

TALLYTA RAYANE GONÇALVES DE LUCENA

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE DA TELOMERASE HUMANA EM
CÂNCER COLORRETAL

BRASÍLIA, 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TALLYTA RAYANE GONÇALVES DE LUCENA

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE DA TELOMERASE HUMANA EM
CÂNCER COLORRETAL

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

BRASÍLIA, 2018

TALLYTA RAYANE GONÇALVES DE LUCENA

MESTRE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 07 de dezembro de 2018

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira – presidente Universidade de
Brasília

Prof. Dr. Rodrigo Haddad – membro Universidade de Brasília

Profª Dr.a Fabiana Pirani Carneiro – membro Universidade de Brasília

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo– suplente
Universidade de Brasília

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todos os obstáculos que colocastes a minha frente e por sempre estar ao meu lado, me dando forças para enfrentar cada um deles.

Ao meu orientador, Prof. Diêgo pela oportunidade de me inserir no meio científico, pela confiança e apoio durante todo o processo desse projeto.

A Prof.^a. Isabel Silva, por cada palavra de apoio, pela paciência, pela dedicação, por todo ensinamento passado. Seu apoio foi de grande importância para a realização desse projeto.

A técnica de laboratório Lorena Noronha, por estar ao meu lado me dando apoio desde a graduação, seja com uma ajuda nos procedimentos ou com suas palavras de conforto. Seu apoio também foi de suma importância.

A minha mãe Cidália, meus irmãos Victor e Douglas e meu sobrinho Kauã, por sempre estarem ao meu lado, por toda compreensão, ajuda e motivação. Sou muito grata a Deus por ter vocês em minha vida.

A toda equipe técnica, estagiários e aos professores do laboratório de Análises Clínicas pelo suporte, em especial, ao grupo de pesquisa “PatoMol”, pelo apoio e por sempre comemorarem comigo a cada amplificação das minhas amostras.

As minhas amigas Luiza Ismael e Patrícia Montes, por todo companheirismo, por sempre acreditarem em mim, por cada ajuda seja nos estudos ou no laboratório e por sempre me incentivarem a ir mais longe.

Ao CNPQ pelo suporte financeiro e as empresas Sabin e Cetro pela parceria com a pesquisa.

Foram dois anos e meio de muito crescimento e amadurecimento tanto pessoal como profissional. Sou muito grata a todos que de alguma forma participaram de mais um episódio da minha jornada acadêmica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição proporcional por sexo dos dez tipos de câncer mais incidentes no ano de 2018.....	13
Figura 2 - Ilustração das diferentes partes do cólon e reto.....	13
Figura 3 – Alterações genéticas no decorrer da progressão do câncer colorretal.....	18
Figura 4 – Representação esquemática da expressão da telomerase.....	19
Figura 5 – Localização cromossômica do gene da transcriptase reversa.....	22
Figura 6 – Distribuição por sexo dos pacientes estudados.....	28
Figura 7 – Faixa etária no momento do diagnóstico.....	29
Figura 8 – Relação entre o KRAS mutado e selvagem referente a idade dos pacientes	31
Figura 9 – Relação entre o número de CEA antes do tratamento conforme o sexo dos pacientes.....	31
Figura 10 – Variantes do gene hTERT obtidas através do sequenciamento das amostras.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEA	Antígeno carcinoembrionário sérico
Cettro	Centro de câncer de Brasília
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos
hTERT	Subunidade catalítica da telomerase humana
HUB	Hospital Universitário de Brasília
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mRNA	RNA mensageiro
pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerase em cadeia (do inglês)
RNA	Ácido ribonucleico
TaqDNA	Enzima polimerase que adiciona dNTP
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
BRAF	Gene da família RAF das proteínas quinases serina
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
DKC1	Disquerina pseudouridina sintase
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
HNPC	Câncer Colorretal Hereditário Não Poliposo
KRAS	Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
MACC1	Metástases Associados ao Câncer Colorretal
MMR	<i>Mismatch Repair Gene</i>
MNS16A	Microssatélite de repetição em tandem
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
OMS	Organização Mundial de Saúde
P53	Proteína supressora de tumor
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
TERC	Componente RNA da telomerase
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>

RESUMO

O câncer colorretal é uma das patologias malignas mais comuns em todo o mundo, sendo um dos cânceres mais diagnosticado no Brasil. Já existem marcadores prognósticos de uso clínico para a doença, mas em pequeno número e pouco específicos, o que indica a necessidade de mais estudos a respeito. A enzima telomerase (hTERT) é essencial para a carcinogênese, e polimorfismos na região promotora do gene dessa enzima têm sido associados à progressão de diversos tipos de câncer. Este estudo analisou um fragmento dessa região do DNA de pacientes com câncer colorretal a fim de possibilitar identificação de novos marcadores moleculares. Para isso, o DNA de pacientes com câncer colorretal foi extraído, submetido a PCR (Reação de polimerase em cadeia) para amplificação da região de interesse, que foi então sequenciada. Ao todo, 19 pacientes entre 32 e 78 anos com câncer aceitaram participar do estudo. O tipo de tumor mais frequente foi o adenocarcinoma de sigmoide. Aproximadamente 65% dos pacientes que tiveram o gene KRAS avaliado apresentaram mutação. Já o NRAS estava mutado em 60% das amostras em que foi avaliado. As análises de correlação nos mostraram associações com sexo ou casos precoces de acordo com a idade do paciente. Em relação aos valores da dosagem de CEA (Antígeno carcinoembrionário sérico), foram mais elevados nos homens que nas mulheres. O sequenciamento da região de interesse permitiu a identificação de três polimorfismos de um único nucleotídeo (rs796832466, rs34233268 e rs527897586), o que é bastante revelador considerando a pequena amostra utilizada, pois demonstra elevada frequência dessas variantes gênicas, que por essa razão têm alto potencial como marcadores prognósticos ou mesmo fatores de risco.

Palavras-chave: câncer colorretal; telomerase; polimorfismo; TERT.

ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the most common malignancies in the world, being one of the most diagnosed cancers in Brazil. There are already prognostic markers of clinical use for the disease, but in a small number and not very specific, which indicates the need for further studies. The enzyme telomerase (hTERT) is essential for carcinogenesis, and polymorphisms in the gene promoter region of this enzyme have been linked to the progression of various types of cancer. This study analyzed a fragment of this DNA region of patients with colorectal cancer in order to allow the identification of new molecular markers. For this, the DNA of colorectal cancer patients was extracted, submitted to PCR (Polymerase Chain Reaction) for amplification of the region of interest, which was then sequenced. In all, 19 patients between 32 and 78 years with cancer accepted to participate in the study. The most frequent tumor type was sigmoid adenocarcinoma. Approximately 65% of the patients who had the KRAS gene evaluated had a mutation. NRAS was mutated in 60% of the samples in which it was evaluated. Correlation analyzes showed associations with sex or early cases according to the age of the patient. Regarding the CEA (Serum Carcinoembryonic Antigen) values, they were higher in men than in women. Sequencing of the region of interest allowed the identification of three polymorphisms of a single nucleotide (rs796832466, rs34233268 and rs527897586), which is quite revealing considering the small sample used, since it shows high frequency of these gene variants, which for this reason have high potential such as prognostic markers or even risk factors.

Keywords: colon cancer; telomerase; polymorphism; TERT.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 Câncer e câncer colorretal	12
1.2 Genes envolvidos no câncer colorretal	14
1.3 Marcadores prognósticos do câncer colorretal.....	15
1.3.1 Metástases Associados ao Câncer Colorretal (MACC1)	15
1.3.2 Antígeno Carcinoembrionário sérico (CEA).....	16
1.3.3 Gene <i>BRAF</i>	17
1.3.4 Gena <i>KRAS</i> e <i>NRAS</i>	17
1.4 Marcador molecular associado à imortalização das células	18
1.5 Polimorfismos do gene da telomerase humana associados ao prognóstico	22
do câncer.....	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 METODOLOGIA	24
3.1 Coleta de dados clínicos	24
3.2 Coleta de sangue.....	25
3.3 Extração de DNA	25
3.4 Análise do polimorfismo	25
3.5 Purificação das amostras.....	26
3.6 Sequenciamento	26

3.7	Análise de bioinformática	26
3.8	Análise estatística	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Dados clínicos.....	28
4.2	Polimorfismo	32
5	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
	ANEXOS.....	41

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Câncer e câncer colorretal

O termo câncer (ou neoplasia maligna) refere-se a um grupo de doenças que são evidenciadas pelo crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, e que podem se espalhar (metástase) para outras regiões do corpo (1). Em contrapartida, um tumor benigno significa apenas que existe uma massa de células localizada que se propaga lentamente e se assemelha ao seu tecido original (2).

Os tumores benignos se multiplicam por expansão, continuando em seu local de origem, sem invadir ou infiltrar tecidos próximos ou ocasionar metástase para outros locais. Já os tumores malignos são agressivos, provocam destruição nos tecidos vizinhos, podem progredir a metástase em seu local de origem ou em outros órgãos e tecidos (3). O local em que o câncer se origina no corpo é denominado de local primário (ou tumor primário). As células do tumor primário podem expandir-se para outros tecidos, originando lesões secundárias (metástases) (4).

O câncer é um problema de saúde pública mundial. Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), até o ano de 2030 estima-se que ocorram cerca de 27 milhões de novos casos e 17 milhões de óbitos ocorrentes pelo câncer (5).

De acordo com o Inca (Instituto Nacional de Câncer) (6), para o biênio 2018/2019, estima-se a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos anuais de câncer no Brasil. Essas estimativas retratam a descrição de um país que possui os cânceres de mama feminina, pulmão, próstata e colorretal entre os mais incidentes, porém, os cânceres de estômago, colo do útero e esôfago ainda mostram taxas altas.

Já as estimativas do câncer colorretal no Brasil apontam para cerca de 17.380 novos casos em homens e 18.980 nas mulheres para os anos de 2018/2019 (figura 1), sendo o segundo tipo de câncer mais comum nas mulheres e o terceiro entre os homens, e constituindo-se como o terceiro mais frequente no Distrito Federal (16,95/100 mil) (6).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1: Distribuição proporcional por sexo dos dez tipos de câncer mais incidentes no ano de 2018. (Adaptado 31)

O câncer colorretal engloba tumores que acometem um seguimento do intestino grosso (cólon) e o reto. O cólon estrutura-se na extremidade do aparelho digestivo, com a finalidade de eliminar excretos e absorver água. O reto é a parte final do cólon (Figura 2) (7).

