

Maria Inês Freitas Pratas

marcadores de neoplasia e de infeção por  
vírus JC em Cólon Humano

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor Doutor  
Luís Manuel da Costa Marques de Almeida e pelo Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro, 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Trabalho realizado no:  
Serviço de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da  
Universidade de Coimbra  
Instituto Biomédico de Investigação da Luz e Imagem da Faculdade de Medicina  
da Universidade de Coimbra  
Serviço de Cirurgia do Hospital do Centro Hospitalar e Universitário de  
Coimbra  
Serviço de Gastrenterologia do Hospital do Centro Hospitalar e Universitário de  
Coimbra  
Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de  
Coimbra



## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Luís Manuel da Costa Marques de Almeida, pela forma como me recebeu no Serviço, pela disponibilização de meios para a realização deste trabalho, pela orientação, motivação e apoio incondicional ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Manuel Costa Almeida, ao Dr. Carlos Eduardo Costa Almeida e ao Professor Doutor Pedro Figueiredo do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), pela disponibilidade constante e imprescindível colaboração para a colheita de material biológico essencial para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador, pela orientação e disponibilidade ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Manuela Grazina pela disponibilização de meios técnicos que possibilitaram a realização deste trabalho.

À mestre Rita Gaspar pelo apoio incondicional, pela colaboração e pelas importantes sugestões e opiniões durante o desenvolvimento deste trabalho.

A toda a equipa do Serviço de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra por toda a amizade e apoio.

Às minhas mãe e irmã, pelo apoio incondicional ao longo destes anos para que conseguisse cumprir todos os meus sonhos.

Ao Rui e a todos os meus amigos por toda a amizade, apoio e motivação para nunca desistir dos meus objetivos.



# Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>1</b>
<b>I – Introdução .....</b>	<b>5</b>
<b>1 – O intestino grosso – Anatomia e Fisiologia .....</b>	<b>7</b>
<b>2 – O cancro colo-retal .....</b>	<b>11</b>
2.1. – Epidemiologia .....	11
2.2. – Manifestações clínicas do cancro colo-retal .....	12
2.3. – Patogénese .....	13
2.4. – Caraterísticas anátomo.patológicas.....	15
2.4.1. – Pólipos .....	15
2.4.1.1. – Pólipos hiperplásicos .....	16
2.4.1.2. – Adenomas .....	17
2.4.1.3. – Adenocarcinomas .....	20
2.5. – Sequência adenoma-carcinoma .....	21
<b>3 – O poliomavírus neurotrópico humano JC .....</b>	<b>23</b>
3.1. – Epidemiologia .....	23
3.2. – Morfologia .....	27
3.3. – Ciclo de vida .....	30
3.4. – Latência e reativação .....	34
<b>4 – Dados experimentais que estabelecem uma ligação entre o JCV e o CCR.....</b>	<b>36</b>
<b>5 – Caraterização da p53.....</b>	<b>37</b>
<b>II – Objetivos.....</b>	<b>41</b>
<b>III – Material e Métodos .....</b>	<b>45</b>
<b>1 – Colheita do material biológico.....</b>	<b>47</b>
<b>2 – Métodos experimentais para a deteção da presença do JCV.....</b>	<b>49</b>
2.1. – Extração de DNA total por fenol/clorofórmio.....	49
2.2. – NanoDrop.....	50
2.3. – Polymerase Chain Reaction ou PCR .....	51
2.4. – Electroforese em gel de agarose a 2%.....	53
2.4.1. – Preparação do gel de agarose a 2% .....	55
2.4.2. – Preparação das amostras.....	55
<b>3 – Métodos experimentais para a sequenciação de DNA.....</b>	<b>56</b>

3.1. – Polymerase Chain Reaction ou PCR .....	56
3.2. – Electroforese em gel de agarose a 2%.....	58
3.3. – Purificação dos produtos da PCR ... ..	58
3.4. – PCR de sequenciação.....	58
3.5. – Purificação dos produtos de sequenciação.....	58
3.6. – Sequenciação.....	59
<b>4 – Análise estatística.....</b>	<b>59</b>
<b>IV – Resultados e discussão.....</b>	<b>61</b>
<b>1 – Detecção de seqüências de DNA do vírus JC em amostras de biópsias colo- retais.....</b>	<b>63</b>
<b>2 – Detecção de polimorfismos na seqüência da p53 em amostras de biópsias colo- retais.....</b>	<b>68</b>
<b>V – Conclusões.....</b>	<b>73</b>
<b>VI – Referências bibliográficas.....</b>	<b>77</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1-</b> Esquema representativo do intestino grosso.....	10
<b>Figura 2-</b> Taxa de mortalidade por cancro colo-retal.....	12
<b>Figura 3-</b> Imagens de um pólipó sésil.....	15
<b>Figura 4-</b> Imagens de um pólipó pediculado, com um pedículo grande e largo.....	16
<b>Figura 5-</b> Imagem de um pólipó hiperplásico.....	17
<b>Figura 6-</b> Imagem de um adenoma plano.....	18
<b>Figura 7-</b> Imagens durante colonoscopias. A- Adenoma tubulo-viloso; B- Adenoma tubular; C- Adenoma viloso.....	18
<b>Figura 8-</b> Imagem de um adenocarcinoma.....	20
<b>Figura 9-</b> Imagem de um carcinoma do cólon, histologicamente diagnosticado como adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado. É de notar que á volta do carcinoma há um adenoma e um pólipó hiperplásico.....	20
<b>Figura 10-</b> Esquema ilustrativo dos múltiplos passos da carcinogénese colo-retal, com os quais o vírus JC pode interferir, quer de maneira irreversível ou transiente .....	22
<b>Figura 11-</b> Imagens durante colonoscopias com as diversas etapas da sequência criptas aberrantes-adenoma-carcinoma. Gene APC – <i>Adenomatous polyposis coli</i> ; ras – proteína codificada pelo gene RAS; DCC – <i>deleted in colon cancer</i> ; p53 – proteína citoplasmática de 53KDa.....	25
<b>Figura 12-</b> Imagens das três principais características histológicas da leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP) e do agente etiológico. A – Múltiplas áreas de desmielinização ou placas em tecido cerebral de um doente com LMP; B – Astrócitos reativos multinucleados semelhantes a células neoplásicas em lesões por LMP; C - Oligodendrócitos infetados pelo JCV residual; D – Partículas nucleares icosaédricas de JC de 45nm incluídas em oligodendrócitos (microscopia eletrónica) .....	25
<b>Figura 13-</b> Diagrama representativo dos dois principais mecanismos de infeção do JCV.....	26
<b>Figura 14-</b> Esquema do genoma do vírus JC. O esquema de representação mostra a estirpe Mad-1 do vírus JC, a zona precoce e a zona tardia, o Ag-T, o Ag-t, T'135, T'136 e T'165 (as três formas adicionais de <i>splicing</i> alternativo), Agno – agnoproteína, uma proteína tardia, ELP – proteína putativa líder iniciante, VP1, VP2 e VP3 – as três proteínas estruturais do vírus.....	27

<b>Figura 15-</b> Imagens de detecção imunohistoquímica do Ag-T em cancros humanos. A expressão do Ag-T é muito detetada nas células epiteliais neoplásicas de adenocarcinomas do cólon (E), e não nas amostras de cólon normal (F).....	28
<b>Figura 16-</b> Imagens de detecção imunohistoquímica da agnoproteína em cancros humanos: (A) em astrocitomas de baixo grau, (B) em tumores anaplásicos, (C) em glioblastomas multiformes e (D) em citoplasma de células epiteliais neoplásicas de adenocarcinomas do cólon. ....	29
<b>Figura 17-</b> Esquema ilustrativo do ciclo de vida do vírus JC. a. O ciclo de vida viral começa com a ligação aos recetores da superfície celular e é completado com a libertação do vírus pela célula hospedeira. b. Apesar de já ser conhecido que o JCV infeta uma variedade de células, a produção de descendência mais eficiente parece ocorrer nas oligodendrogliais, sob a ação determinante de múltiplos fatores nucleares.....	30
<b>Figura 18-</b> Esquema representativo das interações do Ag-T do vírus JC (JCV) com as vias de sinalização. pRb – proteína do retinoblastoma; E2F – fatores de transcrição; Ag-T – Antígeno T grande; IRS-1 – recetor do substrato de insulina de tipo 1; $\beta$ -cat - $\beta$ -catenina; CDK1 – Cinase dependente de ciclina de tipo 1; p53 – proteína citoplasmática de 53KDa; MDM2 – proteína inibidora da p53 de tipo 2 .....	33
<b>Figura 19-</b> Diagrama de um possível percurso para o movimento viral baseado nas observações do tropismo do JCV. Em imunossupressão, o JCV pode ser reativado e infeta os linfócitos B circulantes. Estas células podem passar a barreira hematoencefálica e infetar os oligodendrócitos, levando à desmielinização e à LMP.....	35
<b>Figura 20-</b> Imagem do aparelho de PCR (C1000) utilizado .....	53
<b>Figura 21-</b> Estrutura química do brometo de etídio ( $C_{21}H_{20}BrN_3$ ).....	54
<b>Figura 22-</b> Imagem do aparelho utilizado na sequenciação da p53.....	59
<b>Figura 23-</b> Frequências absolutas de amostras do grupo de estudo, quer na presença de sequência de DNA do vírus JC (JCV+), quer na ausência (JCV-), colhidas de adenocarcinoma e de mucosas adjacente e não adjacente a este .....	63
<b>Figura 24-</b> Frequências relativas de amostras de mucosa colo-retal do grupo-controlo, quer na presença do vírus JC (JC+) quer na sua ausência (JC-).....	65
<b>Figura 25-</b> Comparação entre as frequências absolutas de adenocarcinoma colo-retal (grupo de estudo) e de mucosa colo-retal (grupo-controlo), quer na presença (JCV+) quer na ausência (JCV-) do vírus JC.....	65

<b>Figura 26-</b> Comparação entre as frequências absolutas de mucosa colo-retal adjacente (grupo de estudo) e de mucosa colo-retal (grupo-controlo), quer na presença (JCV+) quer na ausência (JCV-) do vírus JC.....	65
<b>Figura 27-</b> Comparação entre as frequências absolutas de mucosa colo-retal não adjacente (grupo de estudo) ao adenocarcinoma e de mucosa colo-retal (grupo-controlo), quer na presença (JCV+) quer na ausência (JCV-) do vírus JC.....	66
<b>Figura 28-</b> Comparação entre as frequências absolutas de mucosa colo-retal adjacente e não adjacente ao adenocarcinoma, quer na presença (JC+) quer na ausência (JC-) do vírus JC.....	66

## Índice de Tabelas

<b>Tabela I-</b> Descrição da ação e principal função dos intervenientes na sequência criptas aberrantes-adenoma-carcinoma .....	23
<b>Tabela II-</b> Caraterização do grupo de estudo (GE) .....	47
<b>Tabela III-</b> Caraterização do grupo controlo .....	48
<b>Tabela IV-</b> Caraterização dos <i>primers</i> usados na deteção da presença ou ausência do vírus JC nas amostras de estudo.....	52
<b>Tabela V-</b> Caraterização dos <i>primers</i> usados na sequenciação da p53 nas amostras de estudo.....	57
<b>Tabela VI-</b> Frequências absolutas e relativas da presença de DNA do vírus JC em três tipos de amostras (adenocarcinoma, mucosa adjacente e não adjacente) dos indivíduos do grupo de estudo. ....	63
<b>Tabela VII-</b> Estimativa de “risco” e intervalos de confiança (IC95%) da presença de DNA do vírus JC em adenocarcinomas <i>versus</i> mucosas em indivíduos do grupo de estudo.....	64
<b>Tabela VIII-</b> Frequência absoluta e relativa da presença de DNA do virus JC em amostras de mucosa de indivíduos do grupo-controlo.....	64
<b>Tabela IX-</b> Frequências relativas da presença de DNA do JCV (JC+) e ausência (JC-) em amostras, adenocarcinoma, mucosa adjacente e não adjacente, de indivíduos do grupo de estudo e amostras de mucosa normal do grupo-controlo.....	67
<b>Tabela X-</b> Frequências absolutas e relativa de deteção de DNA do vírus JC nas amostras de adenocarcinoma em relação ao género e à idade.....	67
<b>Tabela XI-</b> Mutações encontradas na sequência da p53 em amostras humanas de adenocarcinoma, mucosa adjacente e não adjacente do grupo de estudo (GE) e em mucosa do grupo-controlo (GC).....	68
<b>Tabela XII-</b> Frequências relativa e absoluta da presença de pelo menos uma alteração na sequência da proteína p53, nos exões 1 – 9, em indivíduos do grupo de estudo.....	68
<b>Tabela XIII-</b> Frequências relativa e absoluta da presença de pelo menos uma alteração na sequência da proteína p53, nos exões 2 – 6, em indivíduos do grupo-controlo, com presença e ausência de DNA do vírus JC na mucosa normal.....	69

## Índice de abreviaturas

CCR – Cancro colo-retal  
JCV – Vírus JC  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
PCR – do inglês “*Polymerase chain reaction*”  
p53/TP53 – Proteína tumoral 53  
Na<sup>+</sup> – Ião sódio  
K<sup>+</sup> – Ião potássio  
ROS – Espécies reativas de oxigénio  
HNPCC – Cancro colo-retal hereditário não-polipose  
APC – do inglês “*Adenomatous polyposis coli*”  
PAF – Polipose adenomatosa familiar  
K-ras – do inglês “*Kirsten rat sarcoma*”  
Ag-T – Antígeno T grande  
Ag-t – Antígeno t pequeno  
DCC – do inglês “*Deleted in colon cancer*”  
hMMR – do inglês “*human DNA mismatch repair genes*”  
BKV – Vírus BK  
SV40 – Vírus Simiam 40  
LMP – Leucoencefalopatia multifocal progressiva  
SNC – Sistema nervoso central  
SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida  
IGF-1 – Fator de crescimento de insulina do tipo-1  
TCR – Região de controlo transcricional  
ELP – do inglês “*Putative early leader protein*”  
pRb – Proteína do retinoblastoma  
IRS-1 – Recetor de substrato da insulina 1  
JCV<sub>CY</sub> – Arquétipo do JCV  
HPV – do inglês “*Human Papillomavirus*”  
miRNA – do inglês “*short ribonucleic acid*”  
RNA – Ácido ribonucleico  
CDK1 – Cinase dependente de ciclina de tipo 1

$\beta$ -cat –  $\beta$ -catenina

BAX – proteína X associada à Bcl-2

Arg – Arginina

Pro – Prolina

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

ATPase – Adenina Trifosfatase

dNTP's – Desoxinucleótidos Trifosfato

dATP – Desoxiadenina Trifosfato

dTTP – Desoxitimina Trifosfato

dCTP – Desoxicitosina Trifosfato

dGTP – Desoxiguanina Trifosfato

Resumo / Abstract



## **Resumo**

**Introdução** - O cancro colo-retal (CCR) é o segundo tipo de cancro mais prevalente em Portugal, em ambos os sexos e o terceiro a nível mundial, apenas no sexo masculino. Julga-se que a infeção pelo poliomavírus humano JC (JCV) estimula o desenvolvimento tanto de CCR como de outros tipos de cancro. Esta infeção surge na infância, podendo persistir durante toda a vida do indivíduo. A medula óssea é um reservatório bastante importante do JCV e é o local mais provável da transformação neurotrópica deste (Tan *et al.*, 2009).

A expressão do genoma do JCV, em diversos ensaios com animais, resultou na indução de vários tumores. O antígeno-T (Ag-T) e a agnoproteína, proteínas virais, cooperam juntas para a oncogénese do JCV. A maioria dos adenocarcinomas do cólon expressa proteínas virais (Del Valle & Khalili, 2010).

As mutações no genoma da p53 são das alterações genéticas mais comuns no desenvolvimento do CCR (Iacopetta, 2003).

**Objetivos** - Estudar polimorfismos da p53 em CCR com JCV e tentar relacionar lesão e vírus.

**Material e métodos** - Em amostras de tecido fresco de CCR e de mucosa adjacente e não adjacente a este (n=66) (grupo de estudo) e de mucosa normal (n=21) (grupo controlo), avaliou-se a presença de sequências de DNA do JCV, pela técnica de *Nested*-PCR e estudaram-se polimorfismos da p53, pelas técnicas de PCR, purificação e sequenciação.

**Resultados e discussão** - A estimativa de um maior “risco” de sequências de DNA do JCV ocorre: em adenocarcinoma (RC=14.40; IC<sub>95%</sub>=3.286-63.11), em mucosa adjacente (RC=6.857; IC<sub>95%</sub>=1.265-6.481) e em mucosa não adjacente (RC=4.333; IC<sub>95%</sub>=1.155-16.25) *versus* mucosa normal (grupo-controlo); tendencialmente, em adenocarcinoma e em mucosas, adjacente e não adjacente, mais do que em mucosa normal.

**Conclusões** - Na mucosa colo-retal, a presença de JCV é a exceção em grupo-controlo e a regra em grupo com adenocarcinoma, parecendo haver tropismo do vírus JC por esta lesão. Ao confirmar-se a tendência para um maior número de mutações da p53 em adenocarcinoma e em mucosas, adjacente e não adjacente a esta lesão, as terapias génicas profiláticas, moduladoras e curativas podem ser muito importantes.

## **Abstract**

**Introduction** - The colorectal cancer (CRC) is the second most prevalent type of cancer in Portugal, in both sexes, and the third of the worldwide level, only in males. It is believed that infection with the human polyomavirus JC (JCV) stimulates the development of both CRC as well as other types of cancer. This infection appears in childhood and may persist throughout the life of the person. Bone marrow is a reservoir that is very important and the most likely location of the transformation of neurotropic JCV (Tan et al., 2009).

