . The TEX, PDF and BIB files should be sent, and EPS files if there are any figures; 6. Manuscripts without mathematical formulae may be sent in RTF, DOC or DOCX.

Front page

The front page of the manuscript should present the following items: 1. Title of the article (the title should be short, specific, and informative); 2. Full name(s) of the author(s); 3. Full professional address of each author (institution, street, number, zip code, city/county, state if applicable, country, etc.); 4. Key words (four to six in alphabetical order); 5. Running title (up to 50 characters); 6. Academy Section (one out of our 10 areas) to which the content of the work belongs; 7. Name and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be provided.

Acknowledgments

These should be included at the end of the text. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies. Footnotes should be avoided; when necessary they must be numbered. Acknowledgments to grants and scholarships, and of indebtedness to colleagues as well as mention to the origin of an article (e.g. thesis) should be added to the Acknowledgments section.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at their first occurrence in the text, except for official, standard abbreviations. Units and their symbols should conform to those approved by the ABNT or by the Bureau International des Poids et Mesures (SI).

References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press may be included. Personal communications (Smith, personal communication) must be authorized in writing by those involved. References to thesis, meeting abstracts (not published in indexed journals) and manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Smith et al., unpublished data) and should NOT be included in the list of references.

The references should be cited in the text as, for example, ‘Smith 2004’, ‘Smith and Wesson 2005’ or, for three or more authors, ‘Smith et al. 2006’. Two or more papers by the same author(s) in the same year should be distinguished by letters, e.g. ‘Smith 2004a’, ‘Smith 2004b’ etc. Letters should also distinguish papers by three or more authors with identical first author and year of publication. References should be listed according to the alphabetical order of the first author, always in the order SURNAME

XY in which X and Y are initials. If there are more than ten authors, use et al. after the first author. References must contain the title of the article. Names of the journals should be abbreviated. For the correct abbreviations, refer to lists of the major databases in which the journal is indexed or consult the World List of Scientific Periodicals. The abbreviation to be used for the Anais da Academia Brasileira de Ciências is An Acad Bras Cienc. The following examples are to be considered as guidelines for the References.

REFERENCES

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. Adv Pain Res Ther 6: 167-182.
Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Deland-Sheer E, Giuffrida R And Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. An Acad Bras Cienc 56: 371-383.
Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J 298: 249-258.
Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus Theriosynoecum Branson, 1936 and validity of related Genera. An Acad Bras Cienc 56: 207-215.

Books and book chapters
Davies M. 1947. An outline of the development of Science.Thinker′s Library, n. 120. London: Watts, 214 p.
Prehn RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.
Uytenbogaardt W And Burke EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.
Woody Rw. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

Other publications

International Kimberlite Conference, 5, 1991. Araxá, Brazil. Proceedings... Rio de Janeiro: CPRM, 1994, 495 p.

Siatycki J. 1985. Dynamics of Classical Fields. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 1985, 55 p. Preprint no. 600.