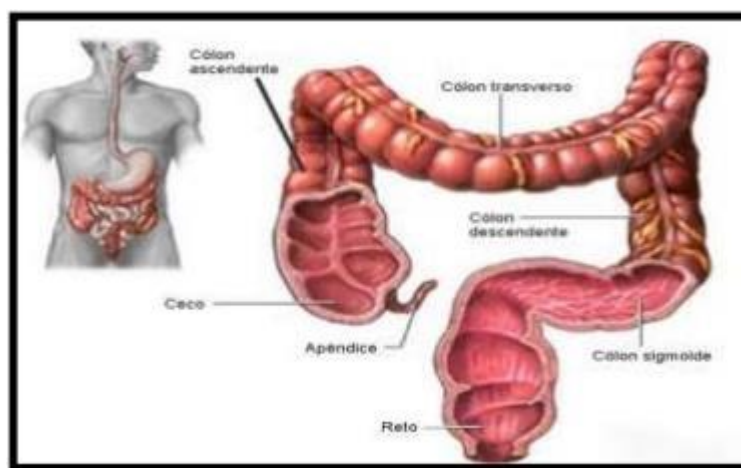


Figura 2: Ilustração das diferentes partes do cólon e reto. (Adaptado 7).

O cólon é o local mais frequente dos tumores primários de cólon e reto, como por exemplo os adenomas e adenocarcinomas. O câncer colorretal atinge o sigmoide e o segmento distal do reto, seguidos pelo cólon transverso e ascendente e pelo ceco. Os adenocarcinomas correspondem praticamente à totalidade dos cânceres colorretais.

Normalmente, essa neoplasia ocorre a partir de alterações genéticas de células da mucosa colônica normal que progridem para pólipos adenomatosos (8).

O câncer colorretal é uma das patologias malignas mais comuns em todo o mundo, mostrando-se como um importante problema de saúde pública. Aspectos dietéticos e ambientais possuem influencia na gênese desta neoplasia (9).

A neoplasia colorretal é um dos cânceres mais diagnosticados no Brasil, com maior incidência na população idosa, porém, o mesmo pode ocorrer em qualquer faixa etária. Os adultos jovens estão mais propensos a desenvolver a patologia em condições hereditárias (2,10). Cerca de 80% dos indivíduos adquirem o câncer colorretal de forma esporádica, enquanto aproximadamente 20% estão propensos a desenvolver a neoplasia na forma hereditária (2).

Dentre os principais fatores de risco do câncer colorretal estão: o consumo de carne vermelha, tabagismo, alcoolismo, dentre outros. Entretanto, o consumo de grão e fibras parece ser fator de proteção. Outros fatores de riscos são os pólipos colorretais e/ou histórico familiar, fatores hereditários e o histórico pessoal de doenças inflamatória crônica do intestino (7).

Dois tipos de síndromes do câncer colorretal hereditário têm sido bastante estudados: a síndrome de Câncer Colorretal Hereditário Não Poliposo (HNPCC) e a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP). A síndrome FAP é bastante rara, compreendendo 1% dos casos diagnosticados, enquanto a síndrome HNPCC possui uma maior ocorrência (11).

1.2 Genes envolvidos no câncer colorretal

Proteína APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) - A mutação da proteína APC é classificada como sendo o marcador de pólipos adenomatosos familiares, sua ocorrência acontece de forma hereditária, podendo ser detectada em todas as células do organismo. A mutação dessa proteína é responsável pela incidência no aspecto hereditário da doença. A proteína e as mutações no gene APC encontram-se também diretamente ligados à gênese dos cânceres colorretais esporádicos ou não hereditários, compreendendo assim, os pequenos adenomas como os tumores malignos mais avançados (12).

Já as mutações que ocorrem na síndrome HNPCC se encontram localizados no gene *MMR* (*Mismatch Repair Gene*), que reparam erros que ocorrem no decorrer da replicação do DNA. Entre os diversos genes que colaboram com o processo de reparo do DNA, ocorrem mutações nos genes *hMLH1* e *hMSH2*, que representam cerca de 90% das mutações identificadas no HNPCC. Outras mutações no gene *hMSH6* foram detectadas em algumas famílias e mutações raras dos genes *hPMS1* e *hPMS2* também foram descritas. Mutações que ocorrem no gene *hMSH2* tendem a ter um aumento significativo, para riscos de neoplasias extra-colônicas (13).

Proteína DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) - aparentemente é uma proteína importante no processamento da carcinogênese colorretal. Sua descoberta deve-se as manifestações ocorrentes em cerca de 70% das neoplasias desse tipo, apresentando mutações em um mesmo gene, localizado no cromossomo 18, descrito como um gene supressor de tumor. Estudos mostram que a proteína DCC, possui uma associação entre a concentração tumoral da neoplasia colorretal com o prognóstico da doença (14).

Já o gene *TP53* supressor de tumor se encontra localizado no cromossomo 17 e codifica a proteína p53 (15,16). Sua atuação acontece como um sensor de falhas no DNA e de assistência no sistema de reparos, aproveitando os *checkpoints* para suspender o ciclo celular e induzir as células a apoptose, o que impede então, a ocorrência de proliferação celular com o DNA mutado. Assim, a atuação desta proteína segue duas vias: corrigir a mutação por meio da ativação da proteína ou a levar a célula a apoptose (14,17).

1.3 Marcadores prognósticos do câncer colorretal

1.3.1 Metástases Associados ao Câncer Colorretal (MACC1)

O MACC1 é um regulador independente de estágios tumorais de sobrevida e de metástase em pacientes com neoplasia colorretal, esse regulador possibilita a identificação precoce dos casos de alto risco. Os níveis constantes de MACC1 estão relacionados com a progressão do tumor, a evolução de metástases e na sobrevida de pacientes com tumores sólidos, tornando-se um fator determinante para o avanço da patologia (18).

Vale ressaltar que o MACC1, é um biomarcador de grande relevância em carcinomas como de esôfago, mama, pulmonar, gástrico, pancreático, nasofaringe, ovário, osteossarcoma dentre outros (19).

A metástase do parênquima pulmonar pode alterar tanto a função respiratória como ocasionar óbitos em pacientes com de neoplasia colorretal. Vários fatores de risco auxiliam para o mau prognóstico da patologia após a cirurgia. Dentre esses fatores de risco estão: uma sobrevida livre de doenças curta – DFS; o alto nível préoperatório do antígeno carcinoembrionário – CEA; a junção de metástases hepáticas; a quantidade de metástases hepáticas e o envolvimento ou ressecção completa linfonodal – LNI (18).

1.3.2 Antígeno Carcinoembrionário sérico (CEA)

O CEA é um marcador prognóstico de grande importância na neoplasia colorretal, entretanto, o reto possui vias diferentes de drenagem venosa, mostrando que os níveis de CEA em tumores retais mesentéricos e periféricos podem ser distintos, de acordo com a localização do tumor (20). Logo, os tumores situados no reto superior e médio, onde a drenagem venosa ocorre pela veia retal superior, podem ter níveis de CEA elevados na circulação portal, enquanto as lesões que se localizam no reto inferior podem apresentar níveis altos de CEA na veia cava inferior (20).

O CEA é frequentemente utilizado como um marcador sérico de carcinoma gastrointestinal, especialmente do tipo colorretal. Trata-se de uma glicoproteína da família das imunoglobulinas, e sua função é propiciar a ligação celular. O CEA é regularmente secretado por células normais do epitélio do trato digestivo para a luz intestinal, estando presente tanto em células normais como nas tumorais de mucosa gástrica (21).

Estudos mostram que pacientes com câncer colorretal com níveis altos de CEA no pós-operatório, possui um prognóstico ruim em relação aos pacientes com níveis baixos. Isso ocorre porque o CEA pós-operatório possui o potencial de fornecer informações prognósticas independente dos procedimentos tradicionais de estadiamento nos pacientes com a neoplasia (22).

1.3.3 Gene *BRAF*

O *BRAF* é um gene da família de quinases RAF (Proto-Oncogene Serine/Threonine-Protein Kinase) e atua na junção ao gene *RAS*. Estudos recentes mostram que a presença de mutações no gene *BRAF* V600E é um forte fator prognóstico de sobrevida dos pacientes com câncer colorretal nos estágios II e III, em especial nos tumores com baixa estabilidade (23). Além disso, a presença de mutações V600E no gene *BRAF* possui ligação com o risco aumentado de mortalidades em pacientes com neoplasias colorretais (24).

1.3.4 Gena *KRAS* e *NRAS*

Mutações nos códons 12, 13 ou 61 tornam a proteína RAS ativa e são encontradas em cerca de 16% de todos os casos de neoplasias (25). Estudos mostram que as proteínas RAS funcionam como um "interruptor" na cadeia membrana-núcleo ativando o desenvolvimento e distinguindo células por impulsos extracelulares (12).

Dentre as três isoformas de RAS mais relevantes, *KRAS* é a isoforma mutante mais constante nos tumores. O *KRAS* é normalmente mutado no códon 12, sendo classificado como um oncogene (12, 25). As mutações se encontram ativas nos dois códons 12 e 13, porém, a localização da mutação possui grande relevância clínica e funcional (25). Outras mutações nos códons *NRAS* ou *KRAS* 61 e 146 do gene *RAS*, podem conceder novos marcadores prognósticos importantes que podem ser utilizados como métodos terapêuticos de tratamento para a neoplasia colorretal (23)

As neoplasias colorretais frequentemente possuem mutações no *KRAS*, porém, somente um subgrupo das linhagens celulares do câncer de colón portadoras do *KRAS* mutante necessitam da sinalização de sobrevivência (26).

Um terço dos tumores colorretais possuem mutações *KRAS*, 19% dessas mutações se encontram no códon 13, o restante está localizado no códon 12. As mutações ocorrentes no códon 12 estão ligadas ao fenótipo metastático mais agressivo dos tumores. No entanto, pacientes que possuem mutações no códon 13 retratam um prognóstico consideravelmente pior (25).

A figura abaixo, traz a evolução da lesão colorretal do ponto de vista histológico, sofrendo as ações dos genes envolvidos na neoplasia.

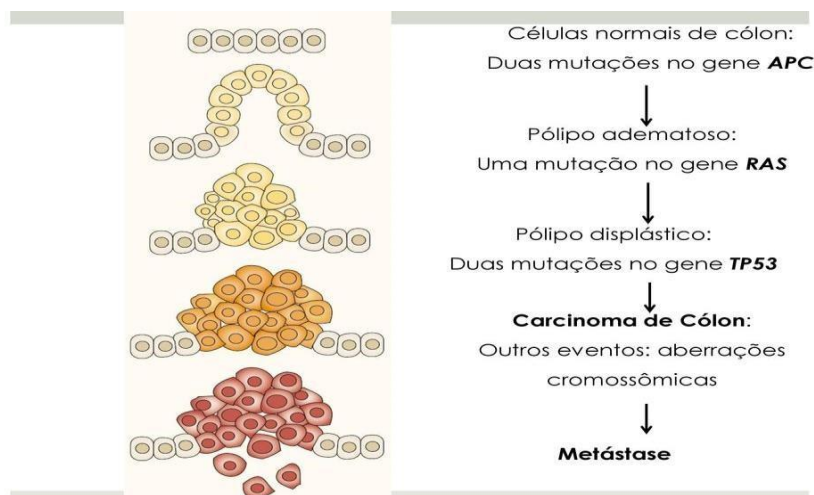


Figura 3: Alterações genéticas no decorrer da progressão de câncer colorretal. (Adaptado 58).