Expression of the genome of JCV, in various tests with animals, resulted in the induction of various tumors. The T-antigen (Ag-T) and the agnoprotein, are viral proteins, that cooperate together to oncogenesis of JCV. The majority of colon adenocarcinomas expresses viral proteins (Khalili & Del Valle, 2010).

Mutations in the genome of p53 are the most common genetic alterations in the development of CRC (Iacopetta, 2003).

**Objectives** - Study the p53 polymorphisms in CRC with JCV and try to connect the lesion and the virus.

**Materials and Methods** - In samples of fresh tissue of CRC and normal mucosa, adjacent and not adjacent to this lesion (n = 66) (study group) and normal mucosa (n = 21) (control group), evaluated the presence of JCV DNA sequences by nested PCR technique and were studied polymorphisms of p53 by PCR, purification and sequencing.

**Results and discussion** - The estimative of the biggest "risk" of DNA sequences of JCV occurs: in adenocarcinomas (OR=14.40; CI<sub>95%</sub>=3.286-63.11), in adjacent mucosa (OR=6.857; CI<sub>95%</sub>=1.265-6.481) and in non-adjacent mucosa (OR=4.333; CI<sub>95%</sub>=1.155-16.25) *versus* normal mucosa (control group); tendentially, in adenocarcinoma and mucosa, adjacent and non-adjacent, more than in normal mucosa (control group).

**Conclusions** - In the colorectal mucosa, the presence of JCV is the exception in the control-group and the rule in the group with adenocarcinoma, there seems tropism of JC virus by this lesion. By confirming the trend for an increased number of mutations in p53 adenocarcinoma and mucosa, adjacent and non-adjacent to this lesion, the prophylactic, modulators and curative gene therapies can be very important.

## **I. Introdução**



## **1. O intestino grosso – Anatomia e Fisiologia**

O intestino grosso, a parte terminal do tubo digestivo, segue-se ao íleo, do qual está separado pela válvula íleo-cecal e termina, ao nível do períneo, num orifício: o ânus.

O intestino grosso, composto por um tubo muscular, em forma dum canal cilíndrico cujo comprimento varia entre 1 e 1,70m e o diâmetro é de aproximadamente 7cm na porção inicial e de 2,5 a 3,5cm na porção terminal. Nele podemos distinguir três zonas: o cego, o cólon e o reto.

O cego é a porção inicial do intestino grosso, com 4 a 8cm de comprimento e 5 a 7cm de diâmetro, encontra-se na fossa ilíaca direita, tendo o formato de um enorme recesso apresentando um prolongamento atrofiado, com formato cilindroide com 8cm de comprimento: o apêndice vermicular. A junção íleo-cecal, parecendo estrangulada, liga o íleo ao segmento médio do cego.

O cólon constitui grande parte do intestino grosso, podendo medir entre 1,20 e 1,50m, subdivide-se em 4 segmentos: o ascendente, o transverso, o descendente e o sigmóide (McCann & Wise, 2008).

O cólon ascendente sucede-se ao cego, com 10 a 15cm de comprimento e um calibre médio de 6cm, dirigindo-se para cima até atingir a face inferior do lobo direito do fígado. A este nível, constitui o ângulo direito ou hepático do cólon.

Após formar o ângulo, dirige-se ligeiramente para cima, para trás e para a esquerda já como colón transverso, alcançando o baço, onde configura o ângulo esquerdo ou esplénico do cólon.

O cólon descendente, com 25 a 35cm de comprimento e 4 a 5cm de calibre, é constituído pela parte lombar (15 a 20cm) e pela parte ilíaca (10 a 15cm), tem início no ângulo esquerdo do cólon, seguindo um trajeto quase vertical, até encontrar a porção esquerda da pelve.

Na pelve, entre a porção terminal do cólon descendente e a face anterior da 3<sup>a</sup> vértebra sacrada, figura o cólon sigmóide, que tem um comprimento médio de 40cm e 3 a 5cm de calibre.

Sob o ponto de vista anátomo-fisiológico, o cólon é subdividido em duas partes: o cólon direito e o esquerdo.

O cólon direito, a porção do cólon vascularizada pela artéria mesentérica superior, sendo também denominado como cólon de estase, é constituído pelo cego, apêndice vermicular, cólon ascendente, ângulo direito do cólon e pelos dois terços direitos do cólon transversal (cerca de 25 a 50cm).

O cólon esquerdo, a porção do cólon vascularizada pela artéria mesentérica inferior, é subdividido em duas porções: a inicial e de passagem e a terminal ou de estase pré-defecatória. O cólon esquerdo é constituído pelo terço esquerdo do cólon transversal (12 a 25cm de comprimento e 4 a 5cm de calibre), pelo ângulo esquerdo, pelo cólon descendente e pelo sigmóide.

Sob o ponto de vista fisiológico, o cólon exibe dois tipos de funções: motoras e digestivas.

As funções motoras são caracterizadas pelos movimentos peristálticos, antiperistálticos, pendulares e rotatórios.

Os movimentos peristálticos são lentos e periódicos, prosseguem ao longo do cólon, através de anéis de contração, antecidos por uma onda de descontração, permitindo o avanço do conteúdo intestinal.

Os movimentos antiperistálticos encontram-se no cólon direito, onde se executam as funções de progressão e de reabsorção do conteúdo intestinal.

Os movimentos pendulares são oscilatórios, surgem isoladamente e destinam-se à mistura e ao contacto do conteúdo intestinal com as paredes.

Os movimentos rotatórios consistem numa onda peristáltica que, em vez de prosseguir num trajeto longitudinal, prossegue numa direção helicoidal.

As funções digestivas consistem na reabsorção hídrica (cólon direito e porção inicial do cólon esquerdo), alguma reabsorção lipídica e glucídica (cólon direito) e produção de muco lubrificador das fezes.

Após o cólon sigmóide, segue-se o reto, último segmento do intestino, com 12 a 15cm de comprimento e calibre variável, dependente do estado de repleção ou de vacuidade, que no períneo posterior, comunica com o exterior pelo ânus.

Sob o ponto de vista anatómico, o reto é dividido em duas partes, na parte pélvica, na ampola do reto (10 a 12cm de comprimento) e na parte perineal, o canal anal (2 a 3cm de comprimento). As duas partes do reto estão separadas por dois músculos elevadores do ânus, que regulam a abertura do canal anal.

Sob o ponto de vista fisiológico, o reto é um órgão reservatório, com um sistema de contenção formado pelos músculos elevadores do ânus e de expulsão.

A parede do intestino grosso é constituída por quatro túnicas: a mucosa, a submucosa, a muscular e a serosa.

A túnica mucosa tem uma coloração branco acinzentada e elevada espessura. Normalmente lisa, não apresenta pregas circulares nem vilosidades intestinais, tendo apenas na sua constituição nódulos linfáticos e os óstios das glândulas intestinais (Lieberkühn).

A túnica submucosa, subjacente à túnica mucosa, é constituída por tecido conjuntivo, onde se encontram rolos vasculo-nervosos.

A túnica muscular apresenta uma camada superficial constituída por fibras musculares longitudinais (as três ténias do cólon) e por uma camada profunda de fibras musculares circulares (Abraham, 2002).

A túnica serosa, a mais externa, é formada por tecido fibroelástico similar ao peritoneu, membrana que envolve os órgãos da cavidade abdominal.

Na superfície externa do intestino grosso sobressaem as ténias do cólon e os sulcos transversais, que condicionam as saculações do cólon.

As proeminências e depressões existentes na face externa são: as ténias e as ampolas e na face interna são as pregas, os sulcos transversais e as saculações.

Existem três tipos de pregas: na face externa as peritoneais e na face interna as transversais e as semilunares.

Na face externa do intestino grosso observam-se as pregas peritoneais, em dedo de luva, formando franjas, sendo denominadas como os apêndices omentais do cólon.

As ténias do cólon são feixes de fibras musculares, com 8 a 12cm de largura, que percorrem todo o intestino grosso, desde a origem até ao seu término.

As saculações do cólon encontram-se entre as ténias do cólon, sendo irregulares e separadas por sulcos transversais, os quais determinam proeminências na mucosa do intestino grosso.

Os apêndices omentais do cólon são prolongamentos peritoneais que, no seu conjunto têm aspeto de franjas preenchidas por tecido adiposo na continuidade do peritoneu, ao nível das saculações do cólon e dos sulcos que as separam.

Na superfície interna do intestino grosso, a mucosa apresenta, macroscopicamente, pregas e depressões que refletem a projeção dos sulcos e das saculações do cólon ao nível do lúmen intestinal. Ao nível da mucosa intestinal, a representação das ténias do cólon faz-se por três saliências longitudinais, lisas e finas, as quais estão unidas entre si por pregas transversais, as pregas semilunares do cólon.

Existem assim, ao mesmo nível, três pregas semilunares do cólon, que constituem uma elevação em anel, a qual está separada da que a antecede e da que se lhe segue por ampolas, em número de três por cada intervalo, as ampolas do cólon, e que correspondem, externamente, às saculações do cólon (Pina, 2010).

Funcionalmente, o intestino grosso é responsável por:

a) Atividades motoras – Receção do conteúdo, num estado semi-líquido, que advém do intestino delgado; progressão deste e acumulação das fezes, até à sua eliminação pelo organismo, através do ânus (reto);

b) Manutenção da homeostasia - Barreira biológica; reabsorção hidro-eletrolítica (como por exemplo os eletrólitos  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) através da atividade das enzimas fecais (cego); produção de muco lubrificador das fezes, segregado pelas glândulas intestinais, que se mistura com os resíduos sólidos e com muitas das bactérias presentes no canal, formando-se desta forma, a matéria fecal para posterior evacuação (cólon);

c) Síntese de vitaminas (como por exemplo K e B-12);

d) Conversão de pigmentos e ácidos biliares (Gaspar, 2010) (Phillips, 1984) [Phillips SF](#) ..

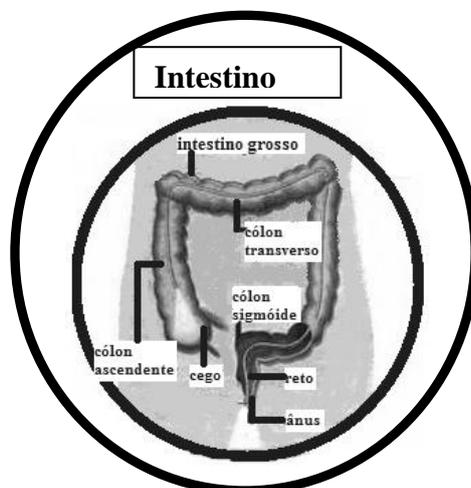


Figura 1 – Esquema representativo do intestino grosso. (Adaptado de Carvalho Vacas, 2008).

Todo o intestino, mas sobretudo o cólon, tem como já verificámos antes, uma flora rica em bactérias simbiotas podendo algumas delas, em certas circunstâncias, tornarem-se patogénicas. As bactérias patogénicas podem estar incluídas na flora normal e desenvolverem-se por seleção, nomeadamente após a administração de antimicrobianos

ou provir do meio exterior. Estas poderão estar envolvidas em várias patologias do cólon, como o cancro colo-retal (CCR).

Em 96 a 99% do cólon humano residem microrganismos anaeróbios estritos, como por exemplo das espécies: *Bacteroides* (bacilos gram -) (como o *Bacteroides fragilis*), *Fusobacterium* (bacilos gram -), lactobacilos anaeróbios, Clostrídium (bacilos gram +) (como o *Clostridium perfringens*) e cocos gram (+). Os restantes 1 a 4% dos microrganismos residentes no cólon humano são aeróbios facultativos.

Estas bactérias são de enorme relevância para o organismo, pois são fornecedoras de uma barreira física e biológica contra os agentes patogénicos, competindo com estes pelos mesmos recursos pois não podem coexistir, sobrepondo-se uma espécie à outra até à sua extinção. Este fenómeno é denominado de exclusão competitiva.

A carcinogénese intestinal pode ser um dos resultados de:

- Uma disbacteriose (desequilíbrio da flora intestinal) causada por stress, fome, presença de parasitas, uso de antibióticos, entre outros, na flora microbiana do cólon, com um aumento da proporção de bactérias cujo metabolismo produz compostos citotóxicos (por exemplo as bactérias sulfato redutoras);
- Bactérias que causam alterações no DNA;
- Produção de radicais livres (por exemplo espécies reativas de oxigénio ROS);
- Ativação anormal de células imunocompetentes (por exemplo os macrófagos) (Guarner, 2006).

## 2. O cancro colo-retal

### 2.1 Epidemiologia

Em todo o mundo, no ano de 2009, o CCR foi o segundo mais prevalente em cada sexo, do qual resultaram 608.000 mortes. Em toda a Europa, há cerca de 140.000 mulheres e 170.000 homens com CCR, 68.000 mulheres e 78.000 homens morrendo anualmente. Aproximadamente 60% dos casos de CCR ocorreram em países ocidentais, o que poderá pelo menos em parte ser explicado pela dieta destes países ser rica em

gorduras e proteína animal e pobre em fibra (Ferlay et al., 2001) (Markowitz & Bertagnolli, 2009).

Em Portugal, o CCR é o segundo tipo de cancro mais frequente a seguir ao cancro do pulmão, em ambos os sexos, seguido pelo cancro da próstata e da pele, nos homens, e pelo da mama e da pele, nas mulheres.

Nas últimas décadas, registou-se um aumento da mortalidade por CCR bastante significativo na ordem dos 80% entre 1980 e 1998, sendo que em 1998 registaram-se 2574 mortes por CCR. Nas estatísticas de 2003, em Portugal, detetaram-se cerca de 150.000 novos casos de cancro colo-rectal e 57.100 mortes, ou seja, 11% da mortalidade de todos os cancros. Alguns estudos estatísticos concluem que, por ano, surgem aproximadamente 6.400 novos casos de CCR e a taxa de mortalidade em Portugal situa-se nos 56% (na Europa 50%) (Figura 2) (Vacas, 2008) (Pontes et al., 2005).

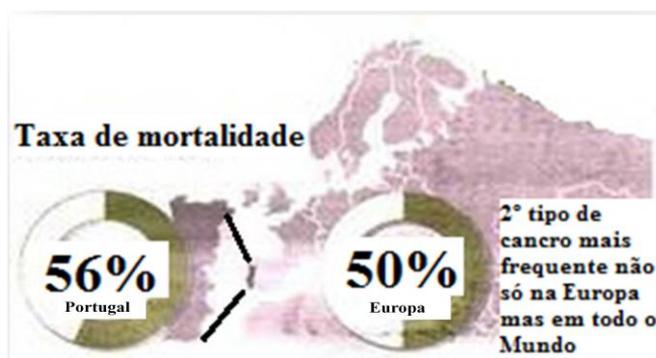


Figura 2 – Taxa de mortalidade por cancro colo-rectal (Adaptado de Carvalho Vacas, 2008).

## 2.2. Manifestações clínicas do cancro colo-rectal

O CCR é uma doença que pode ser considerada “silenciosa”, tendo uma evolução lenta, sendo que a manifestação clínica, por vezes só se torna visível num estado avançado do carcinoma. Este tipo de cancro pode demorar entre 6 a 8 anos a desenvolver-se. Por isso, é bastante importante a realização de exames regulares de rastreio e também saber quais são os principais sintomas.

Uma das características principais do CCR é a sua metastização, ou seja, quando o CCR se propaga para fora do cólon ou do reto, as células cancerosas atingem, várias vezes primeiramente os gânglios linfáticos vizinhos. Se as células cancerosas já tiverem

atingido estes gânglios, é provável que também se tenham metastizado para outros gânglios linfáticos ou mesmo para outros órgãos.

Em alguns casos, os pacientes não apresentam sintomas, mas quando os têm, de acordo com a Europacolón Portugal (Associação de Luta Contra o Cancro do Intestino), são frequentes:

- Hemorragia, que por vezes é microscópica, com ou sem anemia;
- Alterações dos hábitos intestinais, como diarreia, obstipação persistente, tenesmo (sensação de que o intestino não esvazia completamente) ou alternância entre uma condição e outra e/ou alteração da consistência e coloração (fezes muito escuras) das fezes, por períodos mais ou menos prolongados;
- Ou outros sintomas, tais como anorexia, perda de peso sem causa aparente, cólicas, edema, enfartamento e câibras, cansaço constante, náuseas e vômitos, febre e mal-estar geral ou desconforto abdominal generalizado (Hamilton & Aaltonen, 2000).

Na maioria das vezes, estes sintomas, não estão relacionados com o CCR, e podem ainda ser provocados por tumores benignos ou outros problemas. Só os devidos exames de diagnóstico, podem confirmar se é CCR ou não. Qualquer pessoa com estes sintomas deve consultar o seu médico, para posterior diagnóstico e tratamento.

### 2.3. Patogénese

O cancro forma-se através de uma proliferação anormal e descontrolada das células constituintes de um tecido. O CCR tem origem nas células epiteliais do cólon e/ou do reto. Este tipo de células, em condições biológicas normais, replicam-se a uma taxa, aproximadamente, de  $10^{10}$  novas células epiteliais/dia, levando deste modo a uma elevada vulnerabilidade do epitélio colo-retal a possíveis mutações e, naturalmente, à carcinogénese (Komarova, 2005).

Apesar disto, esta vulnerabilidade a mutações não se aplica ao intestino delgado, devido ao seu igualmente elevado *turnover* celular. Pode dizer-se então, que estas células do epitélio do cólon e do reto são propícias à acumulação de mutações em oncogenes e genes supressores de tumores, com consequências na proliferação de clones de células “anormais” e no crescimento neoplásico (Mak et al., 2004).

Vários fatores têm um papel muito importante ao nível da carcinogénese do cólon, agregando-se em três tipos, os fatores ambientais, os pessoais e familiares e os genéticos.