1.4 Marcador molecular associado à imortalização das células

Os telômeros são estruturas de DNA que estão localizados nas extremidades dos cromossomos. São compostas por sequencias simples e repetitivas de DNA (repetições TTAGGG) (27,28). Os telômeros são constituídos por cerca de 3 a 20 kb de repetições ricas em adenina e timina cercadas por regiões subteloméricas que chegam até 300 kb nos cromossomos (29).

Suas principais funções biológicas são a garantia da replicação completa das extremidades do cromossomo, a manutenção da integridade cromossômica, o estabelecimento da estrutura tridimensional do núcleo celular, a colaboração na regulação da expressão genética, o auxílio na organização funcional cromossômica dentro do núcleo, o controle da capacidade das células humanas de se replicar e a entrada da senescência celular (27, 18).

Sem os telômeros, o genoma perde suas informações e fica incompleto após a divisão celular, pois as enzimas que replicam o DNA não podem continuar sua duplicação até o final do cromossomo (30).

A cada duplicação do DNA para a realização da mitose, o cromossomo perde um pequeno fragmento de sua fração final – o telômero. (31). A duplicação do DNA ocorre com a assistência da enzima DNA ligase de maneira semiconservativa, apresentando a cada nova fita de molécula-filha de DNA, uma fita proveniente da molécula-mãe e outra fita recém-sintetizada (27).

A enzima DNA Polimerase encontra-se ativa em uma grande parte dos cromossomos, no entanto, é completamente dispensável no final das extremidades teloméricas, devido à incapacidade de ação da proteína ligase por ausência de um local para seu anelamento a sequência mãe, proporcionando então a diminuição dos telômeros (27), conforme representado na figura 4.

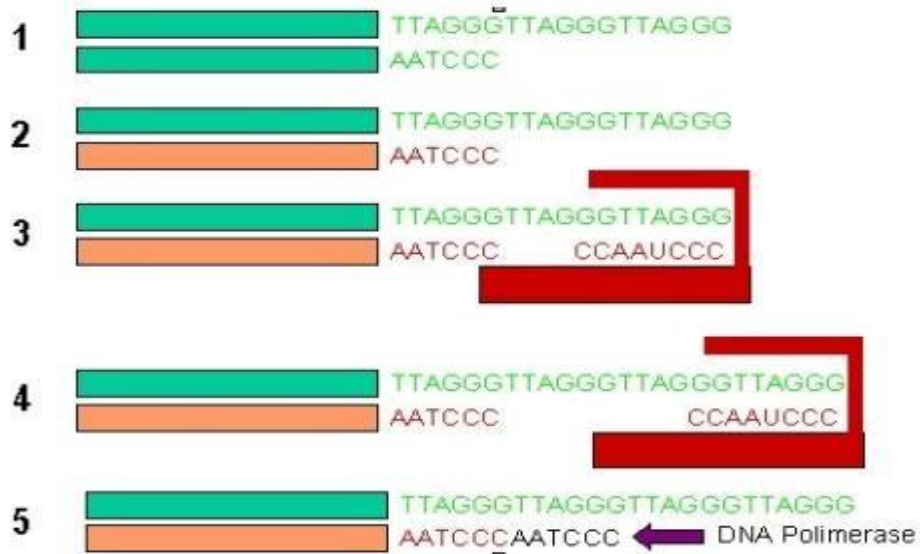


Figura 4: Representação esquemática da expressão da telomerase (Adaptado 27).

Células imortalizadas com uma capacidade de replicação indefinida possuem dois mecanismos que conservam o comprimento dos telômeros. A atividade da enzima telomerase é o principal mecanismo de transformar células imortalizadas em células neoplásicas (16).

A telomerase é uma enzima que fornece às células a habilidade de restaurar seus telômeros e repara as perdas que ocorrem a cada replicação celular, possuindo um papel importante para a proteção e manutenção dos telômeros a um longo prazo (15,32). Com o decorrer dos anos, a telomerase perde sua atividade e os telômeros vão se encurtando após várias divisões celulares. Com isto, os genes localizados próximos aos telômeros tendem a se danificar (15).

A telomerase é um complexo ribonucleoprotéico (RNP) que utiliza um molde de RNA intrínseco para sintetizar as repetições teloméricas nos terminais cromossômicos (27,33) A telomerase é praticamente conservada em todos os eucariotos. Ela é composta por uma subunidade catalítica, constituída por um componente protéico semelhante a

uma transcriptase reversa (TERT), por uma subunidade estrutural, constituída pelo componente RNA da telomerase (TER) e por algumas proteínas associadas (35). Essa enzima se encontra ativa em vários tipos de células, incluindo as células progenitoras, germinativas, células-tronco e tumorais, porém, ao longo da vida de um telômero, a mesma se encurta na maioria dos tecidos com é o caso das células somáticas (27,34, 35).

Em grande parte das células somáticas a telomerase se encontra inativada, e com isso os telômeros tendem a se encurtar a cada ciclo de divisão celular, as células acabam perdendo sua capacidade de se replicar quando um pedaço crítico é alcançado (35). Entretanto, a expressão da telomerase é detectável em cerca de 85% dos pacientes portadores dos cânceres mais comuns como câncer de pulmão, próstata, mama, fígado, estômago e colón (36).

O processo de senescência celular é o caminho das células somáticas normais replicativas. Nessas células, não ocorre a expressão da telomerase e os telômeros, desta forma, encurtam-se progressivamente a cada evento de mitose. Estudos mostram que o TERT é o único componente fundamental para recompor a ação do complexo telomerase em células negativas para sua própria ação (37). Quando os telômeros atingem um tamanho muito curto, as células entram em colapso e ativam vários mecanismos de *checkpoint* de ciclo celular e de reparo do DNA que culminam em fusões terminais, parada do ciclo celular, senescência e/ou apoptose. Na maioria dos casos, as células se tornam senescentes antes de se tornarem cancerosas, mas se alguma célula conseguir ultrapassar o ponto de colapso e continuar se dividindo com os seus telômeros não funcionais e a sua maquinaria de reparo de DNA ativada, isso gerará instabilidade genômica e poderá culminar na oncogênese (35).

Assim, a longevidade e a progressão maligna da célula cancerosa dependem da expressão da telomerase ou de outros mecanismos que as auxiliem na manutenção de alta capacidade proliferativa. Com isto, ocorre a reativação e a expressão da telomerase em altas quantidades em quase todas as células tumorais malignas, com este cenário, a telomerase tornou-se um alvo para o desenvolvimento de novas terapias anti-câncer (36;37).

A telomerase humana é um conjunto formado por inúmeros componentes, onde os principais são o componente de RNA-template, codificado pelo gene TERC, a

transcriptase reserva, codificada pelo gene TERT e a disquerina, codificada pelo gene DKC1 (37). O TERT utiliza o gene TERC como molde para realizar a síntese do DNA de fita simples dentro dos telômeros, evitando com que o cromossomo se encurte no decorrer da replicação cromossômica (38).

A ativação da enzima telomerase induzida pelo gene *TERT* é um método primordial para a imortalização das células e a formação de neoplasias. As sequências das variantes do gene *TERT* estão relacionadas com a suscetibilidade de diversos tipos de câncer (33).

A telomerase pode ser reativada por meio de mecanismos genéticos e epigenéticos. Os mecanismos genéticos abrangem mutações somáticas na região promotora do gene *TERT*, os quais são constantemente observados em muitos tipos de neoplasias, particularmente os que se originam em tecidos com níveis baixos de se auto renovar. Já os mecanismos epigenéticos, regulam a telomerase positivamente envolvendo a hipermetilação de regiões específicas na região promotora do TERT, como são os casos dos tumores pancreáticos e cerebrais (30).

Portanto, o hTERT por ser considerado componente chave da telomerase humana e é essencial para as células tumorais, porém, tem expressão restrita em tecidos normais, de modo que pesquisadores acreditam que variações no gene hTERT possuem um papel importante na suscetibilidade ao câncer (39).

Estudos mostram que a expressão elevada do gene hTERT se encontra associada com um mau prognóstico de tumores sólidos, como câncer gástrico, da cabeça, de pulmão, de ovário, mama glioblastoma, colo do útero e colo retal (35).

A ativação da enzima telomerase induzida pelo componente catalítico TERT é uma etapa essencial no processo de imortalização das células e na transformação maligna das células humanas (33). A expressão do hTERT regulada positivamente se caracteriza como um marcador substituto do aumento da ação da telomerase em grande parte dos cânceres (35).

1.5 Polimorfismos do gene da telomerase humana associados ao prognóstico do câncer

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*), que se encontra no cromossomo 5p15.33 (Figura 5), tem suas variantes associadas ao risco para vários tipos de neoplasias (40).

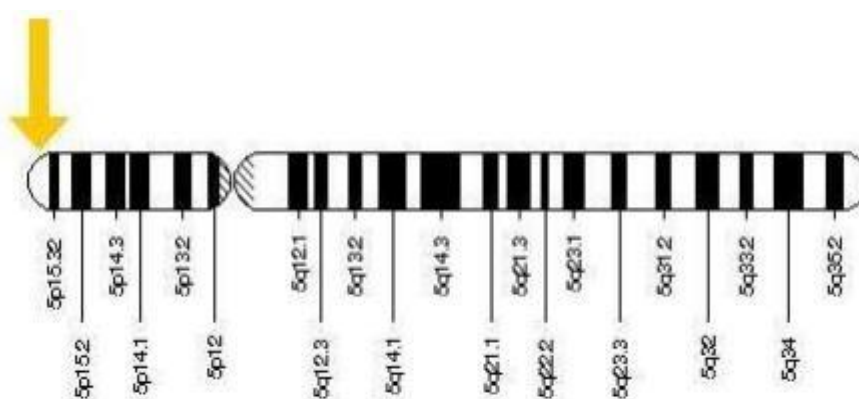


Figura 5: Localização cromossômica do gene da transcriptase reversa (*TERT*). (Adaptado de 37).

Inúmeros polimorfismos se encontram associados ao câncer, como é o caso do rs10069690 que foi identificado dentro do gene *hTERT*. Seu alelo menor está adicionado no íntron 4 do *hTERT* e está ligado a um risco elevado de vários tipos de câncer, como os carcinomas de ovário e mama (35).

Choi et. al, (40) relata que o comprimento dos telômeros foi encurtado em 35 amostras de tecido de câncer gástrico em relação à mucosa gástrica não cancerosa, evento associado à expressão *hTERT* e ao polimorfismo rs2736100, sugerindo que tal polimorfismo está ligado ao comprimento do telômeros no câncer gástrico.

Outra variante comum do gene *TERT* é do polimorfismo rs2736098. Esse polimorfismo se encontra associado às mutações no gene promotor do *hTERT* e possui ligação com o mau prognóstico de diversos tipos de tumores (41). Pang et al. (42) mostra em seu estudo que este polimorfismo aumenta o risco das neoplasias de mama, bexiga, pulmão e colorretal.

O polimorfismo 2735940 é outra variante com um nível maior de associação na atividade transcricional do gene, influenciando no risco das neoplasias de mama e com grande suscetibilidade para os tumores epiteliais, como os de pulmão próstata e colorretal (43).

Estudos mostram que a expressão do gene *hTERT* é maior em neoplasias colorretais do que na mucosa adjacente não cancerosa, o que faz aumentar a progressão do tumor (44). Alguns estudos apresentam o papel do polimorfismo MNS16A na origem de diferentes neoplasias, incluindo colorretal (25,45). O polimorfismo MNS16A é uma microssatélite de repetição em tandem polimórficas, que está localizado no gene *hTERT* e que influencia na ação promotora do gene (30,46). Já o polimorfismo rs2736100 possui um alelo que se encontra entre as oito variantes relacionados a telômeros longos em glóbulos brancos (47).

Conforme o exposto, o gene *TERT* é um componente de grande importância na imortalização das células e na formação das neoplasias, e está presente em na maioria dos tumores. Além disso, todos os indícios da relevância clínica das variantes do gene *hTERT* demonstram a relevância de se caracterizar melhor os polimorfismos nesse gene em diferentes populações, especificamente, nesse caso, dentre os pacientes acometidos por câncer colorretal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a sequência do gene TERT e seus polimorfismos variantes em pacientes com câncer colorretal

2.2 Objetivos específicos

- a) Descrever as informações clínicas patológicas e laboratoriais relevantes da população estudada
- b) Identificar os polimorfismos variantes do gene *TERT*

3 METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido como estudo clínico experimental, em que a população de estudo foi constituída por pacientes com câncer colorretal (n=19) que aceitaram voluntariamente a participar da pesquisa, atendidas no período de março de 2017 a julho de 2018 no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Centro de Câncer de Brasília (CETTRO). A proposta integra o projeto “Estudo de marcadores moleculares associados à resposta de pacientes oncológicos à quimioterapia para uso em terapêutica racional em saúde pública”, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP/FS-UnB) na área temática “Genética humana” sob número CAAE: 30711114.3.0000.0030. Os critérios de inclusão foram: pacientes com neoplasias colorretais que estejam realizando quimioterapia. Já os critérios de exclusões foram: pacientes com outras neoplasias que não fosse a colorretal.

3.1 Coleta de dados clínicos

Os dados clínicos foram coletados por meio de prontuários eletrônico dos pacientes disponíveis pela Cetro e pelo HUB e fixados em uma planilha no Excel. As variáveis coletadas foram: ano de nascimento, idade ao diagnóstico do câncer colorretal, principais sinais e sintomas, data da colonoscopia, principais achados no exame de

colonoscopia, dosagem do CEA (em ng/mL) no sangue periférico antes do tratamento, tipo do tumor e se havia mutações de KRAS e NRAS.

3.2 Coleta de sangue

Durante a consulta oncológica o paciente foi convidado a participar do estudo. Aqueles que aceitaram assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram coletados 4mL de sangue periférico dos pacientes, em tubo com EDTA específico para biologia molecular. A coleta e o armazenamento primário foram realizados pelo Laboratório SABIN/DF, sendo que não houve qualquer custo financeiro para o paciente. Posteriormente o material foi levado para o laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ceilândia/UnB e processado para extração do DNA.

3.3 Extração de DNA

A extração foi executada por desidratação e precipitação com o kit “Nucleo Spin Blood Quick Pure” (fabricante MACHEREY-NAGEL GmbH&Co.; lote:1611/001), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração e pureza do DNA foram estabelecidas por espectrofotometria por meio do equipamento NanoDropOne (ThermoScientific, Madison, USA). As amostras de DNA foram diluídas e congeladas a 80°C. O rendimento médio obtido foi de 100 ng/μL.

3.4 Análise do polimorfismo

Para análise do polimorfismo da região promotora da hTERT, foi realizada a técnica de amplificação da região gênica de interesse por PCR convencional. As sequências iniciadoras foram: F:5'-GGCCGATTCGACCTCTCTC-3' e R: 5'-CGGAGCTGGAAGGTGAAG-3' (DNA Express Biotecnologia LTDA, São Paulo).

Em cada reação, foram utilizados 8,0 μL de DNA genômico na concentração de 10ng/μL; 2,5 μL de tampão 10x (10 mM de Tris e 50 mM de KCl); 0,5 μL de MgCl₂ (Fermentas), 0,5 μL de dNTPs (2,5mM; LGC); 0,5 μL de Taq-Polimerase (Fermentas, 5U/μL); 1,5μL de cada oligonucleotídeo forward e reverse (10 μM); completando com água Milli-Q para um volume final de 25 μL por reação.

Estes oligonucleotídeos flanqueiam o gene hTERT e amplifica um fragmento de DNA de 242 pb.

As condições da PCR foram as seguintes: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, 72°C durante 8 minutos. O equipamento utilizado foi termociclador Techne modelo TC-512.

Em seguida, os fragmentos de DNA foram submetidos a um gel de eletroforese com agarose a 2%, para avaliar a condição de banda esperada, condição do controle negativo e presença de banda única.

3.5 Purificação das amostras

A purificação das amostras foi realizada com o kit “PureLinkQuick Gel Extraction” (fabricante: InvitrogenbyThermo Fisher Scientific; lote 00589967), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6 Sequenciamento

A partir dos produtos resultantes das PCR's com as amostras dos pacientes com câncer, foi adotada a estratégia de realizar o sequenciamento desses fragmentos amplificados pelo Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - Setor de Sequenciamento de DNA – USP

As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics). Foram utilizados cerca de 200 ng de DNA plasmidial, 5 nmoles dos oligonucleotídeos apropriados a cada cDNA e o kit comercial DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing (MJ Research, INC).

3.7 Análise de bioinformática

Os pares de primers foram desenhados utilizando *Primer3Plus* 4.0 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) a partir da sequência nucleotídica da região promotora da transcriptase reversa da telomerase humana ([AF098956.1](#)) depositada no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Os pares de primers desenhados foram analisados quanto as propriedades termodinâmicas, estruturas secundárias e especificidade ao alvo molecular por meio dos

programas *OligoAnalyzer* 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) e Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Sendo selecionados 4 pares de primers para este gene, os quais foram sintetizados e testados por meio da técnica de PCR.

Após o sequenciamento, as análises das sequências obtidas dos eletroferogramas foram realizadas nos programas Chromas 2.6.6, Bioedit 7.0.5.3, BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e T-COFFEE (<http://tcoffee.crg.cat/>). E após o sequenciamento, foi realizada a análise dos sítios de restrição dos produtos de PCR por intermédio do programa de interface web NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

3.8 Análise estatística

Foram estimadas as frequências (para variáveis qualitativas) e percentis (para variáveis quantitativas) de determinadas características clínicas dos participantes do estudo tais como sexo, idade, polimorfismo no gene *KRAS*, dosagens de CEA (ng/mL), classificação histológica. Subsequentemente, os resultados do sequenciamento da região promotora do gene h.

Todos os testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism, versão 6.0 (San Diego, CA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados clínicos

Ao todo, 21 pacientes com câncer aceitaram participar do estudo, sendo 12 pacientes do HUB e 9 pacientes da Cettro. Foram excluídos 2 pacientes da análise dos dados clínicos do estudo, por não haver informações relacionadas ao câncer colorretal em seus prontuários. Para os demais pacientes, alguns não possuíam todos os dados, porém, continuaram no estudo e foram analisados os dados encontrados.

Do total de pacientes, 11 (57,89%) eram do sexo feminino e 8 (42,11%) pacientes do sexo masculino (Figura 6).

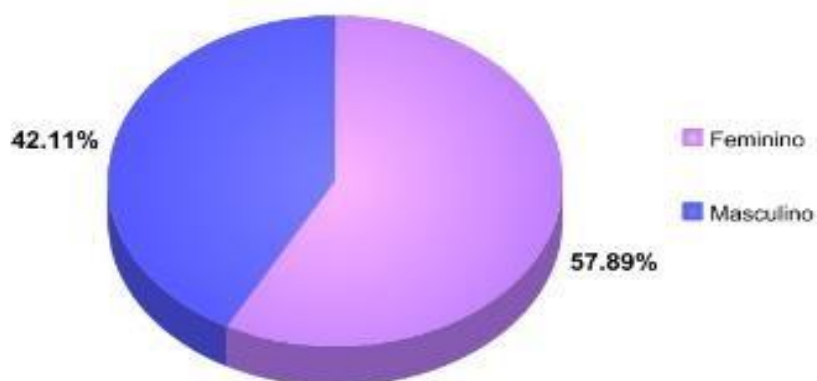


Figura 6: Distribuição por sexo dos pacientes estudados.

A faixa etária dos pacientes no momento do diagnóstico variou em torno dos 32 a 78 anos, tendo sua maior prevalência entre os 40-50 (36,84%) anos. Alguns estudos mostram que a maior incidência do câncer colorretal é em indivíduos idosos, sendo diagnosticado em cerca de 90% dos casos após os 50 anos, entretanto, quando diagnosticado em pacientes mais jovens, a patologia tende a maior gravidade, com uma maior propensão de disseminação a distância, um prognóstico ruim e menor possibilidade de cura (48,49). Na figura 7 é possível ver essa distribuição conforme a faixa etária.

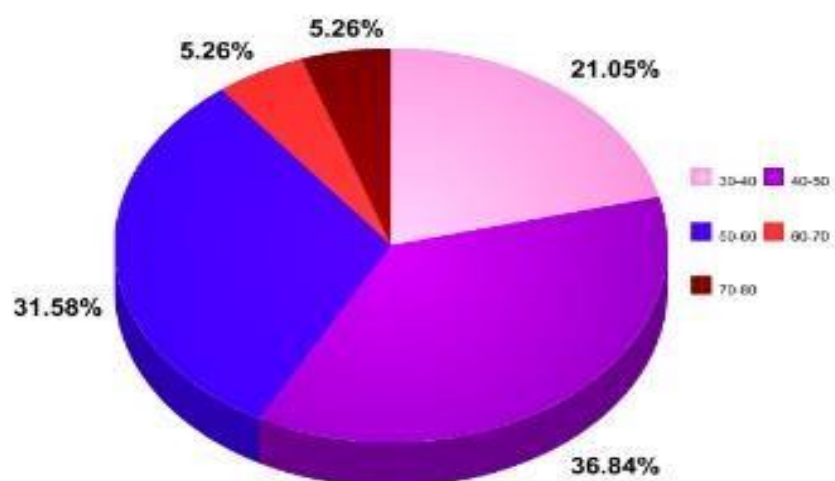


Figura 7: Faixa etária no momento do diagnóstico.