Pode assim concluir-se, que o desenvolvimento das diversas variantes de carcinogénese colo-retal vai estar dependente da contribuição relativa destes fatores principais, apesar de que a variante esporádica é proveniente, sobretudo, da exposição ambiental, o mesmo acontecendo no caso de outras neoplasias como é o caso do cancro do pulmão e do estômago (Yeatman, 2001).

Ainda não se sabe, exatamente, quais as causas que provocam o CCR, sendo que existem vários fatores e mecanismos de risco, que contribuem para o desenvolvimento do CCR, sendo estes:

- Fatores ambientais, tais como o alcoolismo, o tabagismo, o sedentarismo e a dieta alimentar, constituída quer por um excesso de gorduras, proteínas animais (tais como carnes vermelhas e derivados) ou calorias (tais como hidratos de carbono refinados) quer pelo baixo consumo de fibras, hortofrutícolas e cereais;
- Fatores pessoais e familiares, tais como idade, a probabilidade de ter CCR aumenta com a idade (mais de 90% com mais de 50anos), obesidade, história familiar de pólipos (especialmente com doença familiar em idade jovem), doença inflamatória intestinal (inflamação prolongada do cólon, exemplo doença de Crohn), presença de pólipos no intestino grosso (sequência adenoma-carcinoma) e antecedentes clínicos oncológicos (CCR anterior ou história de cancro do ovário, do útero ou da mama);
- Fatores genéticos que são de transmissão hereditária, tendo como exemplo os familiares de pessoas com cancro do cólon não-polipóide hereditário, tipo de cancro hereditário mais comum, que representa cerca de 2% de todos os casos de CCR (3 em 4 pessoas com alteração no gene HNPCC) ou com polipose adenomatosa familiar (PAF), menos 1% de todos os casos de CCR (alteração no gene específico APC).

Cerca de 80% de todos os casos existentes de CCR são de variante não-familiar, e são normalmente diagnosticados a partir dos 50 anos de idade (em média 64 anos). Os restantes 20% dos casos existentes são predominantemente de origem genética, de transmissão hereditária e com a sua manifestação mais precoce, sendo que os mais constantes são o cancro colo-retal não-polipóide hereditário (2 a 10%) e a PAF (<1%) (Petersen et al., 1999).

A PAF é uma doença hereditária rara de caráter autossômico dominante, caracterizada pelo desenvolvimento de pólipos adenomatosos no tubo digestivo, mas sobretudo no cólon e reto, que poderão degenerar em adenocarcinomas colo-retais (Campos et al., 2003).

A grande maioria das variantes de CCR localiza-se no cólon sigmóide e no reto, mas nos últimos anos tem aumentado a frequência de locais mais proximais (Hamilton & Aaltonen, 2000).

## 2.4. Caraterísticas anátomo-patológicas

### 2.4.1. Pólipos

Os pólipos intestinais são considerados, maioritariamente, como lesões salientes que crescem na parede da mucosa do cólon ou do reto; histologicamente, os pólipos intestinais são qualificados como não-neoplásicos ou neoplásicos; e morfologicamente, os pólipos podem ser pediculados (presença de um pedículo) ou sésseis (ausência de um pedículo) (Faias et al., 2004).

Os pólipos são na sua maioria tumores benignos, como por exemplo os adenomas, que não invadem os tecidos circundantes nem metastizam, devendo ser removidos por cirurgia durante a colonoscopia. Se não forem devidamente removidos, alguns pólipos poderão se tornar malignos, como por exemplo os adenocarcinomas, concluindo-se então que a deteção adequada e atempada remoção dos pólipos pode reduzir o risco de contrair CCR.

Os tumores malignos metastizam-se, principalmente para o fígado e pulmão, o que permite que estes sejam posteriormente, encontrados nos gânglios linfáticos vizinhos (Faias et al., 2004).

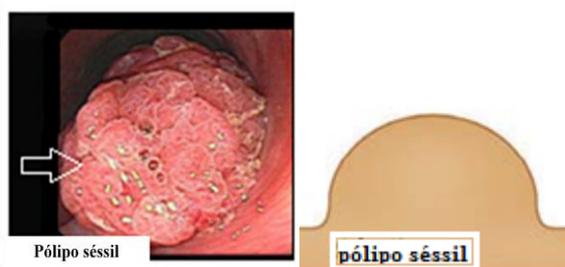


Figura 3 – Imagens de um pólipo séssil (Adaptado de [www.gastrointestinalatlas.com/English/Colon\\_and\\_Rectum/Polyps/polyps.html](http://www.gastrointestinalatlas.com/English/Colon_and_Rectum/Polyps/polyps.html)).



Figura 4 – Imagem de um pólipo pediculado, com um pedículo grande e largo (Adaptado de [www.gastrointestinalatlas.com/English/Colon\\_and\\_Rectum/Polyps/polyps.html](http://www.gastrointestinalatlas.com/English/Colon_and_Rectum/Polyps/polyps.html)).

Os pólipos não-neoplásicos podem desenvolver-se aquando da maturação anormal da mucosa, da inflamação ou de outras anomalias, e podem degenerar, pois na sua grande maioria não têm potencial de malignidade.

Neste tipo de pólipos estão inseridos os hiperplásicos, tem como característica um aumento anormal do número de células no tecido com conseqüente aumento da área do pólipo; os hamartomas, pólipos juvenis, mais comuns em crianças abaixo dos 10anos de idade; os inflamatórios ou pseudopólipos (pólipos falsos) pois não são pólipos verdadeiros, mas sim uma reação a uma inflamação crónica no cólon e os linfóides, lesões benignas que ocorrem em grupos de folículos linfóides que estão presentes no íleo terminal e reto, raros em crianças.

Os pólipos neoplásicos ou adenomatosos ou também chamados adenomas são lesões precursoras de carcinoma e são descritos por uma displasia proliferativa epitelial (Liu & Crawford, 2005).

#### **2.4.1.1. Pólipos hiperplásicos**

Os pólipos hiperplásicos são pólipos de tamanho pequeno, sem componente viloso, que se distinguem pelo seu formato de criptas serrilhadas, apresentando um epitélio proliferativo como base, tufos e células caliciformes amplificadas na parte superior e na superfície luminal, talvez devido à menor renovação celular das células epiteliais. Os núcleos na região serrilhada são pequenos, regulares, redondos e localizam-se na base das células adjacentes à membrana, que é engrossada por debaixo da superfície

das células epiteliais (Liu & Crawford, 2005). O citoplasma é formado por mucina, vacúolos salientes, sendo estes maiores do que as células caliciformes normais.

A zona proliferativa é caracterizada por uma grande atividade mitótica, que pode até levar a uma mistura com os adenomas (Hamilton & Aaltonen, 2000). A localização deste tipo de pólipos é mais usual em locais como o reto e o cólon sigmóide e tornam-se mais constantes com o aumento da idade (Tanaka, 2009).

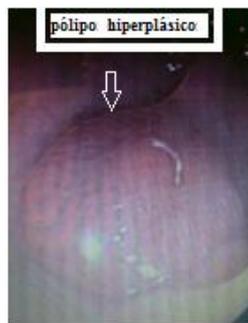


Figura 5 – Imagem de um pólio hiperplásico (Adaptado de Pickhardt, 2004).

#### **2.4.1.2. Adenomas**

Os adenomas são tumores benignos que surgem a partir do epitélio glandular, que com o tempo se podem tornar malignos, adquirindo a designação de adenocarcinoma. Este tipo de pólipos são caracterizados pela sua displasia de baixo ou alto grau, sendo que os de alto grau representarão, provavelmente, a fase de transição entre o adenoma e o adenocarcinoma (Cravo, 2000).

Os adenomas podem ser distinguidos, ao nível macroscópico, em três grupos: elevado, plano e deprimido. Os adenomas elevados podem ser pediculados ou sésseis e caracterizam-se pela presença de uma haste de mucosa. Os adenomas planos e os deprimidos são representados por um eritema da mucosa, derivado às mudanças existentes na sua textura (Hamilton & Aaltonen, 2000). Os núcleos fusiformes ou alargados e ovoides são hipercromáticos, e podem apresentar diferentes graus de estratificação nuclear e de quebra de polaridade.



Figura 6 – Imagem de um adenoma plano (Adaptado de [www.clinicabragalha.com.br](http://www.clinicabragalha.com.br)).

Os adenomas podem ainda ser classificados de outra maneira, por exemplo de acordo com a proporção do seu componente viloso:

- Adenoma tubular, quando tem componente viloso não ultrapassa os 20% ( $\leq 20\%$ );
- Adenoma tubulo-viloso, o componente viloso situa-se entre os 20 e os 80% ( $>20 < 80\%$ );
- Adenoma viloso, com componente viloso de no mínimo 80% ( $\geq 80\%$ ).

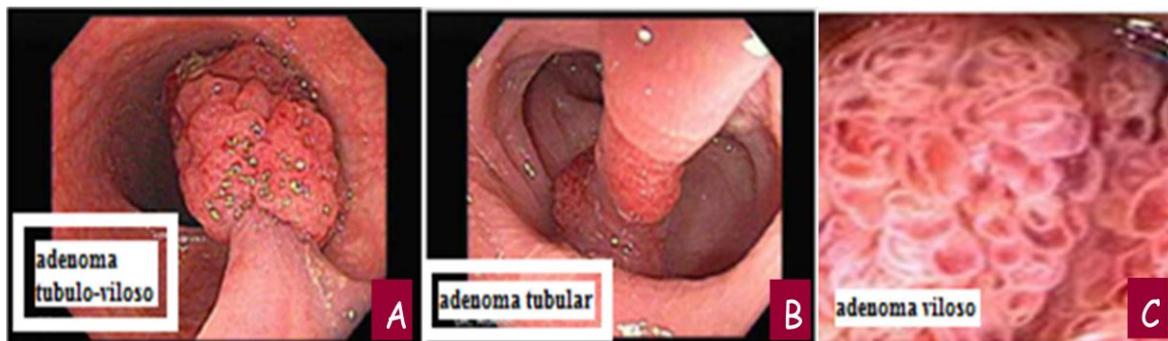


Figura 7 – Imagens durante colonoscopias. A- Adenoma tubulo-viloso; B- Adenoma tubular; C- Adenoma viloso. (Adaptado de: [www.gastrointestinalatlas.com/English/Colon\\_and\\_Rectum/Polyps/polyps.html](http://www.gastrointestinalatlas.com/English/Colon_and_Rectum/Polyps/polyps.html)).

Uma avaliação patológica adequada depende de fatores como:

- Grau de displasia;
- Proporção do componente viloso;
- Número de pólipos;
- Dimensão dos pólipos (pólipos pequenos  $\leq 1\text{cm}$ ; pólipos grandes  $\geq 2\text{cm}$ );
- Morfologia (pediculado, semi-pediculado ou sésil);
- Topografia dos pólipos.

Os adenomas tubulares podem ser classificados em salientes (esféricos e pediculados) ou não-salientes (planos). As estruturas glandulares displásicas abrangem, microscopicamente, pelo menos 80% da superfície do lúmen.

Os adenomas vilosos são distinguidos como sésseis, com uma superfície de aspeto ciliar, sendo que mostram projeções como folhas alinhadas de epitélio glandular displásico que abrangem mais de 80% da superfície luminal.

Os adenomas tubulo-vilosos são caracterizados por uma junção de estruturas tubulares e vilosas, com uma relação entre 80%/20% e 20%/80%.

Há uma relação direta entre o tamanho do pólipo, a proporção de componente viloso e a probabilidade de malignização. Quanto maior o pólipo, maior o componente viloso e maior a probabilidade de malignização. Por isso, diz-se que um adenoma displásico é caracterizado por um elevado risco de malignização, pois exhibe um ou mais dos três aspetos subsequentes: dimensões iguais ou superiores a 1cm, um componente viloso relevante (mais que 25%) e/ou displasia de alto grau (Amaro, 2003).

Enquanto menos de 1% dos adenomas, com um diâmetro inferior a 1cm, sofrem malignização, cerca de 10% com um diâmetro maior de 1cm, degeneram ao fim de 10anos e 25%, ao fim de 20anos. A frequência de adenomas eleva-se de 20% a 25%, aos 50anos, para 50%, aos 75/80anos.

### 2.4.1.3. Adenocarcinoma

A particularidade fundamental dos adenocarcinomas é a sua capacidade de invasão da submucosa e da *muscularis-mucosae*. Os adenocarcinomas podem ser distinguidos tendo por base a extensão da sua componente glandular, ramificando-se em adenocarcinomas bem ou moderadamente diferenciado, de baixo e de alto grau.

Nos adenocarcinomas pode-se observar a existência de glândulas, com produção de um muco e de túbulos, carateristicamente inconstantes, dobrados e distorcidos. A fração do tumor que apresenta estruturas glandulares permite explicar a qualificação do seu grau de diferenciação, sendo que os bem diferenciados, ou seja, de grau 1, revelam estruturas glandulares numa área da lesão superior a 95% do total desta; os moderadamente diferenciados, por tanto de grau 2, apresentam entre 50 a 95% de glândulas; os poucos diferenciados, de grau 3, com 5 a 50% de glândulas; e os indiferenciados, de grau 4, com menos de 5% de glândulas (Hamilton & Aaltonen, 2000).

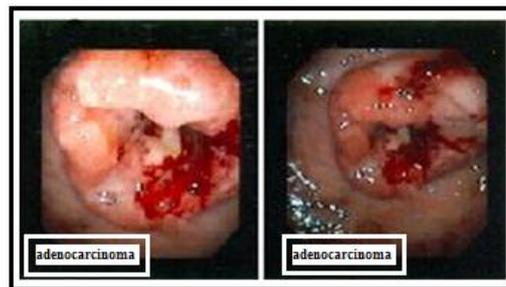


Figura 8 – Imagem de um adenocarcinoma (Adaptado de Barcelos *et al.*, 2009).

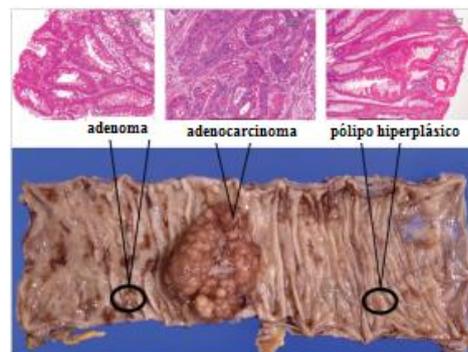


Figura 9 – Imagem de um carcinoma do cólon, histologicamente diagnosticado como adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado. É de notar que à volta do carcinoma há um adenoma e um pólipo hiperplásico (Adaptado de Tanaka, 2009).

## **2.5. Sequência criptas aberrantes-adenoma-carcinoma**

A sequência criptas aberrantes-adenoma-carcinoma é iniciada pela mucosa no seu estado normal, evoluindo a proliferação celular localizada até às criptas aberrantes, adenoma simples, adenoma avançado e por último, adenocarcinoma avançado.

A maioria dos pólipos colo-retais são de pequenas dimensões (inferiores a 5mm de tamanho) e são hiperplásicos. Tendo em conta a informação colhida até à data, os pólipos hiperplásicos não são precursores do CCR, enquanto que os adenomas são provavelmente importantes precursores da lesão.

Há um elevado risco de CCR em indivíduos dos quais os adenomas não são removidos, sendo que a polipectomia diminui o risco de CCR. O foco do carcinoma pode sempre ser detetado nos pólipos adenomatosos e regiões residuais do epitélio adenomatoso são quase sempre observadas em indivíduos com CCR. Apenas uma fração do adenoma progriderá em cancro (Fearon, 2011).

O desenvolvimento ao nível molecular do carcinoma colo-retal abrange as seguintes fases morfológicas: a proliferação epitelial do cólon, a formação de criptas aberrantes, a formação de pequenos adenomas, o aumento progressivo dos adenomas e do seu grau de displasia e o aparecimento do carcinoma. Se houver a remoção de adenomas do cólon e do reto, traduz-se numa paragem na sequência criptas aberrantes-adenoma-carcinoma, ajudando assim a prevenir o aparecimento do carcinoma colo-retal no futuro (Faias et al., 2004).

Na carcinogénese genética colo-retal, a aglomeração de diversas mutações genéticas possibilita não só a ativação das oncoproteínas, como também a inativação de proteínas supressoras de tumores, levando ao desenvolvimento de tumores, no cólon e no reto.

Algumas destas mutações genéticas podem ser herdadas, como por exemplo as mutações no gene APC relacionadas com o desenvolvimento da PAF; e outras podem ser obtidas pela exposição ambiental, como por exemplo por infeções virais que interferem com vários mecanismos celulares (Oyasu et al., 1987) (Solomon et al., 1987) (Terry et al., 2002) (Reid et al., 2003).

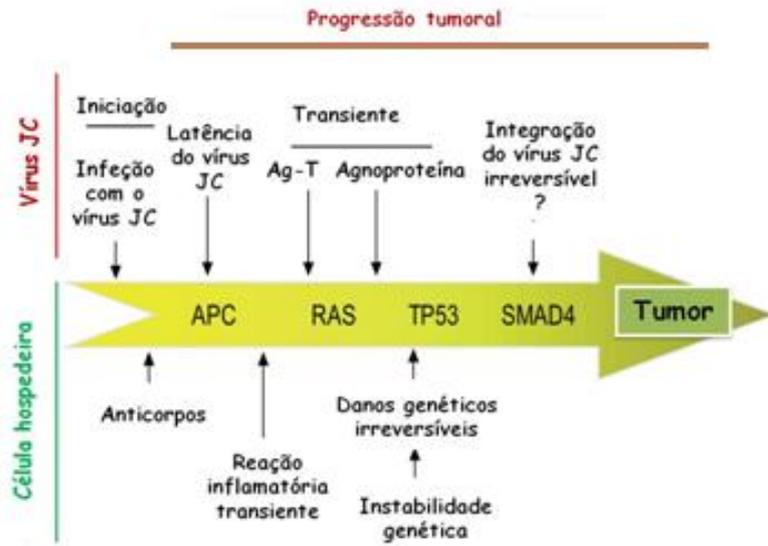


Figura 10 – Esquema ilustrativo dos múltiplos passos da carcinogênese colo-retal, com os quais o vírus JC pode interferir, quer de maneira irreversível ou transiente (Adaptado Coelho et al., 2010).