A maior incidência da neoplasia colorretal na população idosa não tem causa esclarecida. Uma possibilidade seja de que, os indivíduos mais idosos, tenham sido expostos aos fatores de risco por mais tempo, dado que a forma esporádica da doença possui grande relação com a alimentação e o estilo de vida dos indivíduos (3). De qualquer modo, é conhecida a relação entre idade avançada e risco de câncer para quase a totalidade de neoplasias estudadas.

As principais manifestações clínicas das neoplasias colorretais não são sinais patognomônicos, mas chamam a atenção para a possibilidade desse diagnóstico; porém, na maioria das vezes, esses sinais e sintomas não são levados em conta tanto pelo paciente como pelo médico. De acordo com sua distribuição topográficas, os sinais mais encontrados no colón direito são: anemia, dor, dispepsia, diarreia e massa palpável. Já no colón esquerdo são: dor, hemorragia, obstrução e obstipação (50).

Dentre os principais sinais e sintomas observados mais prevalentes nos participantes do estudo, estão: cólicas abdominais contínuas, perda do apetite, náuseas e vômitos, desidratação, parada na eliminação das fezes, diarreia ocasional e crônica, fezes malformadas e sangue oculto nas fezes.

O exame de colonoscopia é o procedimento mais adequado na investigação de patologias colorretais, com ênfase para os pólipos e as neoplasias, sendo apontado como principal via de diagnóstico (51). E os principais achados do exame, foram: ileostomia sem alterações, invasão angiolinfática, invasão perineural, áreas necrosada,

lesão tumoral subestenosante, pólipos colônicos, pólipos intestinais biopsiado, tumor sigmoide, lesão vegetante anelar e ulcerada.

Sobre os tipos de tumores, dos 19 pacientes que integraram o estudo, o adenocarcinoma de sigmoide foi o tipo de tumor mais frequente (11/19) conforme se encontra na literatura, sendo que seis das lesões foram descritas no prontuário simplesmente como neoplasia de colón. Mendonça et al. (52), relata que o adenocarcinoma é o principal tipo histológico encontrado nas neoplasias colorretais, acometendo, geralmente, o sigmoide e o segmento distal do reto, resultando assim na alteração do hábito intestinal.

Dezessete pacientes tiveram avaliação de KRAS, sendo que aproximadamente 65% (n = 11) apresentaram mutação e apenas 35% (6) a forma selvagem do gene. Já o NRAS foi avaliado em 15 amostras, e apresentou mutação em 60% (n = 9) delas. Todas as amostras com KRAS mutado apresentaram também mutação para NRAS.

Os componentes da família RAS são frequentemente encontrados em suas proporções oncogênicas (mutadas) nos tumores. As mutações no KRAS variam por cerca de 20% a 50%, já as mutações por NRAS são mais raras e ocorrem em cerca de 3% a 5% e o HRAS em 1% das neoplasias colorretais (53,54). Os resultados encontrados na população estudada chamam atenção para a elevada taxa de mutação encontrada para NRAS em relação ao comumente descrito na literatura.

O estudo de Iraha et al. (53) mostrou algumas diferenças entre as mutações do KRAS e NRAS. O KRAS ativado possui a capacidade de promover a proliferação tumoral e suprir sua diferenciação, enquanto que, a ativação do NRAS limita a apoptose de um tumor em desenvolvimento. Entretanto, a frequência das mutações NRAS relacionadas as características clínicas, moleculares e patológicas nos cânceres colorretais, são baixas (53,54).

O valor mediano de idade dentre aqueles que apresentaram mutação foi de 46 anos, e de 52 dentre os que tinham a forma selvagem do gene, mas a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,58$, teste não paramétrico de Mann Whitney), indicando que essa mutação não deve estar relacionada com o surgimento de casos precoces (figura 8). Não foi também significativa a diferença de frequência da mutação entre homens (4/7) e mulheres (7/10) ($p=0,64$, teste exato de Fisher).

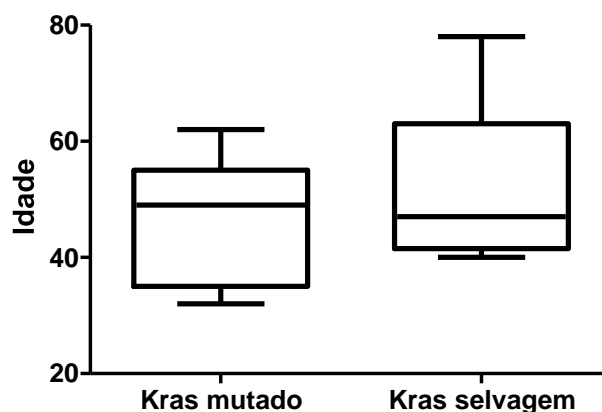


Figura 8: Relação entre o KRAS mutado e selvagem referente a idade dos pacientes

Em relação ao CEA, os valores medianos (em ng/mL) foram mais elevados nos homens, embora a diferença não tenha sido significativa. É interessante, no entanto, notar que os três valores extremamente altos (acima de 1000) foram observados apenas em pacientes do sexo masculino (figura 9).

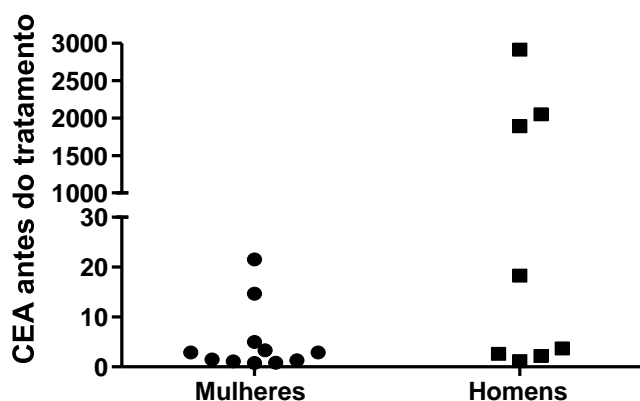


Figura 9: relação entre a quantificação do CEA antes do tratamento com o sexo dos pacientes.

Não há na literatura, estudos que tragam a diferenciação dos valores de referência de acordo com o sexo, porém, esses valores altos no sexo masculino podem indicar um possível prognóstico ruim para esses pacientes. Já que a elevação dos valores de CEA antes do tratamento, podem ocorrer devido a presença de metástase ou pela extensão local da neoplasia (55).

Outro indicativo de um prognóstico desfavorável para os pacientes com níveis elevados do antígeno, é que conforme Abreu et al. (56), os valores de sua dosagem no sangue periférico podem variar entre 5ng/mL e 7 ng/mL.

4.2 Polimorfismo

Onze das 19 amostras de pacientes com colorretal foram sequenciadas, sendo as demais excluídas por problemas técnicos (sequenciamento de qualidade não aceitável). Após a realização do sequenciamento, foram identificados os seguintes SNPs variantes localizadas no cromossomo 5 do gene hTERT: rs796832466 (variação A / G / T), rs34233268 (variação A / C / G) e rs527897586 (variação A/C/T). A figura 10 traz essas variantes.

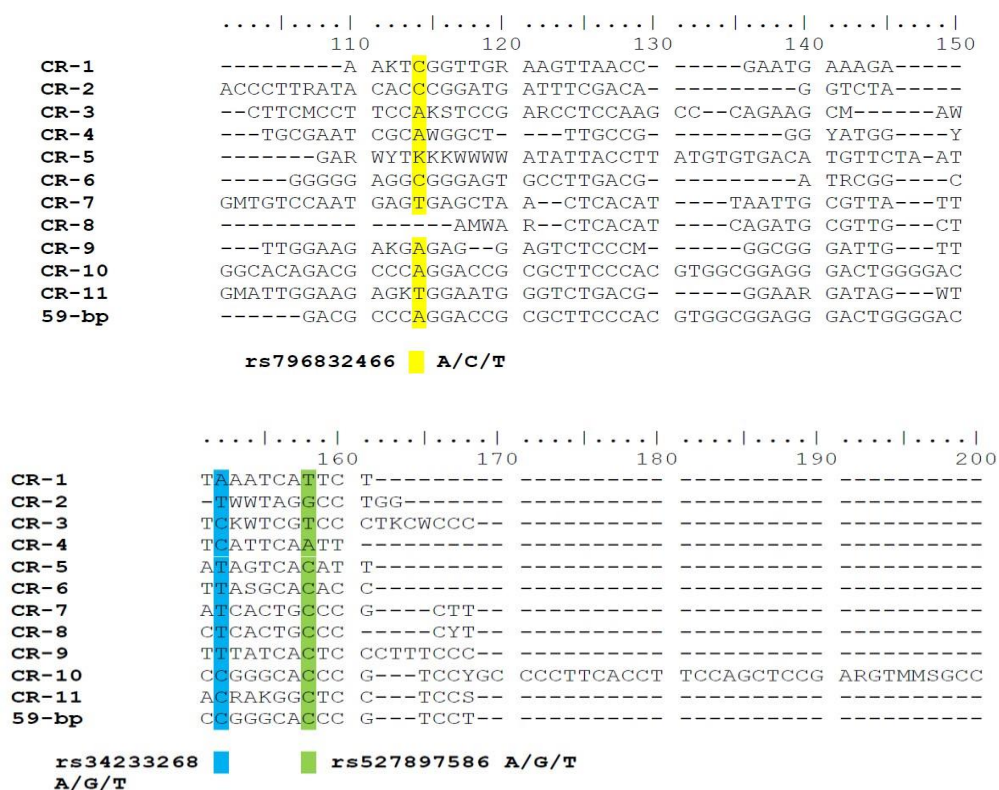


Figura 10: Variantes do gene hTERT, obtidas através do sequenciamento das amostras

Até o momento, as variantes rs796832466 e rs527897586 não possuem nenhum relato na literatura que as associe ao câncer, o que as tornam novas mutações identificadas no gene promotor da telomerase humana nessa população e aponta para uma potencial correlação com câncer colorretal.

Já a variante rs34233268, foi citada no estudo de Starita et al. (57), como uma possível variante do gene *hTERT* relacionada a neoplasia conjuntiva ligado ao vírus da imunodeficiência humana, contudo o autor informa nesse mesmo estudo que essa relação não possui uma significância na frequência da patologia, sugerindo então, que novos estudos sejam realizados para se compreender melhor essa associação.

O estudo realizado apresentou algumas limitações importantes. Apesar de o câncer colorretal ser uma das principais neoplasias que mais acometem os indivíduos, o número de pacientes envolvidos no estudo foi inferior que o estimado, dificultando assim, a descrição dos fenômenos que possivelmente seriam significativos se o número amostral fosse maior.

As poucas informações clínicas descritas nos prontuários dos pacientes, também pode-se considerar um fator limitante no estudo, bem como os problemas técnicos decorrentes da abordagem metodológica utilizada (sequenciamento de fragmento muito curto).

5 CONCLUSÃO

Para se determinar prognóstico dos pacientes com neoplasias colorretais é importante a busca por informações que reflitam características moleculares da lesão, assim como aquelas relacionadas às condições pessoais e fatores clínicos. Nosso estudo caracterizou o grupo estudado quanto a alguns desses fatores, embora não tenha descrito nenhum deles como de relevância prognóstica direta. Por outro lado, foram encontrados três polimorfismos de um único nucleotídeo (rs796832466, rs34233268 e rs527897586) na região estudada. Considerando a presença destes em amostra tão pequena, espera-se alta prevalência das variantes gênicas, de modo que é possível que tais polimorfismos tenham associação com a patologia em questão, apresentando-se como potenciais marcadores prognósticos ou mesmo fatores de risco, a ser confirmado em estudos posteriores com maior amostragem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1). NHI – National Cancer Institute. **WhatisCancer?** 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 22 out. 2018.
- (2). ONCOGUIA, Instituto. **O que é câncer?** 2017. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer>>. Acesso em: 22 out. 2018.
- (3). Instituto Nacional de Câncer (Brasil). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: Inca, 2011.
- (4). UK, CancerResearch. **WhatisCancer?** 2017. Disponível em: <<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-canspread>>. Acesso em: 22 out. 2018.
- (5). INCA. **Câncer. O que é?** 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/>>. Acesso em: 22 out. 2018.
- (6). INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro, 2017.
- (7). ALMEIDA, F.G.O. **Análise proteômica e epigenética de pacientes com câncer colorretal do estado do Amazonas**. 2017. 152 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.
- (8). SILVA, M.; ERRANTE, P.R. Câncer colorretal: fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **Revista Unilus Ensino e Pesquisa**, São Paulo, v. 13, n. 33, p.133-140, out. 2016.
- (9). COSSIOLO, D.C. et al. Polymorphism of the cox-2 gene and susceptibility to colon and rectal cancer. **Abcd. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, Londrina, v. 30, n. 2, p.114-117, jun. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-6720201700020008>
- (10). VALADAO, M.; CASTRO, L.S. Câncer colo-retal hereditário. *Rev. Col. Bras. Cir.* [online]. 2007, vol.34, n.3, pp.193-200.
- (11). TOGNETTO, A. et al. A Systematic Review on the Existing Screening Pathways for Lynch Syndrome Identification. **Frontiers In Public Health**, Roma, v. 5, n. 243, p.1-7, set. 2017.

- (12). PINHO, M.S.L; ROSSI, B.M. As Proteínas Envolvidas na Carcinogênese Colorretal (IV). **Rev. Bras. Coloproct.** 1998, 18 (4): 278-282.
- (13). VALADÃO, Marcus et al. Câncer colo-retal hereditário. **Rev. Col. Bras. Cir**, São Paulo, v. 34, n. 3, p.193-200, jun. 2007.
- (14). ARRUDA, J.T. et al. Proteína P53 e o Câncer: Controvérsias e Esperanças. **Estudos**, Goiânia, v. 35, n. 2, p.123-141, fev. 2008.
- (15). NUTRIGENÉTICA, Telomero. Telômeros e a telomerase. 2015. Disponível em <<http://www.telomero.com.br/secao/nutrigenetica/oprocessoenvelhecimento/874/telomeros-e-a-telomerase>>. Acesso em: 20 maio 2017.
- (16). VIDAURRETA, M. et al. Telomerase activity in colorectal cancer, prognostic factor and implications in the microsatellite instability pathway. **World Journal Of Gastroenterology**. Madri, p. 3868-3872. jul. 2007.
- (17). PIMENTA, V.S.C. P53 E O CÂNCER: REVISÃO DA LITERATURA. 2012. 33 f. Tese (Doutorado) - Curso de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Goiás, Goiás, 2012.
- (18). RENAUD, S et al. KRAS and BRAF mutations are prognostic biomarkers in patients under going lung metastasectomy of colorectal cancer. **British Journal Of Cancer**. França, p. 720-728. fev. 2015.
- (19). KOELZER, Viktor H et al. Heterogeneity analysis of Metastasis Associated in Colon Cancer 1 (MACC1) for survival prognosis of colorectal cancer patients: a retrospective cohort study. **Bmc Cancer**, Alemanha, v. 15, n. 1, p.1-11, 21 mar. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1150-z>.
- (20). REZENDE, J.H.C. de et al. Carcinoembryonic antigen levels in the peripheral and mesenteric venous blood of patients with rectal carcinoma. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, p.264-269, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO).
- (21). CREPALDI-FILHO, René et al. Levels of carcinoembryonic antigen and CA 19-9 in the sera and peritoneal washing of patient under surgical treatment for gastric carcinoma. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 45, n. 3, p.219-224, set. 2008.
- (22). NAZATO, D.M. et al. Prognostic value of carcinoembryonic antigen distribution in tumor tissue of colorectal carcinoma. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.

- 46, n. 1, p.26-31, mar. 2009. FapUNIFESP (SciELO).
- (23). MORI, Yoshiko et al. The rare BRAF VK600-601E mutation as a possible indicator of poor prognosis in rectal carcinoma – a report of a case. **Bmc Medical Genetics**, Japão, v. 16, n. 1, p.1-4, 31 jan. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12881-015-0144-7>.
- (24). RENAUD, S et al. KRAS and BRAF mutations are prognostic biomarkers in patients under going lung metastasectomy of colorectal cancer. **British Journal Of Cancer**. França, p. 720-728. fev. 2015.
- (25). HAMMOND, D. E. et al. Differential Reprogramming of Isogenic Colorectal Cancer Cells by Distinct Activating KRAS Mutations. **Journal Of Proteome Reserach**, Liverpool, v. 14, n. 6, p.1535-1546, jan. 2015.
- (26). SINGH, A. et al. TAK1 (MAP3K7) inhibition promotes poptosis in KRAS dependent colon cancers. **Nih Public Access**: Author Manuscript, Boston, v. 148, n. 4, p.1-24, ago. 2012.
- (27). PARSONS, H.A. Telômeros, telomerase e câncer. **Revista Farmacêutica de Ciências Médicas**, Sorocaba, v. 5, n. 1, p.54-59, jan. 2003.
- (28). COLTRO, M. L. **Bem jurídico penal e pesquisa com células-tronco embrionárias**. 2007. Dissertação, Graduação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.
- (29). MISTELI, T. The longreach of telomeres. **Genes e Development**, Estados Unidos, v. 22, n. 28, p.2445-2446, nov. 2014.
- (30). HASHEMI, M. et al. Association between hTERT polymorphisms and the risk of breast cancer in a sample of Southeast Iranian population. **BmcResearch Notes**, Iran, v. 895, n. 7, p.1-8, jan. 2014.
- (31). SHADRINA, A. S. et al. TERT polymorphisms rs2853669 and rs7726159 influence on prostate cancer risk in Russian population. **Tumor Biology**, Russia, v. 2, n. 36, p.841-847, out. 2014.
- (32). XIE, Z. et al. Early Telomerase Inactivation Accelerates Aging Independently of Telomere Length. **HhsPublic Access**, Califórnia, v. 5, n. 106, p.928-939, fev. 2015.
- (33). ZOU, P. et al. The TERT rs2736100 Polymorphism and Cancer Risk: A Metaanalysis Basedon 25 Case-Control Studies. **BmcCancer**. China, p. 2-11. dez. 2012.

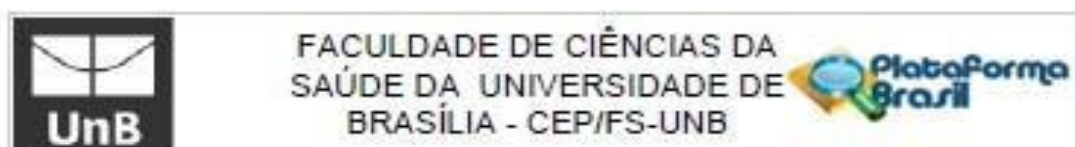
- (34). RAMUNAS, J. et al. Transient delivery of modified mRNA encoding TERT rapidly extends telomeres in human cells. **The FASEB Journal**. Califórnia, p. 1930-1939. maio 2015.
- (35). KILLEDAR, A. et al. A Common Cancer Risk-Associated Allele in the hTERT Locus Encodes a Dominant Negative Inhibitor of Telomerase. **PlosGenet**, Austrália, v. 6, n. 11, p.1-23, jun. 2015.
- (36). HE, X. et al. Research article Irradiation-induced telomerase activity and gastric cancer risk: a case-control analysis in a Chinese Hanpopulation. **BmcCancer**, China, v. 312, n. 10, p.1-9, jun. 2010.
- (37). RESENDE, T.F.A. **Caracterização dos telómeros como biomarcadores moleculares: implicações no estabelecimento da idade biológica**. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Universidade do Porto, mar, 2015.
- (38). PELLAT, A. J. et al. Telomere Length, Telomere-Related Genes, and Breast Cancer Risk: The Breast Cancer Health Disparities Study. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 52, n. 7, p. 595-609, 2013.
- (39). XIA, X. et al. MNS16A Tandem Repeats Minisatellite of Human Telomerase Gene and Cancer Risk: A Meta-Analysis. **PlosOne**, China, v. 8, n. 8, p.1-9, ago. 2013.
- (40). CHOI, B.J. et al. Influence of the hTERT rs2736100 polymorphism on telomere length in gastric cancer. **World Journal Of Gastroenterology**. Coreia, p. 9328-9336. ago. 2015.
- (41). LI, J. et al. The correlations between DNA methylation and polymorphisms in the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene with postoperative recurrence in patients with thyroid carcinoma (TC). **Journal Of Surgical Oncology**. China, p. 1-9. jan. 2017.
- (42). PANG, T. et al. TERT rs2736098 (Ex2-659G>A) polymorphism and cancer susceptibility: evidence from a comprehensive meta-analysis. **Oncotarget**, China, v. 8, n. 56, p.96433-96441, 2017.
- (43). **OZTAS**, E. et al. Association Between Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene Variations and Risk of Developing Breast Cancer. **Genetic Testing And Molecular Biomarkers**, Turquia, v. 20, n. 8, p.459-464, ago. 2016. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/gtmb.2015.0339>.