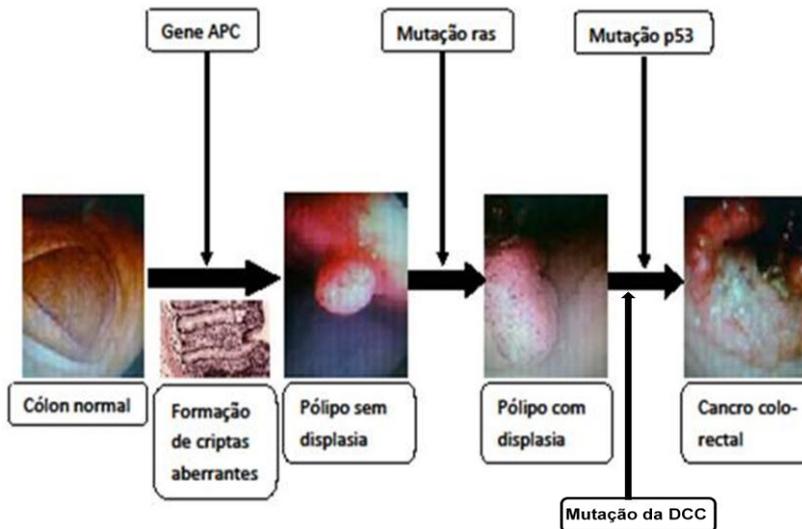


Figura 11 – Imagens durante colonoscopias com as diversas etapas da sequência criptas aberrantes-adenoma-carcinoma. Gene APC – *Adenomatous polyposis coli*; ras – proteína codificada pelo gene RAS; DCC – *deleted in colon cancer*; p53 – proteína citoplasmática de 53KDa (Adaptado de Smith et al, 2002).

Tabela I – Descrição da ação e principal função dos intervenientes na sequência criptas aberrantes-adenoma-carcinoma.

Proteína	Ação	Função principal
APC	Regulação da proliferação celular	Supressão
K-ras	Transmissão membrana-núcleo	Estimulação do oncogene
DCC	Adesão celular	Supressão
p53	Deteção de falhas no DNA da célula	Supressão
hMMR– hMSH <sub>2</sub> , hMLH <sub>1</sub> , hPMS <sub>1</sub> , hMSH <sub>6</sub>	Remoção de segmento alterado de DNA e inserção de novo segmento	Reparação
SMAD <sub>4</sub>	Regulação da expressão de genes específicos	Sinalização

### 3. O poliomavírus neurotrópico humano JC

#### 3.1. Epidemiologia

O vírus JC (JCV) é membro da família *Papovaviridae*, que abrange também o vírus BK (BKV), a designação BK deve-se ao nome do paciente, no qual foi identificado pela primeira vez e o Vírus Simiam 40 (SV40), pode ser encontrado em macacos *Rhesus* (Martin et al., 1984) e em seres humanos (Simiam=macaco).

O JCV foi descoberto a partir de extratos cerebrais de um doente com Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP), ao qual se deve a sua designação, JC – John Cunningham, ocorrendo assim, uma associação primária do vírus à LMP (1971).

A LMP é uma doença neurodegenerativa do Sistema Nervoso Central (SNC), usualmente fatal, sequente a uma infeção lítica, nos oligodendrócitos produtores de mielina, por JCV que exhibe múltiplas regiões de desmielinização (Padgett et al., 1971) (Martyn & Khalili, 2004) (Sabath & Major, 2002).

Esta doença neurodegenerativa pode apresentar os seguintes sintomas:

- Progressiva demência;
- Disfunção motora;
- Perda de visão;
- Morte ocorrendo em meses (Hallervorden et al., 1930).

O diagnóstico de LMP era relativamente raro há várias décadas atrás, mas tornou-se mais usual recentemente, sobretudo no contexto dos doentes imunocomprometidos (Sabath & Major, 2002).

O JCV, um patogénico oportunista, infeta 80 a 90% da população mundial, sendo encontrados anticorpos específicos contra o vírus, em adultos, trata-se por tanto de uma infeção generalizada.

Julga-se que a infeção deverá surgir numa fase mais tardia da infância perto da adolescência (Bofill-Mas et al., 2001), pois em mais de 60% das crianças com menos de 15 anos foram detetados anticorpos contra o vírus. Esta infeção dever-se-á, principalmente, a uma contaminação oro-fecal, sendo esta uma infeção sub-clínica que pode permanecer no estado latente ao longo da vida, sem sintomatologia.

O JCV pode ser detetado em tecidos das amígdalas, sugerindo-se que o trato respiratório poderá ser o primeiro local da infeção viral (Bofill-Mas et al., 2001). Depois de uma infeção inicial, o vírus propaga-se e estabelece-se uma infeção persistente no tecido renal por toda a vida do indivíduo.

Podemos observar que a patogenicidade do vírus está associada, primeiramente, a indivíduos imunocomprometidos, tais como doentes com SIDA. Nestes, o JCV deixa de estar no estado latente, estado característico nos indivíduos com um sistema imunitário normal, não debilitado, e desencadeia a LMP (Del Valle & Khalili, 2010) (Gordon & Khalili, 1998) (Bofill-Mas et al., 2001).

Inicialmente, esta doença provoca desmielinização, que ocorre em múltiplos focos, distribuídos espaçadamente pela massa branca subcortical dos hemisférios cerebrais. Com a progressão da doença, cada foco cresce à medida que o vírus se espalha de célula para célula. Microscopicamente, as áreas de necrose podem se tornar lesões macroscópicas, apresentando até vários centímetros de diâmetro.

As três principais características patológicas da LMP são: a desmielinização das lesões, acompanhadas por núcleos oligodendrogliais anormalmente grandes e uma hipertrofia dos astrócitos.

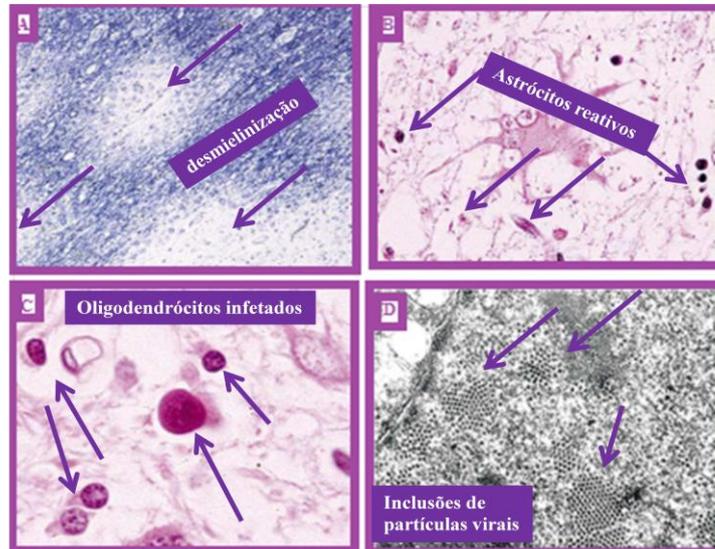


Figura 12 – Imagens das três principais características histológicas da leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP) e do agente etiológico. A – Múltiplas áreas de desmielinização ou placas em tecido cerebral de um doente com LMP; B – Astrócitos reativos multinucleados semelhantes a células neoplásicas em lesões por LMP; C - Oligodendrócitos infetados pelo JCV residual; D – Partículas nucleares icosaédricas de JC de 45nm incluídas em oligodendrócitos (microscopia eletrónica) (Adaptado de Khalili *et al.*, 2003).

Os viriões são mais facilmente detetados em oligodendrócitos, devido á sua infeção lítica nestas células, que são as principais células-alvo humanas, do que em astrócitos, e a sua perda neuronal é rara, com preservação dos axónios desmielinizados (Ledoux *et al.*, 1989) (Laghi *et al.*, 1999).

Os macrófagos estão muitas vezes presentes nas lesões de LMP, sendo a sua função nelas a remoção de produtos com desarranjos de mielina ou oligodendrócitos danificados. O sistema imunitário envolve a infiltração linfocítica, podendo conduzir a períodos de avanço e recuo da doença (Kepes *et al.*, 1975) (Sabath & Major, 2002).

Ao infectar animais e humanos o JCV pode ter dois desfechos possíveis:

- No caso das células permissivas (como os oligodendrócitos), capazes de suportar a replicação do DNA viral resultando no completar do seu ciclo lítico, o JCV pode induzir desordens na desmielinização, levando à LMP, em pacientes imunocomprometidos (Berger & Concha, 1995) (Piña-Oviedo et al., 2007);
- No caso das células não permissivas (como as células do epitélio col-retal), que não suportam a replicação do DNA viral nem a consequente infecção lítica, há um bloqueio da replicação viral causando uma infecção latente ou abortiva.

Na infecção latente há a expressão do genoma do JCV, incluindo o antígeno-T (Ag-T) e possivelmente a agnoproteína, possibilitando a indução da proliferação celular e a formação do tumor (Del Valle & Khalili, 2010) (White & Khalili, 2004) (Coelho et al., 2010).

A natureza multifocal da infecção pelo JCV resulta da variedade de sintomas clínicos possíveis, incluindo a deficiência visual ou cegueira, disfunção ou debilidade motora, demência e outras anormalidades cognitivas, tais como mudança de personalidade, amnésia e instabilidade emocional (Major et al., 1992).

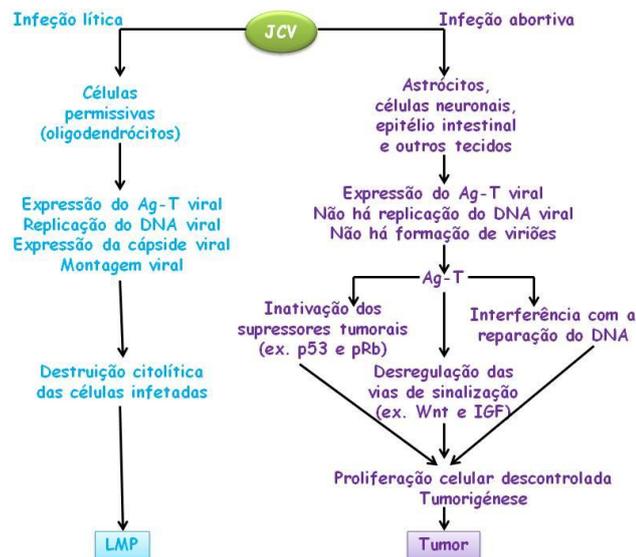


Figura 13 – Diagrama representativo dos dois principais mecanismos de infecção do JCV (Adaptado de Khalili *et al.*, 2003).

### 3.2. Morfologia

O JCV é um tipo de vírus de DNA, oportunista, sem invólucro, com uma cápside de tamanho aproximado de 40nm de diâmetro, uma estrutura icosaédrica com cadeia dupla superenrolada e um genoma circular pequeno, de aproximadamente 5,13 kb, que codifica seis genes (Martyn & Khalili, 2004) (Major et al., 2001) (Bofill-Mas et al., 2001).

O genoma do poliomavírus codifica várias proteínas não-estruturais, mas multifuncionais, sendo constituído por três regiões funcionais: duas regiões codificantes altamente conservadoras (uma região precoce e uma região tardia) e uma região regulatória variável, a TCR (Transcriptional Regulatory Region), que abrangem promotores/*enhancers* e a origem da replicação do DNA (Cole, 1996).

A região precoce é constituída por cinco proteínas, sendo estas o Ag-T e o antígeno t pequeno (Ag-t), altamente oncogénicas, que regulam a transcrição das proteínas da região tardia. O Ag-T tem três formas adicionais de *splicing* alternativo: T'135, T'136 e T'165 (Seth et al., 2003) (White et al., 2006).

A região tardia codifica quatro proteínas, as três proteínas da cápside (VP1, VP2 e VP3) e uma pequena proteína regulatória, a agnoproteína (Darbinyan et al., 2004) (Bofill-Mas et al., 2001).

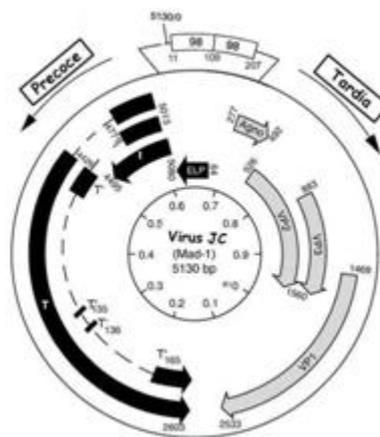
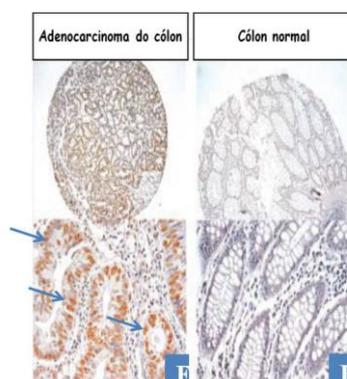


Figura 14 – Esquema do genoma do vírus JC. O esquema de representação mostra a estirpe Mad-1 do vírus JC, a zona precoce e a zona tardia, o Ag-T, o Ag-t, T'135, T'136 e T'165 (as três formas adicionais de *splicing* alternativo), Agno – agnoproteína, uma proteína tardia, ELP – *Putative early leader protein*, VP1, VP2 e VP3 – as três proteínas estruturais do vírus (Adaptado de White et al., 2006).

O Ag-T do JCV é uma proteína pleiotrópica, com habilidade para interagir com varias proteínas supressoras de tumores, incluindo a p53, a pRb e a NF2 (Del Valle & Khalili, 2010), sugerindo assim, a sua função de proteína necessária para a regulação da replicação e transcrição do DNA viral, contribuindo para a desregulação da proliferação celular (Sabath & Major, 2002).

O Ag-t é uma proteína que não tem função na multiplicação, mas pensa-se que poderá ter algum tipo de função na patogenicidade viral nos humanos, pois apesar desta ainda não estar bem esclarecida, sabe-se que coopera com o Ag-T na transformação celular *in vitro*. Tal como o Ag-T, o Ag-t pode estar envolvido na transformação de células de primatas não-humanos e roedores infetados (Sabath & Major, 2002).



Figuras 15 – Imagens de deteção imunohistoquímica do Ag-T em cânceres humanos. A expressão do Ag-T é muito detetada nas células epiteliais neoplásicas de adenocarcinomas do cólon (E), e não nas amostras de cólon normal (F). (Adaptado de Del Valle & Khalili, 2010).

As proteínas da cápside delimitam o vírus. A VP1, a proteína maior e mais externa, é a responsável pela formação da estrutura icosaédrica com 72 pentâmeros e contém os epítomos para a indução e o reconhecimento dos anticorpos e é responsável pela capacidade hemaglutinante do vírus, sugerindo-se um envolvimento na interação com a proteína recetora celular no momento da adesão. A ligação pentâmero - pentâmero adjacente é feita através do terminal carboxilo de cada VP1, interagindo assim com os pentâmeros adjacentes. A VP2 e VP3 são proteínas internas da cápside com 30 a 60 moléculas e funcionam como componentes de estrutura menor, e pensa-se que auxiliam na manutenção da estrutura da cápside (Behbahani et al., 2004) (Sabath & Major, 2002) (Gardner & Knowles, 1995).

A agnoproteína do JCV tem sido alvo de bastante interesse científico ao nível da carcinogénese do JCV, tendo sido observada a sua expressão em tumores cerebrais e não-cerebrais. A agnoproteína é uma proteína de reduzido peso molecular que interage diretamente com o Ag-T e é caracterizada pela habilidade de desregular o ciclo da célula e interfere com as vias envolvidas na reparação do DNA e na estabilidade cromossómica, contribuindo também para o aumento da permeabilidade membranar da célula infetada pelo vírus, facilitando a saída do vírus do complexo celular por via não lítica (Darbinyan et al., 2002) (Darbinyan et al., 2007) (Sabath & Major, 2002) (Merabova et al., 2008).

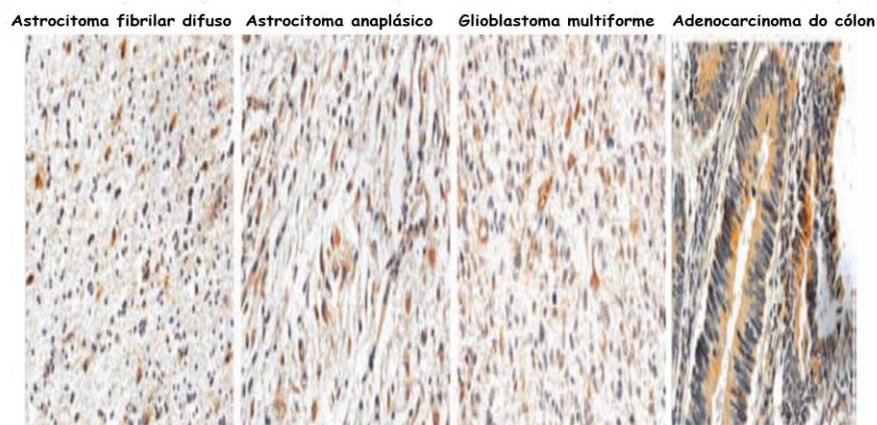


Figura 16 - Imagens de deteção imunohistoquímica da agnoproteína em cancros humanos: (A) em astrocitomas de baixo grau, (B) em tumores anaplásicos, (C) em glioblastomas multiformes e (D) em citoplasma de células epiteliais neoplásicas de adenocarcinomas do cólon. (Adaptado de Del Valle & Khalili, 2010).