- (44). BERTORELLE, R. et al. Telomerase is an independent prognostic marker of overall survival in patients with colorectal cancer. **British Journal Of Cancer**, Padova, v. 2, n. 108, p.278-284, fev. 2013.
- (45). HOFER, P. et al. MNS16A tandem repeats minisatellite of human telomerase gene: a risk factor for colorectal cancer. **Carcinogenesis**, Áustria, v. 6, n. 32, p.866-871, mar. 2011.
- (46).CARKIC, J. et al. The role of TERT-CLPTM1L SNPs, hTERT expression and telomere length in the pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. **JournalOf Oral Science**, Montenegro, v. 58, n. 4, p.449-458, 2016. Nihon University School of Dentistry. <http://dx.doi.org/10.2334/josnusd.16-0108>.
- (47). WANG, K. et al. The prognostic significance of hTERT over expression in cancers: A systematic review and meta-analysis. **Medicine**, China, v. 94, n. 35, p.1-8, ago. 2018.
- (48). DRUMOND, C.A. et al. Câncer colorretal em pacientes com idade inferior a 30 anos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Belo Horizonte, v. 3, n. 23, p.147-154, jan. 2003.
- (49). RÊGO, A.G.S. et al. Câncer Colorretal em Pacientes Jovens. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Teresina, v. 2, n. 58, p.173-180, mar. 2012.
- (50). CAPELHUCHNIK, P. et al. SINAIS E SINTOMAS DO CÂNCER COLORRETAL E DIAGNÓSTICO PRECOCE. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, São Paulo, v. 4, n. 11, p.125-127, dez. 1991.
- (51). BATISTA, R.R. et al. Indications of colonoscopy versus polyps and colorectal neoplasms finding. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, São Paulo, v. 31, n. 1, p.64-70, mar. 2011.
- (52). MENDONÇA C.F. et al. Manifestação Incomum do Câncer Colorretal - Relato de Caso. **Revista brasileira Coloproctologia**, 2008;28(1): 099-103.
- (53). IRAHARA, Natsumi et al. NRAS Mutations Are Rare in Colorectal Cancer. **Diagnostic Molecular Pathology**, Bonston, v. 3, n. 19, p.157-163, set. 2010.
- (54). Shahriari-ahmadi, A. et al. KRAS and NRAS Testing in Metastatic Colorectal Cancer in Central Iran (Tehran): A Review on Literature of the Middle East. **Journal Of Medical And Paediatric Oncology**. Índia, p. 210-214. mar. 2018.

- (55). MORAES S.P. et al. Valor da dosagem do antígeno carcinoembrionário, da fosfatase alcalina e da gama-glutamil transpeptidase no seguimento de pacientes com câncer de cólon e de reto. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 2003;23(3):163-167.
- (56). ABREU G. et al. Análise do valor prognóstico da dosagem sérica pré-operatória do antígeno carcinoembrionário (CEA) em pacientes com carcinoma colorretal. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, 2002; 22(2):82-87.
- (57). STARITA, Noemy et al. Telomerase promoter mutations in human immunodeficiency virus-related conjunctival neoplasia. **Journal Of Translational Medicine**, Itália, v. 16, n. 1, p.1-7, 21 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12967-018-1456-0>.
- (58). Ellisen L. W, **Molecular genetics of cancer**. 2015. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acpmedicine/6631/genetica_molecular_do_cancer.htm>. Acesso em: 17 dez. 2018.

ANEXOS

ANEXO A



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de marcadores moleculares associados à resposta de pacientes oncológicos à quimioterapia para uso em terapêutica racional em saúde pública

Pesquisador: Diêgo Madureira de Oliveira

Área Temática: Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 4

CAAE: 30711114.3.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde - FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Patrocinador Principal: Departamento de Ciência e Tecnologia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 975.592

Data da Relatoria: 03/02/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo Edital FAPDF 03/2014 Programa Pesquisa para o SUS: Gestão Compartilhada em Saúde PPSUS-DF dividido em duas etapas com perspectiva de amostra de 1000 participantes. A primeira retrospectiva, com coleta de informações a partir de prontuários médicos e análise molecular de material fixado e preservado em parafina; a segunda prospectiva, com concomitante coleta de dados clínicos e material biológico para análise molecular e composição de biorrepositório. Esquemáticamente, as análises serão feitas com o objetivo de cruzar dados clínicos com resultados dos testes moleculares para buscar preditores confiáveis. Espera-se o desenvolvimento de modelos matemáticos de correlação direta, ou de associação de variáveis para composição de modelo de predição. Para tal, a coleta de dados clínicos será efetuada por meio de transferência de informações de prontuário médico para formulários especificamente desenvolvidos para cada tipo de suspeita diagnóstica, uma vez que o desfecho mais relevante é a resposta ao tratamento, que muda de acordo com o tipo de neoplasia. Algumas variáveis, no entanto, como as genéricas idade e sexo, precocidade do diagnóstico ou estadiamento/graduação da lesão neoplásica, constarão em todos os formulários, o que permitirá análises comparativas com

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (81)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 975.592

populações maiores e mais significativas para esses critérios. Todas as informações coletadas integrarão um banco de dados associado ao biorrepositório. No banco de dados, constarão informações acerca dos polimorfismos e positividade para os marcadores moleculares do estudo. O banco receberá tratamento estatístico adequado, com valores expressos como média e erro médio padrão, mediana e percentil, ou proporção. A escolha da medida de tendência central e das medidas de dispersão será feita de acordo com a finalidade da análise e a distribuição dos dados em um histograma de frequência. A distribuição será considerada normal se satisfizer as seguintes condições: Apresentar assimetria no intervalo entre -1 e +1 e curtose no intervalo entre -2 e +2; e considerada não normal se satisfizer as seguintes condições: Não passar em qualquer dos testes de normalidade executados ou apresentar assimetria ou curtose fora dos intervalos citados. Para conjuntos de dados representados por média (portanto, com distribuição normal), testes estatísticos paramétricos serão usados nas comparações entre grupos, enquanto

testes não paramétricos serão usados para aqueles representados por mediana (com distribuição não normal). Para comparação de proporções o teste usado será o X² e a análise direta de diferença de prevalência entre grupos. O teste usado para cada análise será especificado na apresentação dos resultados. Ao final da análise, espera-se a identificação de marcadores clinicamente úteis para a resposta à terapia de pelo menos um antineoplásico, com determinação de especificidade, sensibilidade, valores preditivos e aplicabilidade. Orçamento R\$ 236.200,00.

Objetivo da Pesquisa:

Descrito pelos pesquisadores:

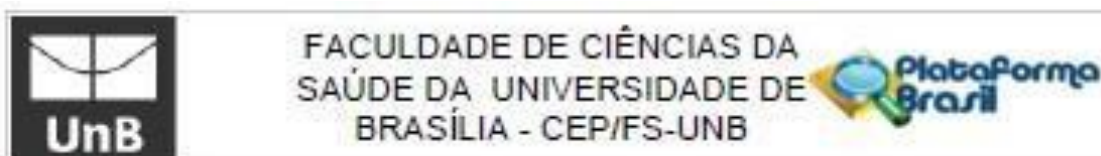
"Objetivo Geral: Validar o uso de biomarcadores associados à resposta à quimioterapia para aperfeiçoar as condutas terapêuticas em oncologia.

Objetivos Específicos:

a) Validar o uso do padrão de metilação do promotor do gene da MGMT como biomarcador de susceptibilidade à Temozolomida para guiar a conduta terapêutica em casos de glioma; b) Investigar a associação de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de drogas e a resposta ao tratamento com quimioterápicos para identificação de marcadores de susceptibilidade clinicamente úteis; c) Investigar a associação de polimorfismos em genes relacionados à tumorigênese e o prognóstico dos pacientes para identificação de marcadores diagnósticos clinicamente úteis; d) Criação e manutenção de banco de DNA para estudos de polimorfismo em oncologia baseados em população local; e) Disponibilização das técnicas validadas no estudo para utilização nas redes de atenção à saúde do Distrito Federal; f) Formação de recursos humanos na área."

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61) 3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 975.592

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos pelos pesquisadores:

Riscos: As metodologias empregadas não oferecem risco à integridade emocional, psicológica ou socioeconômica dos indivíduos voluntários do estudo. O risco à integridade física é mínimo, e é inerente ao processo de coleta de amostra de sangue periférico (principalmente desconforto). A coleta será efetuada por profissional de saúde treinado e experiente, e quando for o caso, será aproveitado o momento de coleta de sangue para exames diagnósticos, evitando a duplicidade do procedimento.

Benefícios: Individual: Informações adicionais ao diagnóstico que poderão ser úteis na escolha da conduta terapêutica. Tais informações serão oriundas de exames moleculares inacessíveis de outra

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda do projeto original cujas modificações seguem elencadas em documento anexo à Plataforma:

- I- Inclusão de membro colaborador, João Nunes de Matos Neto.
- II- Inclusão de nova instituição coparticipante, CETTRO – Centro de Tratamento Oncológico LTDA.
- III- Menção à nova instituição coparticipante na metodologia (coleta de dados)
- IV- Adição de termo de concordância assinado por representante legal da nova instituição coparticipante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados para apreciação de emenda a projeto:

Informações Básicas do Projeto - "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_449842_E1.pdf", postado em 16/12/2014;

"Encaminhamento de emenda.pdf", postado em 16/12/2014;

"Termo de concordância da nova instituição coparticipante.jpg", postado em 16/12/2014;5

"Lattes Joao Nunes.pdf", postado em 16/12/2014.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de inclusão de instituição coparticipante, Cettro – Centro de Tratamento

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-600
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfurb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 975.592

Oncológico LTDA, e de seu chefe João Nunes de Matos Neto.

Protocolo de pesquisa em conformidade com a Res. CNS 466/2012 e complementares.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em acordo com a Resolução 466/12 CNS, Itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa inicial.

BRASILIA, 06 de Março de 2015

Assinado por:
Marta Togashi
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-600

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

ANEXO B

*Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE*

O(A) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto "Estudo de marcadores moleculares associados a resposta de pacientes oncológicos a quimioterapia para uso em terapêutica racional em saúde pública". O presente documento contém informações importantes sobre o estudo, caso não se sinta esclarecido(a), ou tenha qualquer dúvida durante a leitura, poderá solicitar explicações adicionais.

Resumidamente, trata-se de um estudo científico que visa desenvolver novos testes de laboratório para ajudar na escolha do melhor medicamento a ser usado em pacientes com câncer. Para isso, serão estudadas amostras de DNA extraído a partir de sangue coletado dos voluntários, assim como os dados de evolução clínica registrados em prontuário médico referentes a resposta aos tratamentos aplicados.

Ao aceitar participar do estudo, o único desconforto ao qual será submetido é a coleta de sangue por punção de veia periférica, procedimento que envolve baixo risco, mas moderado grau de desconforto físico. Assim, ao assinar este termo, o(a) Senhor(a) autorizará a coleta de 4 mL de sangue, que será feita por profissional qualificado, em ambiente adequado e com material estéril e descartável, a fim de minimizar qualquer risco de dano físico, além do acesso da equipe de pesquisadores aos dados no seu prontuário médico. O acesso aos resultados obtidos com o estudo, bem como informações e orientações que possam resultar em reavaliação de conduta terapêutica, aconselhamento genético ou qualquer outro benefício direto, é garantido a todos os participantes.

O(A) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa, poderá fazer contato com a equipe caso precise de assistência em relação aos procedimentos utilizados no estudo, ou sempre que julgar necessário, e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a participar do estudo, ou desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração, assim como não haverá também despesa de qualquer natureza.