A TCR é uma região regulatória não-codificante bastante variável (Dang et al., 2012), composta por cerca de 200pb situados entre as duas sequências codificantes. Esta região é considerada um modelador primário da atividade viral e do tropismo celular.

A TCR representa a maior variabilidade de sequência no genoma do JCV, talvez devido aos rearranjos, duplicações e/ou deleções e mutações pontuais adquiridas durante toda a propagação do vírus na região da TCR contribuindo assim para a ubiquidade do vírus (Sabath & Major, 2002). Esta variabilidade gera as diversas variantes do JCV, como por exemplo as chamadas “tipo LMP”, tais como a Mad-1 e Mad-4 (Sabath & Major, 2002) e o arquétipo (JCV<sub>CY</sub>), que é encontrado no epitélio renal dos indivíduos saudáveis e é a forma geralmente excretada na urina (Bofill-Mas et al., 2003) (Rossi et al., 2007).

O JCV<sub>CY</sub> raramente é encontrado em tumores do cérebro e em linfócitos periféricos de indivíduos com ou sem LMP. Estudos recentes, concluíram que existem algumas variantes do JCV que se conseguem replicar em células linfóides e que a capacidade de replicação do JCV em outros tipos de células hospedeiras está altamente dependente da TCR (Monaco et al. 1998).

### 3.3. Ciclo de vida

A ausência da replicação viral em quaisquer outras células ou tecidos, indica que o ciclo lítico produtivo do JCV é específico para as células neuronais e ocorre quase sempre, exclusivamente, nos oligodendrócitos e nos astrócitos (Del Valle & Khalili, 2010), demonstrando assim um tropismo seletivo pelas células gliais que causa a morte celular por infecção lítica (Seth et al., 2003).

Os viriões ligam-se, através das suas proteínas da cápside, aos oligossacarídeos das N-glicoproteínas e dos N-glicolípidos, que funcionam como recetores, contendo os ácidos siálicos  $\alpha(2-6)$  da superfície de células permissivas. Esta ligação resultará na infecção, há a ativação dos recetores específicos presentes na superfície das células referidas, contribuindo para a ligação do vírus à célula. Consequentemente, o vírus entra na célula por via de endocitose. O vírus é transportado no interior de vesículas revestidas por clatrina para o núcleo da célula hospedeira, onde é desencapsulado (Figura 17).

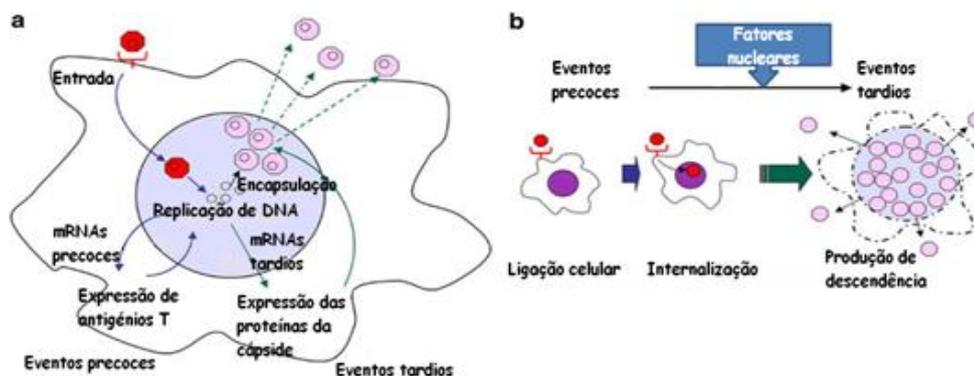


Figura 17 – Esquema ilustrativo do ciclo de vida do vírus JC. a. O ciclo de vida viral começa com a ligação aos recetores da superfície celular e é completado com a libertação do vírus pela célula hospedeira. b. Apesar de já ser conhecido que o JCV infeta uma variedade de células, a produção de descendência mais eficiente parece ocorrer nas oligodendrogliais, sob a ação determinante de múltiplos fatores nucleares. (Adaptado de Shishido-Hara, 2010).

O vírus, uma vez transposto para o interior do núcleo da célula hospedeira, encontra-se livre para iniciar a transcrição viral resultando em dois mRNAs codificantes dos dois antígenos: Ag-T e Ag-t. Estes vão promover a entrada da célula hospedeira no ciclo mitótico, inicialmente na fase S e seguidamente na replicação do DNA da célula hospedeira e das proteínas tardias (VP1, VP2, VP3 e Agnoproteína).

As três proteínas tardias VP1, VP2 e VP3 aglomeram-se e formam a cápside do vírus e há a formação de novos viriões. Os novos viriões são libertados da célula hospedeira por lise celular, através da formação de poros hidrofílicos na membrana desta, estando assim em condições de infetar outras células – ciclo de vida lítico (Sabath & Major, 2002).

No caso das células não permissivas, o vírus pode potenciar o desenvolvimento de doenças. Tal deve-se ao fato do vírus apesar de não se conseguir replicar, tem a possibilidade de integrar o seu genoma no DNA da célula hospedeira, de forma não específica (infecção latente ou abortiva).

Neste tipo de infecção, ou o DNA viral não é replicado ou é replicado mas sem lise no final. Quando há replicação do vírus mas sem lise no final, as oncoproteínas virais saem da célula também através de poros, havendo por tanto a sua expressão transformando a célula em neoplásica, levando à desregulação a proliferação celular (ciclo de vida por via transformante) (Martyn & Khalili, 2004) (Khalili et al., 2003).

As proteínas virais desempenham várias funções na célula hospedeira, podendo até interferir no ciclo de vida do próprio vírus por forma a criar as condições necessárias para a sua replicação, controlando para isso os mecanismos da célula hospedeira.

O Ag-T é uma fosfoproteína nuclear, imprescindível no processo de replicação e transcrição do DNA do vírus, pois é capaz de se ligar especificamente ao DNA da célula hospedeira, promovendo o desenrolamento da dupla hélice, caracterizando-se assim por apresentar funções de helicase e de ATPase. Esta tem também capacidade de se ligar, interagindo de forma a inativar diversas proteínas supressoras tumorais, tais como a p53 (proteína citoplasmática de 53 KDa) e a pRb (proteína de retinoblastoma), modulando as vias de sinalização celular, regulando assim a progressão do ciclo celular e a apoptose.

Estudos recentes concluem que o JCV tem um elevado poder oncogénico. Este vírus é capaz de induzir vários tipos de tumores no SNC, quer em indivíduos saudáveis quer com LMP. O JCV é também capaz de infetar e transformar células humanas de origem não neuronal (células do sistema imunitário, células dos tratos urinário e

gastrointestinal), apesar do seu efeito na carcinogénese humana ainda não estar bem definido.

Este elevado poder oncogénico talvez dever-se-á maioritariamente ao Ag-T, pois este é uma proteína que apresenta multifuncionalidades dependendo da molécula à qual se liga, tendo a capacidade, de entre outras, de desregular a proliferação celular, interferindo para isso nos processos intervenientes do ciclo celular e da apoptose celular (oncogénese).

Na célula hospedeira, em condições fisiológicas normais, a pRb (regulador da proliferação celular) é mantida no estado hipofosforilado e liga-se aos fatores de transcrição E2F (mediadores da repressão/ativação da transcrição) formando o complexo pRb:E2F, provocando assim uma repressão da transcrição dos genes da célula essenciais à replicação do DNA na fase S do ciclo celular.

A pRb exerce assim uma regulação negativa sobre o ciclo celular, podendo ser contrariada através da sua fosforilação com as ciclinas D4 e D6, promovendo assim a quebra da ligação desta aos fatores de transcrição E2F, resultando na transcrição dos genes necessários para a entrada da célula na fase S e consequente replicação do DNA do vírus e infeção viral.

Uma vez as células infetadas com o JCV, o Ag-T do vírus tem a capacidade de se ligar à proteína pRb, mimetizando a ação anteriormente descrita das ciclinas, resultando na transcrição dos genes necessários para o avanço do ciclo celular. Assim estamos perante uma proliferação descontrolada e inapropriada de células infetadas pelo JCV.

Contribuindo de igual maneira para a infeção descontrolada das células, temos o fato da quebra da ligação pRb-fatores E2F colocar os fatores E2F livres na célula, induzindo assim a expressão do gene p14<sup>ARF</sup>, potente supressor tumoral, que interfere com a atividade da proteína MDM2, inibindo a normal ação desta, que é o principal antagonista da proteína p53, responsável nomeadamente pelo controlo do ciclo celular, reparação dos danos DNA e apoptose celular. Consequentemente, a p53 é estabilizada, inibindo o ciclo celular e promovendo a apoptose (via A da Figura 18). Para que tal não se verifique é imprescindível que haja a ligação do Ag-T à p53, para haver a inativação da normal ação da p53 (via B da Figura 18).

O Ag-T também interage com outras proteínas como por exemplo a  $\beta$ -catenina (promove a adesão entre células epiteliais), IGF-1R (fator de crescimento semelhante à insulina-1) e IRS-1 (recetor do substrato de insulina).

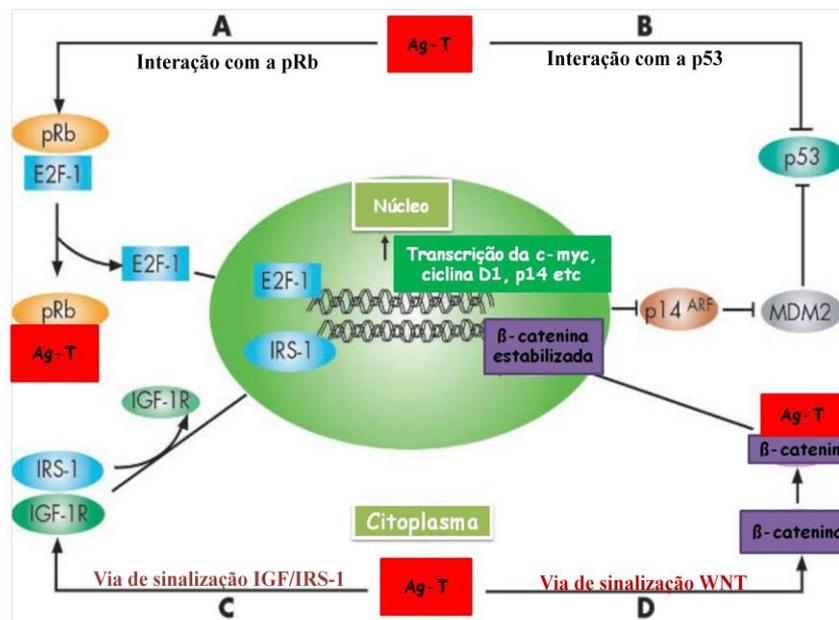


Figura 18 – Esquema representativo das interações do Ag-T do vírus JC (JCV) com as vias de sinalização. pRb – proteína do retinoblastoma; E2F – fatores de transcrição; Ag-T – Antígeno T grande; IRS-1 – recetor do substrato de insulina de tipo 1; β-cat - β-catenina; CDK1 – Cinase dependente de ciclina de tipo 1; p53 – proteína citoplasmática de 53KDa; MDM2 – proteína inibidora da p53 de tipo 2 (Adaptado de Boland et al., 2005).

Acredita-se que o Ag-T do JCV conduz a um processo oncogénico através da sua associação com várias proteínas celulares.

Uma das vias de sinalização importante que é afetada pelo JCV é a via IGF/IRS-1. O IRS-1 é o membro chave da via de sinalização IGF. Vários estudos têm mostrado que o Ag-T ao ligar-se ao IRS-1 leva à quebra da ligação do IGF-1R com o IRS-1 e é capaz de transpor o IRS-1 para o núcleo, local onde ele vai interferir com a fidelidade da reparação do DNA, resultando na possível acumulação de mutações (via C da Figura 18) (Lassak et al., 2002) (Trojanek et al., 2006).

Outra via de sinalização bastante importante para o desenvolvimento do CCR, de entre outros tipos de tumores é a via de sinalização WNT, que tem como função o controlo da proliferação celular, que envolve a participação da β-catenina e o Ag-T do JCV. O Ag-T pode ser oncogénico pela desregulação desta via de sinalização. Em células normais, os níveis de β-catenina são regulados pelo complexo de proteínas GSK3β, Axin-1 e APC, que fosforilam a β-catenina e provoca a sua degradação.

Na infecção do JCV, o Ag-T liga-se à  $\beta$ -catenina, conduzindo à sua estabilização e fornecendo um sinal da localização nuclear. Uma vez no núcleo, a  $\beta$ -catenina estabilizada complexa com os fatores de transcrição, como por exemplo o TCR/LEF, que estimula a transcrição dos genes reguladores do ciclo celular (incluindo a c-myc e a ciclina D1), se houver danos na transcrição vai levar à desregulação de todo o ciclo celular (via D da Figura 18) (Del Valle & Khalili, 2010) (Khalili et al., 2003) (Alexander et al., 2002).

### **3.4. Latência e reativação**

O estado latente do JCV ainda não está bem descrito, no entanto, sabe-se que a infecção primária é uma infecção que ocorre no fim da infância, é assintomática, crônica e persistente, na qual o DNA do JCV pode ser detetado (Sabath & Major, 2002). Pensa-se também que, em hospedeiros imunocompetentes, após uma infecção primária, o JCV permanecerá num estado latente indefinidamente no tecido renal, nos tecidos linfóides e na medula óssea sem sintomas óbvios (Sock et al., 1996) (Laghi et al., 1999).

O JCV é excretado na urina de pessoas saudáveis e com LMP, e foi também detetado no tecido renal de pessoas saudáveis (Chesters et al., 1983). Isto sugere que os rins servem como o reservatório do vírus durante a infecção na fase latente, mas os mecanismos e os eventos bioquímicos estudados ainda não tornam isto claro.

Apesar dos hospedeiros imunocompetentes excretarem o JCV na urina, a infecção é latente no tecido renal, no sentido em que não há lise mas há constantemente a replicação do vírus que é continuamente excretado na urina, segundo alguns autores, podendo então concluir-se que há persistência do vírus nos rins, sendo que a duração desta varia consoante o grau de imunossupressão do individuo portador do vírus (Kitamura et al., 1997).

Outro local possível, para a permanência do vírus no estado latente é a medula óssea. O JCV é também capaz de infetar culturas primárias de endotélio vascular e de células amnióticas, células progenitoras hematopoéticas (CD34) e linhas celulares relacionadas (KG 1 e KG-1a).

A infecção persistente pode ocorrer, se as populações de células progenitoras se expuserem ao JCV por via da circulação de linfócitos infetados. As células progenitoras hematopoiéticas infetadas diferenciam-se em linfócitos B, e assim o vírus é espalhado por todo o hospedeiro.

É possível que o arquétipo do JCV infete as células progenitoras hematopoiéticas ou então que as mutações possam ocorrer *in vivo* durante a replicação do DNA para produzir sequência de arquétipo. Como no rim, o arquétipo do JCV pode ser menos ativo nos progenitores hematopoiéticos do que nas variantes de protótipos, favorecendo assim o começo da latência (Sabath & Major, 2002).

O processo de reativação do JCV ainda tem de ser melhor descrito, apesar disto, sabe-se que geralmente ocorre em indivíduos imunocomprometidos, particularmente com SIDA. Nestes, a perda de especificidade das células imunológicas que em condições normais mantêm o vírus no estado latente, pode permitir que o vírus se replique de modo a tornar a infecção viral ativa, passando a ter um efeito transformante oncogénico para as células não permissivas (Sock et al., 1996).

Outros estudos sugerem que em condições de imunossupressão, há a criação de condições susceptíveis para mudanças na região regulatória do JCV. Assim, conduz a sequências de diversas atividades biológicas, que permitem a expressão de proteínas do genoma viral e a replicação do DNA viral nos oligodendrócitos. Consequentemente, pode causar a destruição citológica destas células e o desenvolvimento de uma doença desmielinizante fatal, a LMP.

Por clarificar encontra-se o fato de algumas pessoas imunocomprometidas desenvolverem LMP, enquanto que outras com carga semelhante de JCV não desenvolvem a doença (Del Valle & Piña-Oviedo, 2006) (Laghi et al., 1999) (Sabath & Major, 2002).

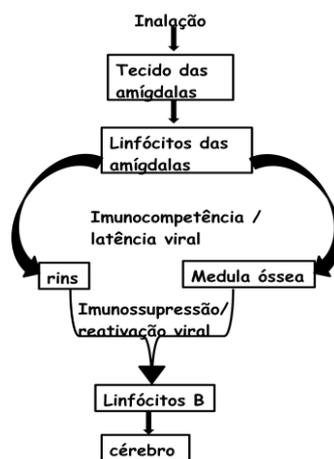


Figura 19 – Diagrama de um possível percurso para o movimento viral baseado nas observações do tropismo do JCV. Em imunossupressão, o JCV pode ser reativado e infeta os linfócitos B circulantes. Estas células podem passar a barreira hemato-encefálica e infetar os oligodendrócitos, levando à desmielinização e à LMP. (Adaptado de Sabath *et al.* , 2002).

#### **4. Dados experimentais que estabelecem uma ligação entre o JCV e o CCR**

O poliomavírus humano JC codifica um potente oncogene, o Ag-T, que parece estar envolvido no desenvolvimento do CCR, mas esta continua a ser ainda uma questão por esclarecer em pleno, como por exemplo qual a função das oncoproteínas virais na promoção da transformação de células e o papel do JCV nas neoplasias humanas, apesar de que há certeza da presença do JCV em tecidos do cólon humano e em neoplasias colo-retais.

A infecção pelo JCV pode estar envolvida na carcinogénese através da desregulação da via de transdução de sinais WNT que estão associados à incapacidade do JCV codificar as suas proteínas essenciais à replicação do vírus. Para isto é necessário que a célula hospedeira realize mecanismos compensatórios para o vírus conseguir replicar o seu DNA.

Vários estudos comprovaram a influência oncogénica de certos microrganismos sendo considerados por isso como agentes infecciosos, por exemplo a infecção pelo Virus do Papiloma Humano (HPV) associado ao adenocarcinoma do colo-uterino e a infecção pelo *Helicobacter pylori* associado ao carcinoma gástrico (DiMaio & Liao, 2006) (Prinz et al., 2006).

Vários estudos comprovaram também a presença do JCV em amostras de tecidos de mucosas colo-retais de doentes com carcinomas no trato gastrentestinal (Enam et al., 2002) (Hori et al., 2005). O grupo de estudo de Ricciardiello et al. (2000) considera a mucosa colo-retal como “o reservatório natural” do JCV no organismo humano.

O JCV é um vírus sobretudo neurotrópico, expressando os seus genes principalmente nos oligodendrócitos humanos. O vírus tem capacidade de transformação oncogénica nas células neuronais (Henson et al., 1995) e em muitos outros tipos de células em cultura em diversos modelos animais sem origem neuronal (Khalili et al., 2003). Com isto, sugere a hipótese de que o JCV poderá ter a capacidade de infetar vários tipos de células e de tecidos humanos de forma transformante através da ligação do vírus aos recetores da membrana da célula hospedeira. Para comprovar esta hipótese, foi detetada a presença do JCV em células do estroma da amígdala (Padgett et al., 1971), em linfócitos B (Sabath & Major, 2002), em células do epitélio renal (Safak et al., 2001) e no trato gastrentestinal (Ricciardiello et al., 2000).

Os Ag-t e Ag-T têm propriedades oncogénicas em diversos modelos animais, podendo a sua associação com várias proteínas, levar a que o JCV seja sugerido como a causa provável da ativação de oncoproteínas e inativação de proteínas supressoras de tumores, da proliferação celular descontrolada, da interferência com os mecanismos de reparação do DNA, que se traduzem na instabilidade cromossómica no CCR.

## 5. Caracterização da p53

Em cerca de 50% de todos os casos de cancro humano, incluindo o CCR, o genoma da proteína p53 está mutado. O gene da p53 está localizado no cromossoma 17p, que foi inicialmente identificado devido à elevada frequência de perda de alelos nesta região do cromossoma 17.

A função da proteína p53 é a de regulação-chave da transcrição que codifica proteínas com funções nos pontos de verificação do ciclo celular, nos limites das fases G1/S e G2/M, na promoção da apoptose depois de certos tipos de danos quando estes são muito severos e na restrição da angiogénese.

A função normal desta proteína pode ser avaliada pela resposta aos danos no DNA, por exemplo por radiações- $\gamma$ . Como tal, a seleção de alterações na p53 na transição adenoma-carcinoma pode refletir o fato de que o stress nas células tumorais pode ativar o controlo do ciclo celular. Este stress pode incluir a rutura das bandas de DNA, a erosão do telómero, a hipoxia e a exposição reduzida aos nutrientes (Iacopetta, 2003) (Rodrigues et al., 1990) (Fearon, 2011).

As mutações na p53 podem facilitar o crescimento continuo e a aquisição de propriedades invasivas face ao stress, que de outro modo poderiam limitar severamente a sobrevivência de células tumorais e a manutenção da transição adenoma-carcinoma. As mutações da p53 em casos de tumores são específicas, porque elas interferem com o processo apoptótico.

A proteína p53 do tipo selvagem, provavelmente também terá alguns papéis importantes na transição independente fora do núcleo como por exemplo na regulação da morte celular na mitocôndria e talvez na inibição de autofagia, regulando a duplicação do centrossoma e outros processos no citoplasma.

Até à data, mais de 85% das mutações da p53 reportadas nos carcinomas coloreticais são mutações *missense*, que têm sido alvo de estudos quer *in vivo* quer *in vitro*.

Estudos feitos *in vitro*, mostram claramente que:

- a) Muitas proteínas p53 mutantes podem inibir a função normal da p53;
- b) Proteínas mutantes podem ser funcionalmente anormais;
- c) Mutantes diferentes variam na sua oncogenicidade.

As mutações em pontos *missense*, quebram a p53 ou os seus domínios funcionais ou o resultado do isolamento da proteína na sua inativação, que por sua vez promove a progressão tumoral e leva à diminuição da sobrevivência dos doentes.

As mutações em localizações que afetam os domínios estruturais ou funcionais e em regiões conservadas evolutivamente são geralmente associadas a tumores agressivos e à quimio-resistência.

O papel da p53 mutante no processo de carcinogénese pode ser muito mais complicado do que previamente pensado, podendo envolver a especificidade do tipo de célula e potenciais interações com alterações noutros genes (Katkooi et al., 2009) (Liu et al., 2006) (Iacopetta, 2003).

No CCR, as mutações na p53 podem facilitar o crescimento contínuo e a aquisição de propriedades invasivas face a variados tipos de stress, que de outro modo limitam severamente a sobrevivência celular na transição adenoma-carcinoma. A seleção de mutações da p53 no CCR pode ser derivada em parte à perda da função transcricional na regulação dos principais genes-alvo (por exemplo p21<sup>WAF/CIP1</sup>, PUMA, BAX e MDM2). Contudo, as proteínas p53 mutantes *missense* presentes nas células cancerígenas podem contribuir positivamente para o fenótipo de cancro via diversos fatores e mecanismos.

A p53 mutante *missense* pode contribuir para vários mecanismos possíveis, como por exemplo:

- a) Efeitos na proliferação celular do tumor;
- b) Diminuição da apoptose celular do tumor;
- c) Aumento da angiogénese tumoral;
- d) Redução da hipoxia celular;
- e) Efeitos na autofagia;
- f) Alteração no processamento do microRNA (miRNA).

No que diz respeito aos efeitos na autofagia, a p53 do tipo selvagem pode funcionar de pelo menos duas maneiras possíveis:

- I. Ativa a autofagia via mecanismos dependentes da transcrição;
- II. Inibe a autofagia via função da p53 no citoplasma.

Em casos já estudados, sugeriu-se que a p53 mutante *missense*, uma vez no citoplasma, mantém a capacidade de inibir a autofagia, tal como a p53 do tipo selvagem faz, mas esta primeira não pode funcionar no núcleo, para ativar os genes promotores de autofagia. O efeito previsto é que as células cancerígenas com p53 mutante *missense* tenham menos autofagia do que as células p53 do tipo selvagem ou as p53 com alelos nulos (com deleções na sequência). Neste caso, o papel da p53 independente de transcrição no processamento do miRNA, é interagir com o complexo processamento do miRNA Drosha, e a p53 mutante *missense* pode interferir com as interações funcionais da p68 helicase de RNA Drosha, que leva à atenuação aparente no processamento de certos miRNAs (Fearon, 2011).

Os polimorfismos da p53 são encontrados tanto em exões como em intrões. Os polimorfismos mais bem caracterizados funcionalmente são os do exão 4 nos codões 47 e 72. O polimorfismo do codão 72 é uma alteração comum na população em geral, que resulta na presença de resíduos de prolina ou arginina na posição 72, no domínio rico em prolina (resíduos 64-92) da proteína p53, resultando numa mudança marcada na estrutura da proteína.

Vários estudos, quer *in vivo* quer *in vitro*, relatam a diferença funcional entre as variantes Pro/Pro e Arg/Arg, com a forma Arg/Arg a p53 do tipo selvagem apresenta um melhor potencial de indução de apoptose que o fenótipo Pro/Pro.

Quando comparamos com outros polimorfismos da p53, o polimorfismo do codão 72 exibe um elevado nível de variação de frequência entre grupos étnicos/raças diferentes e está relacionado com a progressão do cancro. É importante perceber o efeito do polimorfismo do codão 72 da p53 na progressão da doença e resultados clínicos baseados nas raças/etnicidade (Katkooi et al., 2009).



## II. Objetivos



O trabalho aqui apresentado foi desenvolvido visando os seguintes objetivos:

- I. Tentativa de estabelecer um padrão de polimorfismos da p53 relacionáveis com a presença do vírus no cancro colo-retal.
- II. Contribuição para o estudo da relação entre o vírus JC e o cancro colo-retal.



### **III. Material e métodos**



## 1. Colheita do material biológico

Todo o trabalho clínico foi realizado no Serviço de Cirurgia (Prof. Doutor Carlos Costa Almeida e Dr Carlos E. Costa Almeida) e no Serviço de Gastrenterologia (Prof. Doutor Pedro Figueiredo) do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), de acordo com os protocolos pré-estabelecidos.

A colheita e manipulação das amostras de tecido humano foram realizadas de acordo com o protocolo aprovado pelo Comité de Ética dos CHUC. O envolvimento dos indivíduos no estudo foi precedido de consentimento informado.

**Grupo de estudo** – constituído por 22 portadores de CCR, cada um com pelo menos um adenocarcinoma colo-retal, dos quais se colheram 3 biópsias: 1 de adenocarcinoma colo-retal, 1 de mucosa colo-retal adjacente e 1 de mucosa colo-retal não adjacente (Tabela II).

Tabela II – Caraterização do grupo de estudo (GE)

	Número atribuído	Nome do doente	Sexo	Idade	Amostras clínicas colhidas		
					Adenocarcinoma (A)	Mucosa adjacente (B)	Mucosa não adjacente (C)
GE	1	L.M.	Fem.	79	Sim	Sim	Sim
	2	S.M.P.	Masc.	61	Sim	Sim	Sim
	3	J.F.J.	Masc.	76	Sim	Sim	Sim
	4	M.H.C.T.	Fem.	67	Sim	Sim	Sim
	5	M.G.	Masc.	72	Sim	Sim	Sim
	6	M.A.C.	Fem.	67	Sim	Sim	Sim
	7	H.T.R.G.	Masc.	66	Sim	Sim	Sim
	8	M.C.J.P.C.	Fem.	67	Sim	Sim	Sim
	9	J.F.S.	Masc.	71	Sim	Sim	Sim
	10	A.M.	Masc.	97	Sim	Sim	Sim
	11	J.M.N.	Masc.	79	Sim	Sim	Sim
	12	A.M.R.	Masc.	68	Sim	Sim	Sim
	13	U.M.C	Fem.	68	Sim	Sim	Sim
	14	A.C.R.	Masc.	77	Sim	Sim	Sim
	15	M.L.P.J.	Fem.	81	Sim	Sim	Sim
	16	A.C.F.	Masc.	69	Sim	Sim	Sim
	17	F.C.	Masc.	79	Sim	Sim	Sim
	18	L.S.A.	Fem.	73	Sim	Sim	Sim
	19	I.M.J.	Masc.	67	Sim	Sim	Sim
	20	R.M.N.S	Fem.	59	Sim	Sim	Sim
	21	E.R.F.	Masc.	74	Sim	Sim	Sim
	22	H.A.M.T.S.	Masc.	68	Sim	Sim	Sim

Masc. – masculino; Fem. – feminino; B – mucosa normal a menos de 5mm da lesão; C – mucosa normal colhida na peça operatória, o mais afastada possível da lesão.

**Grupo-controlo** – constituído por 21 não portadores de CCR ou de lesões pré-cancerosas, de cada um dos quais se colheu 1 biópsia de mucosa colo-retal normal, com localização aleatória (Tabela III).

Tabela III – Caraterização do grupo-controlo

	Número atribuído	Nome do paciente	Sexo	Idade
<b>Grupo controlo</b>	1	M.C.M.T.	Fem.	56
	2	M.L.C.R.	Fem.	65
	3	J.F.O.C.	Masc.	74
	4	M.J.G.	Fem.	66
	5	B.A.M.	Fem.	82
	6	O.D.	Fem.	84
	7	A.A.F.	Fem.	93
	8	A.G.S.	Fem.	90
	9	A.M.S.B.R.	Fem.	41
	10	L.M	Fem.	76
	11	M.A.F.M.D.	Fem.	41
	12	M.O.G.	Fem.	52
	13	J.M.D.M.	Masc.	52
	14	M.I.S.C.	Fem.	56
	15	C.S.	Fem.	46
	16	M.A.F.	Fem.	82
	17	A.D.S.	Masc.	79
	18	A.J.R	Masc.	77
	19	R.J.L.M.	Fem.	64
	20	J.N.	Masc.	79
	21	A.S.	Fem.	69

Masc. – masculino; Fem. – feminino.

Reuniram-se todos os dados clínicos que se julgam relevantes sobre cada paciente, exceto a identificação, por motivos éticos.

Obtivemos um total de 66 amostras do grupo de estudo com a média de idades de 72.05 anos (14 homens e 8 mulheres) e 21 do grupo-controlo com a média de idades de 67.81 anos (5 homens e 16 mulheres).

As amostras de mucosa colo-retal foram inseridas em *ependorfs* de 1,5ml com 200µl de RNAlater (Applied, Carlsbad, California) (um reagente de estabilização e proteção celular para RNA) e foram posteriormente conservadas a -80°C.

## **2. Métodos experimentais para a detecção da presença do JCV**

Primeiramente, as amostras foram descongeladas e retiradas dos *ependorfs* do RNAlater para novos *ependorfs*. Nestes, o tecido é cortado em pequenos fragmentos que é essencial para uma digestão adequada.

### **2.1. Extração de DNA total por fenol/clorofórmio**

A extração de DNA é um procedimento básico que envolve a lise celular, com a libertação de todo o material genético intracelular e posterior purificação do DNA.

Com a lise celular são libertados todos os compostos intracelulares, como por exemplo proteínas, lípidos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, moléculas orgânicas de baixo peso molecular e iões.

Na purificação do DNA, há a libertação de todos os compostos acima referidos, que é feito por meio de varias precipitações diferenciais. Para estas precipitações utiliza-se a mistura de fenol:clorofórmio:ácido isoamílico, em que primeiramente, o fenol e o clorofórmio vão desnaturar as proteínas, solubilizando-as na fase fenólica que se separa com maior eficácia da fase aquosa por ação do clorofórmio e do ácido isoamílico.

Posteriormente, o procedimento tem por base a insolubilidade do DNA em etanol na presença de concentrações elevadas de catiões monovalentes. Os solutos orgânicos e resíduos de fenol e de clorofórmio vão permanecer em solução, e são retirados através de lavagens com etanol onde se dissolve a maioria dos catiões. Como resultado final, temos um DNA praticamente puro no precipitado.

O DNA deve ser guardado solubilizado em H<sub>2</sub>O mQ a -70°C para prevenir possíveis mutações espontâneas e ação das DNAses que possam contaminar a solução. Deve se ter em conta que descongelações sucessivas podem provocar quebras no DNA.

No laboratório, numa fase inicial do protocolo de extração de fenol/clorofórmio foi preparado o *buffer* de digestão com 50mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA e 0.5% Tween 20. Colocou-se 500µl de *buffer* de digestão nos *ependorfs* com o tecido cortado em pequenos fragmentos.

Adicionou-se 50µl de Proteinase K (5 Prime, Hamburg Alemanha) para digerir as proteínas celulares e colocou-se os *ependorfs* no vortex durante alguns segundos.

Incubou-se a amostra a 55°C *overnight* ou até a lise ficar completa e inativou-se a Proteinase K incubando a 95°C por 10 minutos.

Centrifugou-se (centrifuga - Sigma, Madrid, Espanha) 5 minutos a 13000rpm para separar o material não lisado do restante. Transferiu-se o sobrenadante para um novo *eppendorf* de 1.5ml.

Adicionou-se 550µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), que é eficiente para desproteinizar através da propriedade hidrofóbica das proteínas que apresentam afinidade por solventes orgânicos, deixando a parte orgânica mais densa e agitou-se rapidamente, mas não no vortex para não danificar o DNA, durante cerca de 2 minutos. Centrifugou-se a 13000rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. Removeu-se a fase aquosa (fase superior) para um novo *eppendorfs* de 1.5ml, teve-se cuidado para não tocar na interface, ajudando assim a prevenir contaminações. Repetiu-se a extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico por mais 2 vezes.

Repetiu-se a extração novamente mas desta vez com clorofórmio para retirar os resíduos de fenol. Removeu-se a fase superior para um novo *eppendorf* de 1.5ml e mediu-se o volume aproximado. Adicionou-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5.2 para induzir a precipitação e colocou-se 1 volume de etanol a 95% à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 13000rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet de DNA com 1 volume de etanol a 70% para retirar possíveis impurezas e centrifugou-se a 13000rpm durante 10 minutos. Depois desta lavagem, descartou-se o etanol a 70% e deixou-se o pellet no *eppendorf* virado para baixo sob uma folha de papel para secar durante a noite.

Por último, adicionou-se 50µl de água mili-Q (água desionizada) e armazenou-se a -20°C até à sua manipulação.

## 2.2. NanoDrop

O NanoDrop é um aparelho que se baseia no método espectrofotométrico que é o método mais usado para a determinação do grau de pureza e a concentração de amostras de DNA.

Para a determinação do grau de pureza da amostra, faz-se uma leitura da absorvância a 280nm, sendo que o grau de pureza é frequentemente calculado através do

rácio  $A_{260}/A_{280}$  que deve se situar entre 1.8 a 2.0 para que a amostra seja considerada com grau de pureza aceitável.

No laboratório, colocou-se amostras no NanoDrop para saber qual a concentração de DNA total das amostras e a sua pureza.

### **2.3. Polymerase Chain Reaction ou PCR**

*Polymerase Chain Reaction* ou PCR é uma técnica de Biologia Molecular que permite a amplificação, *in vitro*, de um segmento de DNA de forma seletiva. Para que tal seja possível é imprescindível o conhecimento das sequências de nucleótidos que delimitam a sequência de interesse, sendo que estas vão dar origem os *primers forward* e *reverse*. Os *primers* vão proceder à realização da reação de catálise enzimática possibilitando a amplificação da sequência de interesse.