É garantido o seu direito de reivindicar indenização diante de eventuais danos decorrentes da participação no estudo.

O sangue coletado, após processado, irá compor biorrepositório (será armazenado para fins de pesquisa), e poderá ser usado futuramente para estudos de polimerfismo (a exemplo do descrito neste documento), em conjunto com as informações clínicas obtidas por meio de análise de prontuário médico. Não faz parte da metodologia do estudo o rastreamento do indivíduo doador do material e das informações.

Para solicitar qualquer informação a respeito da pesquisa, deve-se fazer contato com o responsável pelo estudo, professor Diégo Madureira de Oliveira, através do e-mail dmadureira@unb.br, pelo telefone institucional (61) 3107 1998, ou no endereço "FCE – Faculdade de Ceilândia - Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Universidade de Brasília, CEP: 72220-900". O projeto foi aprovado pelo CEP/FS-UnB (Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília - Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília - DF, telefone (061) 3107-1947 e-mail: cepfs@unb.br). Esse TCLE está em duas vias (uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o(a) Senhor(a), o sujeito da pesquisa) e foi elaborado segundo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) N° 466, de 12 de dezembro de 2012, especialmente em seu item IV.3, cujas exigências o responsável pelo projeto compromete-se a seguir; e a luz da Resolução CNS N° 441 de 12 de maio de 2011 para composição de biorrepositório.

Nome / assinatura

Pesquisador Responsável
Nome e assinatura

Brasília, ___ de _____ de _____

ANEXO C

Desenho e análise de oligonucleotídeos

Utilizou-se a seguinte sequência: >AF098956.1 Homo sapiens telomerase reverse transcriptase (TERT) gene, promoter region and partial cds

651	CTGGAGGGGA	CCAGTGGCCG	TGTGGCTTCT	ACTGCTGGGC	TGGAAGTCGG
701	GCCTCCTAGC	TCTGCAGTCC	GAGGCTTGGG	GCCAGGTGCC	TGGACCCCGA
751	GGCTGCCCTC	CACCCTGTGC	GGGCGGGATG	TGACCAGATG	TTGGCCTCAT
801	CTGCCAGACA	GAGTGCCGGG	GCCCAGGGTC	AAGGCCGTTG	TGGCTGGTGT
851	GAGGCGCCCG	GTGCGCGGCC	AGCAGGAGCG	CCTGGCTCCA	TTTCCCACCC
901	TTTCTCGACG	GGACCGCCCC	GGTGGGTGAT	TAACAGATTT	GGGGTGGTTT
951	GTCATGTTG	GGGACCCCTC	GCCGCTGAG	AACCTGCAAA	GAGAAATGAC
1001	GGCCTGTGT	CAAGGAGCCC	AAGTCGCGGG	GAAGTGTTC	AGGGAGGCAC
1051	TCCGGGAGGT	CCCGCGTGCC	CGTCCAGGGA	GCAATGCGTC	CTCGGGTTCG
1101	TCCCCAGCCG	CGTCTACGCG	CCTCCGTCCT	CCCCTTCACG	TCCGGCATTG
1151	GTGGTGCCCG	GAGCCCAGCG	CCCCGCGTCC	GGACCTGGAG	GCAGCCCTGG
1201	GTCTCCGGAT	CAGGCCAGCG	GCCAAAGGGT	CGCCGCACGC	ACCTGTTCCT
1251	AGGGCCTCCA	CATCATGGCC	CCTCCCTCGG	GTTACCCAC	AGCTTAGGCC
1301	GATTCGACCT	CTCTCCGCTG	GGGCCCTCGC	TGGCGTCCCT	GCACCTGGGG
1351	AGCGCGAGCG	GCGCGCGGGC	GGGAAGCGC	GGCCAGACC	CCCGGGTCCG
1401	CCCGGAGCAG	CTGCGCTGTC	GGGCCAGGC	CGGGCTCCA	GTGGATTTCG
1451	GGCACAGAC	GCCAGGACC	GCGCTTCCA	CGTGGCGGAG	GGACTGGGGA
1501	CCCGGGCACC	CGTCCTGCCC	CTTACCTTC	CAGCTCCGCC	TCCTCCGCGC
1551	GGACCCCGCC	CCGTCCGAC	CCCTCCGGG	TCCCGGCC	AGCCCTCC
1601	GGCCCTCCC	AGCCCTCCC	CTTCTTTCC	GCGGCCCGC	CCTCTCTCG
1651	CGGCGCAGT	TTCAGGCAGC	GCTGCGTCT	GCTGCGCAG	TGGGAAGCCC
1701	TGGCCCGGC	CACCCCGCG	ATGCCGCGC	CTCCCGCTG	CCGAGCCGTG
1751	CGTCCCTGC	TGCGCAGCCA	CTACCGCGAG	GTGCTGCCG	TGGCCACGTT
1801	CGTGGCGCGC	CTGGGGCCCC	AGGGCTGGCG	GCTGGTGCAG	CGCGGGGACC
1851	CGGCGGCTTT	CCGCGCGCTG	GTGGCCAGT	GCCTGGTGTG	CGTGCCCTGG
1901	GACGCACGGC	CGCCCCCGC	CGCCCCCTC	TTCCGCCAGG	TGGCCCTCCC
1951	CGGGTCCGGC	GTCCGGCTGG	GGTTGAGGGC	GGCCGGGGG	AACCAGCGAC
2001	ATGCGGAGAG	CAGCGCAGGC	GACTCAGGGC	GTTCCCCCG	CAG

Em verde: The 59-bp region responsible for the full promoter activity (Horikawa et al., 1999).

Pair 1:						
<input checked="" type="checkbox"/>	Left Primer 1:	AF098956.1 Homo sapiens telomerase rever:				
Sequence:	GCCTGAGAACCTGCAAAGAG					
Start: 974	Length: 20 bp	Tm: 60.1 °C	GC: 55.0 %	ANY: 4.0	SELF: 0.0	
<input checked="" type="checkbox"/>	Right Primer 1:	AF098956.1 Homo sapiens telomerase rever:				
Sequence:	CGGAGCTGGAAGGTGAAG					
Start: 1538	Length: 18 bp	Tm: 59.5 °C	GC: 61.1 %	ANY: 4.0	SELF: 0.0	
Product Size: 565 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 0.0				

Left Primer 1 (>phTERT_prom_1_f)

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		-1.4	50.4	-17.8	-55.02	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Right Primer 1 (>phTERT_prom_1_r)

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		0.16	22	-15.6	-52.86	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		0.73	9.5	-13.3	-47.05	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det




Pair 2:

<input type="checkbox"/> Left Primer 2:	AF098956.1 Homo sapiens telomerase revers:				
Sequence:	CGGGTTACCCACAGCTTAG				
Start: 1278	Length: 20 bp	T_m : 61.8 $^{\circ}\text{C}$	GC: 60.0 %	ANY: 7.0	SELF: 3.0
<input type="checkbox"/> Right Primer 2:	AF098956.1 Homo sapiens telomerase revers:				
Sequence:	CAGCGCTGCCTGAAACTC				
Start: 1674	Length: 18 bp	T_m : 60.9 $^{\circ}\text{C}$	GC: 61.1 %	ANY: 8.0	SELF: 1.0
Product Size: 397 bp	Pair Any: 4.0	Pair End: 2.0			

Left Primer 2 (>phTERT_prom_2_f)

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		-1.98	47.3	-28.4	-88.62	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Right Primer 2 (>phTERT_prom_2_r)

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		-0.23	28.3	-20.9	-69.33	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		0.39	18	-16.1	-55.31	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
3		0.71	11.2	-14.7	-51.69	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Pair 3:

<input type="checkbox"/> Left Primer 3:	AF098956.1 Homo sapiens telomerase revers:				
Sequence:	GGCCGATTCGACCTCTCTC				
Start: 1297	Length: 19 bp	T_m : 62.2 $^{\circ}\text{C}$	GC: 63.2 %	ANY: 7.0	SELF: 0.0
<input type="checkbox"/> Right Primer 3:	AF098956.1 Homo sapiens telomerase revers:				
Sequence:	CGGAGCTGGAAGGTGAAG				
Start: 1538	Length: 18 bp	T_m : 59.5 $^{\circ}\text{C}$	GC: 61.1 %	ANY: 4.0	SELF: 0.0
Product Size: 242 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 3.0			

Left Primer 3 (>phTERT_prom_3_f)

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		-0.11	26.9	-17.1	-56.98	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		0.78	11.2	-16	-56.27	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Right Primer 3 (>phTERT_prom_3_r)

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		0.16	22	-15.6	-52.86	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		0.73	9.5	-13.3	-47.05	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Pair 4:

<input type="checkbox"/> Left Primer 4:	AF098956.1 Homo sapiens telomerase rever:				
Sequence:	CCACAGCTTAGGCCGATTC				
Start: 1287	Length: 19 bp	T_m : 60.8 °C	GC: 57.9 %	ANY: 4.0	SELF: 3.0
<input type="checkbox"/> Right Primer 4:	AF098956.1 Homo sapiens telomerase rever:				
Sequence:	CAGCGCTGCCTGAACTC				
Start: 1674	Length: 18 bp	T_m : 60.9 °C	GC: 61.1 %	ANY: 8.0	SELF: 1.0
Product Size: 388 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 1.0			

Left Primer 4 (>phTERT_prom_4_f)

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		-0.7	34.9	-22	-71.43	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det

Right Primer 4 (>phTERT_prom_4_r)

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m (°C)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		-0.23	28.3	-20.9	-69.33	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
2		0.39	18	-16.1	-55.31	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det
3		0.71	11.2	-14.7	-51.69	<input type="checkbox"/> Ct <input type="checkbox"/> Det


Pair 5:

<input type="checkbox"/> Left Primer 5:	AF098956.1 Homo sapiens telomerase rever:				
Sequence:	GCCGATTGACCTCTCTC				
Start: 1298	Length: 18 bp	T_m : 58.4 °C	GC: 61.1 %	ANY: 5.0	SELF: 0.0
<input type="checkbox"/> Right Primer 5:	AF098956.1 Homo sapiens telomerase rever:				
Sequence:	CGGAGCTGGAAGGTGAAG				
Start: 1538	Length: 18 bp	T_m : 59.5 °C	GC: 61.1 %	ANY: 4.0	SELF: 0.0
Product Size: 241 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 3.0			

Left Primer 5 (>phTERT_prom_5_f)

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		-0.11	26.9	-17.1	-56.98	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>

Right Primer 5 (>phTERT_prom_5_r)

Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H(\text{kcal.mole}^{-1})$	$\Delta S(\text{cal.K}^{-1}\text{mole}^{-1})$	Output
1		0.16	22	-15.6	-52.86	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>
2		0.73	9.5	-13.3	-47.05	<input type="button" value="Ct"/> <input type="button" value="Det"/>