Com a PCR, através de quantidades mínimas de material genético pode-se amplificar imensas vezes em poucas horas, ajudando assim numa deteção mais rápida e fiável dos marcadores genéticos de doenças infecciosas ou genéticas ou até mesmo cancro.

Esta reação baseia-se no simples processo de replicação que acontece durante o ciclo celular na fase S. Para que tal aconteça é necessário uma serie de intervenientes, sendo estes o PCR buffer sem  $Mg^{2+}$ ,  $MgCl_2$ , dNTPs mix, *primer forward* e *reverse*, *Taq* DNA polimerase,  $H_2O$  mQ e a amostras de DNA.

O PCR buffer fornece o ambiente necessário para a enzima *Taq* DNA polimerase exercer a sua função.

O  $MgCl_2$  vai formar iões  $Mg^{2+}$  (co-fator) que vão formar complexos solúveis com os desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) para produzir o substrato para a polimerase reconhecer, a sua concentração tem que ser a ótima pois o excesso de  $Mg^{2+}$  pode aumentar a ligação não específica dos *primers* produzindo assim um resultado da PCR não específico.

A dNTPs *mix* é uma mistura dos dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) que vai servir de substrato para a enzima.

Os *primers forward* e *reverse* vão fazer a seleção da sequência de interesse alvo da *Taq* DNA polimerase, numa banda vai definir o fim 5' (*primer forward*) e noutra banda o fim com o grupo-OH do átomo de carbono 3' (*primer reverse*) do alvo de amplificação, sendo que a sua sequência e concentração determinam o sucesso global da reação.

A *Taq* DNA polimerase é uma enzima termoestável recombinante da bactéria *Thermus aquaticus*, que é utilizada na amplificação de fragmentos de DNA através da técnica de PCR.

A amostra de DNA é a amostra de onde a PCR vai originar a amplificação e tem que ter um grau de pureza e de integridade do DNA elevado pois influencia o rendimento da PCR.

A PCR baseia-se em três fases: (I) a desnaturação da cadeia de DNA, a uma temperatura bastante elevada, cerca de 94°C, que vai causar a separação das bandas de DNA; (II) *annealing*, há uma diminuição da temperatura para a ligação dos *primers* à cadeia; (III) extensão, há a síntese de DNA à temperatura ótima da enzima *Taq* DNA polimerase, 72°C.

Tabela IV – Caracterização dos *primers* usados na deteção da presença ou ausência do vírus JC nas amostras de estudo.

Designação dos <i>Primers</i> (Stabvida, Caparica, Portugal)	Gene alvo	Sequência de nucleótidos	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Tamanho do amplímero (em pares de bases)
<b>JCTR1 Forward</b>	Antigénio-t de (região de consenso)	5'-cttgggtaagtacaccca-3'	58	347pb
<b>JCTR2 Reverse</b>		5'-atgcaagaactccaccctg-3'		
<b>JCTR3 Forward</b>		5'-tccacacaagtgggctgctt-3'	60	265pb
<b>JCTR4 Reverse</b>		5'-ggtggggacgaagacaagat-3'		

No laboratório, primeiramente preparou-se uma mistura para a reação de PCR, também chamada de *master mix*, com a seguinte constituição:

Componente	Quantidade / 1 reação Volume final=50µl
<b>PCR Buffer (s/ Mg) 10x (Bioron, Ludwigshafen Alemanha)</b>	5µl
<b>MgCl<sub>2</sub> (2 mM) (Bioron, Ludwigshafen Alemanha)</b>	1µl
<b>dNTP Mix (0,2 mM) (Bioron, Ludwigshafen Alemanha)</b>	1µl
<b>Primer Forward</b>	0,5µl
<b>Primer Reverse</b>	0,5µl
<b><i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/µl) (Bioron, Ludwigshafen Alemanha)</b>	0,5µl
<b>H<sub>2</sub>O mQ</b>	Variável

Adaptou-se as quantidades para o número de reações a executar, adicionando um excesso de 10% por precaução de erros de pipetagem. Misturou-se com a micropipeta, pipetando várias vezes suavemente.

Seguidamente transferiu-se 45µl da *master mix* para o microtubo de 0,2µl e adicionou-se 5µl da amostra de DNA. Misturou-se pipetando várias vezes com a micropipeta suavemente.

Deve usar-se sempre um controlo positivo, o plasmídeo pBR322 – BamHI contendo o genoma do JCV-Mad-1, gentilmente cedido por *Kamel Khalili MD PhD* (Investigador do *Neurovirology and Cancer Biology Department, Temple University, Philadelphia- USA*) e um controlo negativo (H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>Q).

E por fim, ligou-se o aparelho de PCR e iniciou-se o programa de amplificação.

Programa de PCR:

94°C – 10 min

94°C – 30seg

58/60°C – 30seg

72°C – 30seg

72°C – 10min

} ×40 ciclos



Figura 20 – Imagem do aparelho de PCR (C1000) utilizado.

Para analisar o resultado da PCR fez-se uma electroforese em gel de agarose a 2%.

#### **2.4. Electroforese em gel de agarose a 2%**

A electroforese em gel de agarose é uma técnica de biologia molecular que é utilizada para separar e estimar o tamanho de biomoléculas, sujeitadas para isso a ação de um campo elétrico. No gel de agarose, as biomoléculas sujeitas a um campo elétrico migram em direção ao polo positivo, pois apresentam carga negativa dos grupos fosfato a pH neutro, de acordo com a razão carga/massa. A estimativa é feita de acordo com as suas diferentes mobilidades no campo elétrico, com base na comparação da distância

percorrida pelos fragmentos com a distância percorrida pelos fragmentos de peso molecular conhecido fornecidos pelo padrão de pesos moleculares.

A agarose é um polissacarídeo, que vai formar uma matriz porosa que prende as biomoléculas durante a migração e que permite uma passagem mais rápida de biomoléculas de dimensões mais pequenas, que vão migrar mais do que as de maiores dimensões.

Para delinear a electroforese é necessário ter em conta os fatores que influenciam a mobilidade dos fragmentos do DNA:

- Peso molecular, com o aumento do tamanho da biomolécula há um maior atrito com a matriz, menor velocidade de migração;
- Concentração da agarose, o aumento da concentração de agarose leva à diminuição da migração electroforética, ou seja, quanto maior a concentração do gel menor será a porosidade e por tanto menor o fragmento de DNA que poderá ser separado, contudo quanto maior a concentração do gel menos frágil ele se torna;
- Voltagem aplicada, a voltagem deve ser regulada tendo em conta o tamanho dos fragmentos que queremos visualizar, sendo que para fragmento de maiores dimensões deve-se aplicar uma voltagem mais baixa 80-130;
- Tampão de electroforese, o tris/borato (TBE) tem uma boa capacidade de tampão, pois permite obter uma excelente resolução e definição dos fragmentos de DNA no gel de electroforese;
- Brometo de Etídeo, substância mutagénica, é um corante fluorescente quando é exposto a radiação ultravioleta e como tem a propriedade de se intercalar entre pares de bases do DNA possibilita a visualização das bandas no transiluminador de luz ultravioleta.

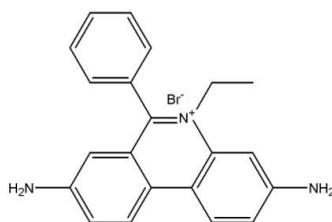


Figura 21 – Estrutura química do brometo de etídeo ( $C_{21}H_{20}BrN_3$ ).

No laboratório este processo baseia-se em duas fases:

#### **2.4.1. Preparação do gel de agarose a 2%:**

Preparou-se uma solução de agarose em tampão TBE 1× com concentração final de 2% (p/v). Aqueceu-se a mistura com agitação frequente, até toda a agarose se dissolver e a solução ferver.

Deixou-se arrefecer um pouco a solução e enquanto isso preparou-se o suporte do gel, selando as laterais com fita adesiva. Colocou-se o pente em posição conveniente no suporte.

Acrescentou-se o Brometo de Etídeo (0,5µg/ml) (Sigma, Madrid, Espanha) e misturou-se com agitação leve, e com bastante cuidado na sua manipulação. Esta solução é um agente mutagénico potente, deve ser manuseado com luvas e colocar todo o material que tenha entrado em contato com ele num recipiente próprio.

Verteu-se a solução para o suporte devidamente selado. Eliminou-se as bolhas de ar que se formaram, com uma micropipeta e deixou-se polimerizar à temperatura ambiente.

Após a polimerização, colocou-se o gel na tina de electroforese, de modo a que os poços estejam do lado do eléctrodo negativo. Retirou-se lentamente o pente para não danificar os poços, e adicionou-se tampão TBE até aproximadamente 1mm acima do gel.

#### **2.4.2. Preparação das amostras:**

Para cada amostra, misturou-se no parafilme:

- 6µl de DNA
- 2µl de tampão de corrida (Loading Buffer), que é um composto de elevada densidade que possibilita a visualização da migração das moléculas durante a electroforese.

Aplicou-se as amostras nos respetivos poços, enchendo lentamente cada poço com uma micropipeta. No último poço, colocou-se o padrão de pesos moleculares (Ladder 100pb) (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), que é formado por uma mistura de vários fragmentos de tamanho conhecido.

Colocou-se a tampa da tina. Verificou-se que as amostras estavam colocadas do lado do pólo negativo (cátodo, elétrodo de cor preta) e que a migração será no sentido do pólo positivo (ânodo, elétrodo de cor vermelha).

Ligou-se os cabos à fonte de voltagem e amperagem, seguidamente ligou-se a fonte e regulou-se para uma voltagem adequada, que deve ter em conta diversos fatores como por exemplo o tamanho do gel e o tamanho das cadeias que se pretendem ver amplificadas. Verificar sempre se há desprendimento de bolhas dos elétrodos devido à eletrólise e se, passados alguns minutos, o azul de bromofenol já começou a migrar no sentido correto.

Após a migração adequada (por avaliação da posição do azul de bromofenol a sensivelmente 3/4 do comprimento do gel), desligou-se a corrente elétrica na fonte e seguidamente os cabos e retirou-se a tampa da tina. Retirou-se o gel cuidadosamente para não partir e analisou-se sob radiação ultravioleta no transiluminador.

No fim tirou-se uma fotografia no Chemidoc.

### **3. Métodos experimentais para sequenciação de DNA**

A sequenciação de DNA é uma técnica de biologia molecular, consiste na determinação da sequência exata dos nucleótidos constituintes do DNA, através de um conjunto de processos seguidamente descritos.

#### **3.1. *Polymerase Chain Reaction* ou PCR**

Pipetou-se 2µl de amostra de DNA em cada microtubo e colocou-se a desnaturar no termociclador com o seguinte programa:

- 95°C durante 5 minutos
- Conservar a 4°C

Enquanto as amostras estavam a desnaturar, preparou-se a *master mix* para a PCR com a seguinte constituição:

Componente	Quantidade / 1 reação (Volume final=50µl)
PCR Buffer (s/ Mg) 10x	5µl
MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	1µl
dNTP Mix (0,2 mM)	1µl
Primer Forward	0,5µl
Primer Reverse	0,5µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,5µl
H <sub>2</sub> O mQ	Variável

Tabela V – Caracterização dos *primers* usados na sequenciação da p53 nas amostras de estudo.

Designação dos Primers (Stabvida, Caparica, Portugal)	Exões alvo	Sequência de nucleótidos	Temperatura de annealing (em °C)
P53E1Forward P53E1Reverse	1	5'-gctcaagactggcgctaaaa-3' 5'-atgagtcctctctgagtcac-3'	60 ou 63
P53E2/3Forward P53E2/3Reverse	2/3	5'-aagtgtctcatgctggatcc-3' 5'tggtcctctgactgctctt-3'	
P53E4Forward P53E4Reverse	4	5'-tggctctctgactgctctt-3' 5'ctggctccatgagactca-3'	
P53E5/6Forward P53E5/6Reverse	5/6	5'-cacttgtgccctgacttca-3' 5'-ttaagggtggtgctcagtg-3'	
P53E7Forward P53E7Reverse	7	5'-cttcagtgagctgagatca-3' 5'-cccaccttaccgatttct-3'	
P53E8/9Forward P53E8/9Reverse	8/9	5'-taaatgggacagtaggacc-3' 5'-gggaccttattcaagtgga-3'	

Retirou-se os microtubos do termociclador após a desnaturação para um suporte dentro de uma caixa de gelo, pois eles ficam no aparelho conservados a 4°C e deve se manter a temperatura, e adicionou-se a mix às amostras.

Por fim, colocou-se novamente os microtubos no termociclador com o seguinte programa de amplificação:

- 96°C – 1 min
  - 96°C – 1 min
  - 60°C – 30seg
  - 72°C – 1min
  - 72°C – 10min
  - Conservar a 4°C
- } ×40 ciclos

### **3.2. Electroforese em gel de agarose 2%**

### **3.3. Purificação dos produtos da PCR**

Pipetou-se para novos microtubos 10µl de amostra e adicionou-se 1.50µl de exosap, que é um reagente que auxilia na remoção *primers* e nucleótidos das reações anteriores de PCR.

Colocou-se os microtubos no termociclador como o seguinte programa:

- 37°C durante 30min
- 80°C durante 15min
- Conservar a 12°C

### **3.4. PCR de sequenciação**

Preparou-se a *master mix* com a seguinte composição:

Componente	Quantidade / 1 reação (Volume final=20µl)
H <sub>2</sub> O mQ	13 µl
Tampão 5x	2µl
B.D. Versão II	2µl
Primer Forward	1µl

Numa caixa de gelo, pipetou-se 18µl da *master mix* para novos microtubos e adicionou-se 2µl da amostra de DNA e colocou-se no termociclador com o seguinte programa:

- 96°C durante 10seg
  - 50°C durante 5seg
  - 60°C durante 4min
  - Conservar a 4°C
- } \*25ciclos

### **3.5. Purificação dos produtos de sequenciação**

Colocou-se as colunas nos tubos e pipetou-se 650µl de Sefadex, tapou-se os tubos com as tampas, mas não se fechou totalmente e colocou-se na centrifuga durante 1minuto a 2000rpm.

Retirou-se as colunas com a resina formada para os novos *ependorfs* e adicionou-se o total da amostra (20 $\mu$ l) sobre a resina e colocou-se os tubos abertos, com a tampa do *ependorfs* virada para o centro da centrífuga, fechou-se e centrifugou-se novamente durante 1 minuto a 2000rpm.

Após a centrifugação retirou-se as colunas dos *ependorfs* e fechou-se a tampa e conservou-se a -4°C.

### **3.6. Sequenciação**

Numa placa de sequenciação colocou-se em cada poço 18 $\mu$ l e adicionou-se 2 $\mu$ l da amostra.

Introduziu-se os dados de cada amostra no computador no respetivo programa, definiu-se a versão da corrida, o protocolo instrumental e o protocolo de análise e colocou-se a placa devidamente no sequenciador, iniciando-se de seguida todo o procedimento.



Figura 22 – Imagem do aparelho utilizado na sequenciação da p53.

## **4. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram apresentados sob a forma frequências absolutas (número de amostras com a característica estudada/número de amostras total) e/ou relativas (frequência absoluta \* 100%). Foi feita uma comparação entre ambos os grupos e entre amostras de cada grupo, pelo teste de  $\chi^2$ , bilateral, ( $P < 0.05$ ), com o auxílio de uma estimativa aproximada do “risco”, *Odds ratio*, que mede a força de associação entre duas variáveis e com os respetivos intervalos de confiança (IC) para um nível estatístico de 95%.



#### **IV. Resultados e discussão**



## 1. Deteção de sequências de DNA do vírus JC em amostras de biópsia colo-retal

Após a amplificação das amostras clínicas, pela técnica de *Nested-PCR* e posterior visualização por electroforese horizontal em gel de agarose, verificou-se positividade para a presença de sequências de DNA do JCV na maioria das amostras do grupo de estudo, nomeadamente em 18 de 22 (81.8%) de adenocarcinomas; em 15 de 22 (68.2%) de mucosa adjacente; e em 13 de 22 (59.1%) de mucosa não adjacente. No entanto, verificar-se uma ligeira diminuição da deteção de DNA do JCV à medida que a amostra colhida se distancia mais da lesão (Tabela VI) ([Theodoropoulos et al. 2005](#)) ([Mou et al., 2012](#)).

Tabela VI – Frequências absolutas e relativas da presença de DNA do vírus JC em três tipos de amostras (adenocarcinoma, mucosa adjacente e não adjacente) dos indivíduos do grupo de estudo.

	Frequência absoluta	Frequência relativa
Adenocarcinoma	18 (22)	81.8%
Mucosa adjacente	15 (22)	68.2%
Mucosa não adjacente	13 (22)	59.1%

No grupo de estudo, os três tipos de amostras comportam-se de maneira semelhante. Tanto em adenocarcinoma como em mucosas, adjacente e não adjacente, a presença de sequências de DNA do JCV predomina. Todavia, há uma tendência para o aumento da frequência relativa no caso da lesão, especificamente adenocarcinoma *versus* as restantes mucosas, que não é muito significativo tendo em conta o baixo número do total de amostras (n=22) (Figura 23).

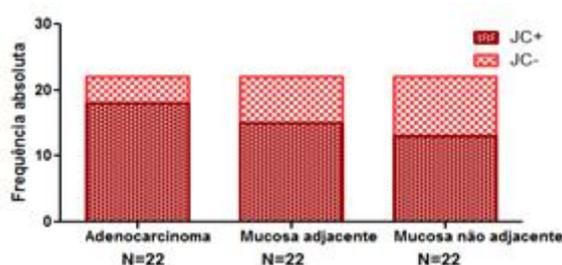


Figura 23 – Frequências absolutas de amostras do grupo de estudo, quer na presença de sequências de DNA do vírus JC (JCV+), quer na ausência (JCV-), colhidas de adenocarcinoma e de mucosas adjacente e não adjacente a este.

Esta distribuição aparenta uma relação entre o JCV e a lesão, seja ela de causa-efeito, num sentido ou no inverso, ou de mera coincidência.

Ao estimar-se o “risco” da presença vs a ausência de DNA de JCV em adenocarcinoma e em mucosas, adjacente e não adjacente, verificamos que não existem diferenças significativas entre quaisquer combinações do grupo de estudo (Tabela VII). Este resultado pode dever-se ao fato da amostra colhida, de forma aleatória e de reduzido tamanho, poder não ser representativa de toda a mucosa colo-retal, devido à diferente distribuição do vírus na mucosa, que pode ser mais ou menos homogênea.

Ainda assim, podemos verificar que, nas amostras do grupo de estudo, se comprova a existência de uma forte ligação entre a presença do DNA do JCV e o estado lesional, seja em adenocarcinoma, em si, seja em mucosas, adjacente e não adjacente.

Tabela VII – Estimativa de “risco” e intervalos de confiança (IC95%) da presença de DNA do vírus JC em adenocarcinomas *versus* mucosas em indivíduos do grupo de estudo.

		Estimativa do “risco” (RC)	Intervalo de confiança (IC95%)	Significância
Adenocarcinoma	vs	2.100	0.5142-8.576	*
mucosa adjacente				
Adenocarcinoma	vs	3.115	0.7859-12.35	*
mucosa não adjacente				

\*=não tem significância

No grupo-controlo, verificou-se positividade quanto à presença de sequências de DNA do JCV em 5 de 21 amostras de mucosa colo-retal (23.8%) (Tabela VIII e Figura 24). Esta elevada ausência de DNA do vírus JC em amostras de mucosa normal (indivíduos sem CCR) é semelhante à já descrita por Mou et al., 2012.

Tabela VIII – Frequência absoluta e relativa da presença de DNA do virus JC em amostras de mucosa de individuos do grupo-controlo.

	Frequência absoluta	Frequência relativa
Mucosa	5 (21)	23.8%

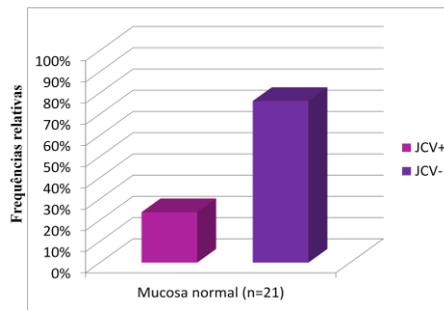


Figura 24 – Frequências relativas de amostras de mucosa colo-retal do grupo-controlo, quer na presença do vírus JC (JC+) quer na sua ausência (JC-).

Estimou-se um maior “risco” da presença de DNA do JCV em adenocarcinoma (grupo de estudo) do que em mucosa normal (grupo-controlo), o qual é significativo (RC=14.40; IC<sub>95%</sub>=3.286-63.11) (Figura 25).

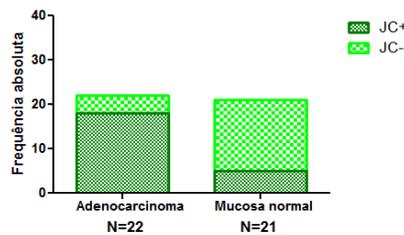


Figura 25 – Comparação entre as frequências absolutas de adenocarcinoma colo-retal (grupo de estudo) e de mucosa colo-retal (grupo-controlo), quer na presença (JCV+) quer na ausência (JCV-) do vírus JC.

Quanto à estimativa do “risco” da presença de DNA do JCV é significativamente maior (RC=6.857; IC<sub>95%</sub>=1.265-6.481) em mucosa adjacente (grupo de estudo) do que em mucosa normal (grupo-controlo) (Figura 26).

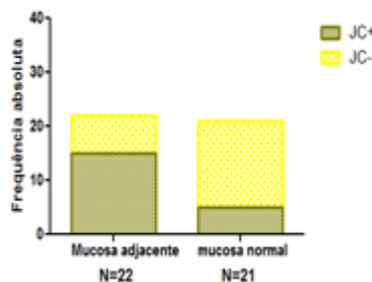


Figura 26 – Comparação entre as frequências absolutas de mucosa colo-retal adjacente (grupo de estudo) e de mucosa colo-retal (grupo-controlo), quer na presença (JCV+) quer na ausência (JCV-) do vírus JC.

Estimando do “risco” da presença de DNA do JCV em mucosa não adjacente (do grupo de estudo) é significativamente maior ( $RC=4.333$ ;  $IC_{95\%}=1.155-16.25$ ) do que em mucosa normal (grupo-controlo) (Figura 27).

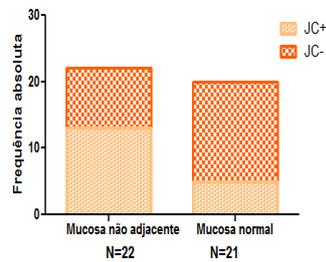


Figura 27 – Comparação entre as frequências absolutas de mucosa colo-retal não adjacente (grupo de estudo) ao adenocarcinoma e de mucosa colo-retal (grupo-controlo), quer na presença (JCV+) quer na ausência (JCV-) do vírus JC.

Quanto à estimativa do “risco” da presença de DNA do JCV em mucosas adjacente versus não adjacente, ambas do grupo de estudo, não é significativamente diferente ( $RC=1.484$ ;  $IC_{95\%}=0.4310-5.107$ ) (Figura 28).

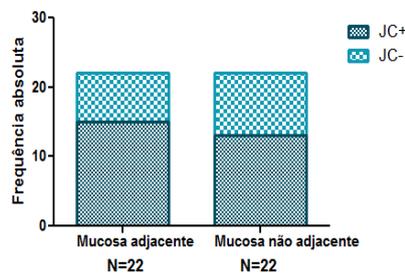


Figura 28 – Comparação entre as frequências absolutas de mucosa colo-retal adjacente e não adjacente ao adenocarcinoma, quer na presença (JC+) quer na ausência (JC-) do vírus JC.

Todas estas observações demonstram que, provavelmente, dependendo do seu tropismo e do local onde este se acumula, poderão existir processos distintos de infeção no organismo hospedeiro.

Por fim, segue-se o escalonamento das frequências relativas da presença e ausência de DNA do JCV em todas as amostras avaliadas (Tabela IX).

Tabela IX – Frequências relativas da presença de DNA do JCV (JC+) e ausência (JC-) em amostras, adenocarcinoma, mucosa adjacente e não adjacente, de indivíduos do grupo de estudo e amostras de mucosa normal do grupo-controlo.

	Frequência relativa	Presença/Ausência
Adenocarcinoma	81.8%	JCV+
Mucosa normal (controlo)	76.2%	JCV-
Mucosa adjacente	68.2%	JCV+
Mucosa não adjacente	59.1%	JCV+
Mucosa não adjacente	40.9%	JCV-
Mucosa adjacente	31.8%	JCV-
Mucosa normal (controlo)	23.8%	JCV+
Adenocarcinoma	18.2%	JCV-

A diminuição das frequências de indivíduos com DNA do JCV parece ser progressivamente maior partindo da lesão central, adenocarcinoma, para a periferia, isto é, passando pela mucosa adjacente e acabando na mucosa não adjacente (tropismo).

Comparando a presença do JCV em amostras de adenocarcinoma, em relação ao sexo e à idade (Tabela X), numa análise apenas qualitativa, devido ao número total de amostras ser reduzido (n= 22), verifica-se que, aparentemente, as frequências relativas não se diferenciam muito nos dois sexos e as absolutas diferem muito quanto à idade.

Tabela X – Frequências absoluta (FA) e relativa (FR) de deteção de DNA do vírus JC nas amostras de adenocarcinoma em relação ao género e à idade.

	FA	FR
Homens	12/14	85.7%
Mulheres	6/8	75%
≤64 anos	2/2	100%
>64 anos	16/20	80%

## 2. Deteção de polimorfismos na sequência da p53 em amostras de biópsia colo-retal

Após a amplificação das amostras, por PCR, usando *primers os* adequados para cada exões da p53 e posteriores purificação e sequenciação, no grupo de estudo, em adenocarcinoma e em mucosa, adjacente e não adjacente e em mucosa do grupo-controlo, verificou-se a existência de algumas mutações abaixo descritas (Tabela XI).

Tabela XI– Mutações encontradas na sequência da p53 em amostras humanas de adenocarcinoma, mucosa adjacente e não adjacente do grupo de estudo (GE) e em mucosa do grupo-controlo (GC).

	Caso nº	Nº do exão	Nº do codão	Codão WT	Codão mut	Alteração do aa	aa WT	aa mut	Varição	Mutação descrita
GE e GC	1	4	72	CGC	CCC	sim	Arg	Pro	Polimorfismo G -> C	P.Pro72Arg
	2	6	213	CGA	CGG	não	Arg	Arg	Polimorfismo A->G	P.Arg213Arg
	2	Intrão 2	11818 pb	CAC	CCA				Inserção de C	Não
	3	Intrão 2	11827 pb	GAC	CAC	sim	Asp	His	Mutação	C.74+38 C>G
	4	Intrão 2	11874 pb	ATG	CAT				Inserção de C	Não

WT - *wild type*; mut – mutante; aa – aminoácido; Arg – arginina; Pro – prolina

Tabela XII – Frequências relativa e absoluta da presença de pelo menos uma alteração na sequência da proteína p53, nos exões 1 – 9, em indivíduos do grupo de estudo.

	Exão 1		Exões 2/3		Exão 4		Exões 5/6		Exão 7		Exões 8/9	
	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA	FR	FA
<b>A</b>	0 (12)	0%	11 (11)	100%	2 (7)	28.6%	1 (8)	12.5%	0 (6)	0%	0 (11)	0%
<b>B</b>	0 (12)	0%	11 (11)	100%	5 (10)	50%	1 (4)	25%	0 (7)	0%	0(6)	0%
<b>C</b>	0 (12)	0%	8 (8)	100%	5 (9)	55.6%	1 (4)	25%	0 (8)	0%	0 (12)	0%

FR – frequência relativa; FA – frequência absoluta; A – adenocarcinoma; B – Mucosa adjacente; C – Mucosa não adjacente.

Estes resultados, apoiados por (Fan et al., 2000) (Pleasents &Hansen, 1994) (Santos et al., 2004) (Carbone et al., 1991), parecem mostrar que no exões 1,7 e 8/9 há uma tendência para não ocorrer qualquer tipo de alteração genética, havendo nos restantes exões e no intrão 2.

Nos exões 2/3 não se encontrou quaisquer alterações nas sequências, apesar de se ter encontrado duas inserções de 2 nucleótidos de citosina e uma alteração de um nucleótido de guanina para citosina no intrão que os separa, à semelhança do grupo de controlo. Não se sabe ainda qual a função do intrão, se é que a tem, e se estas alterações genéticas interferem com a atividade de exões.

À semelhança do que se passa no grupo de estudo, no grupo-controlo as alterações referidas que ocorrem no intrão (entre o exão 2 e o 3) apresentam elevada frequência, independentemente se na mucosa normal está presente ou não o DNA do JCV (Tabela XIII).

Tabela XIII – Frequências relativa e absoluta da presença de pelo menos uma alteração na sequência da proteína p53, nos exões 2 – 6, em indivíduos do grupo-controlo, com presença e ausência de DNA do vírus JC na mucosa normal.

	Exões 2/3		Exão 4		Exões 5/6	
	FR	FA	FR	FA	FR	FA
<b>M+</b>	7 (7)	100%	0 (6)	0%	0 (4)	0%
<b>M-</b>	7 (7)	100%	1 (9)	11%	2 (5)	40%

M+ - mucosa normal positivo para o vírus JC; M- - mucosa normal negativa para o vírus JC; FR – frequência relativa; FA – frequência absoluta.

Ao comparar-se o comportamento de grupos quanto ao número total de mutações ou ao número de amostras com pelo menos uma mutação, verificou-se que, em relação a esta última característica, em mucosa adjacente do grupo de estudo, com a presença de JCV, esse número é significativamente diferente ( $\chi^2 = 4.406$  e  $P < 0.05$ ) do observado em mucosa do grupo controlo, também com a presença de vírus. Apesar disto, não há significância, quando se pretende estimar o “risco” (RC = 12.69; IC = 0.5831-276.3) de

haver um maior número de amostras com mutações no primeiro grupo do que no segundo.

Em nenhuma outra comparação de grupos, relacionando o número total de mutações ou o número de amostras com pelo menos uma mutação e em nenhuma estimativa do risco entre os mesmos grupos, jamais há significância estatística.

Todavia, há, com frequência, tendência para distintas estimativas do risco, entre grupos. Por exemplo, comparando o adenocarcinoma do grupo de estudo com a mucosa normal do grupo controle, denota-se que há uma tendência para o aumento do número de amostras com mutação nos adenocarcinomas face ao existente na mucosa normal do grupo controle (RC=2.167 e IC<sub>95%</sub>=0.2988-15.71). O mesmo sucede como comportamento da mucosa adjacente quando comparada com o grupo controle (RC=5.571 e IC<sub>95%</sub>=0.8797-14.29).

Dentro do grupo controle, comparando o comportamento das mucosas, com presença de JCV *versus* a com ausência de JCV (RC=0.1733 e IC<sub>95%</sub>=0.006969-4.311), mostra-se uma tendência para a diminuição do número de amostras com mutação nas mucosas com presença de JCV.

Atendendo à comparação do comportamento, com ausência do JCV, da mucosa adjacente do grupo de estudo com a mucosa normal do grupo-controle (RC=3.000 e IC<sub>95%</sub>=0.1221-73.70) e da mucosa não adjacente do grupo de estudo com a mucosa normal do grupo-controle (RC=1.500 e IC<sub>95%</sub>=0.1454-15.47), observa-se em ambos uma tendência para o aumento do número de mutações nas mucosas adjacente e não adjacente, apesar dessa tendência diminuir da mucosa adjacente para a não adjacente.

Comparando o comportamento, com presença do JCV, do adenocarcinoma do grupo de estudo com a mucosa normal do grupo-controle (RC=5.769 e IC<sub>95%</sub>=0.2320-143.5) e da mucosa adjacente do grupo de estudo com a mucosa normal do grupo-controle (RC=12.69 e IC<sub>95%</sub>=0.5831-276.3), observa-se em ambos uma tendência para o aumento do número de mutações no adenocarcinoma e na mucosa adjacente, apesar dessa tendência aumentar do adenocarcinoma para a mucosa adjacente. Esta tendência também se verifica no caso da mucosa não adjacente com presença de vírus do grupo de estudo (RC=4.000 e IC<sub>95%</sub>=0.4468-35.81).

A função normal da proteína p53 é ser uma potente barreira para o cancro. No CCR, as alterações na sequência da p53, quer afetando os domínios estruturais quer os funcionais, podem refletir-se ao nível da transição adenoma-carcinoma limitando severamente a sobrevivência celular, facilitando o crescimento contínuo e a aquisição de propriedades invasivas face a vários tipos de stress, danificando a sequência durante a carcinogénese.

Estas alterações em casos de tumores são específicas, pois levam à perda da função transcricional na regulação dos principais genes-alvo e interferem com todo o processo apoptótico celular diminuindo-o. Se as alterações forem em regiões conservadas evolutivamente são associadas normalmente a tumores agressivos e à quimio-resistência.

Estudos feitos mostram que muitas proteínas p53 mutantes podem inibir a função normal da p53, estas proteínas mutantes podem também adquirir novas funções e variar a sua oncogenicidade.

Apesar de mais de 90% dos polimorfismos na p53 não ocorrerem em sequências codificantes (Whibley et al., 2009), estão descritas mutações relevantes para a carcinogénese.

Mais de 85% das mutações da p53 estudadas nos carcinomas colo-retais são mutações *missense*. Estas mutações quebram a proteína ou os seus domínios funcionais ou o resultado do isolamento da proteína na sua inativação, aumentando a angiogénese tumoral, resultando na progressão do tumor, diminuindo a sobrevivência dos doentes.

O polimorfismo P.Pro72Arg (exão 4), correspondente a uma alteração G->C é uma mutação comum na população (>50%) (Whibley et al., 2009), o que aparentemente é corroborado pelos resultados do presente trabalho. Estudos anteriores revelaram uma associação entre este alelo e o cancro, com baixos níveis de transcrição da p53, sugerindo que este polimorfismo causa uma alteração no processamento do mRNA, promovendo um possível base para o aumento associado no risco de desenvolvimento de cancro (Whibley et al., 2009).

No entanto há também mutações silenciosas, como por exemplo o polimorfismo no codão 213 (exão 6) no genoma da p53. Esta mutação é um polimorfismo raro, descrito pelo grupo de Carbone (1991), em cancro do pulmão e da mama, o que aparentemente é reforçado pelos resultados do presente trabalho.

Nos exões 2/3 não foi encontrada qualquer mutação, mas na sequência do intrão que separa estes dois exões foram encontradas três alterações, duas inserções de um nucleótido de citosina e um polimorfismo G->C. Como é na região do intrão não se conhece ainda qualquer função desta. As duas inserções ainda não se encontram descritas, mas o polimorfismo G->C está descrito pelo grupo de Pleasants & Hansen (1994).

É importante o desenvolvimento de terapias génicas para prevenção, modulação e tratamento desta patologia. A p53 geralmente confere à célula tumoral sensibilidade para a quimio-radiação. Assim a p53 tornou-se um alvo para o desenvolvimento de fármacos anti-tumorais (Wang & Sun, 2010). Alguns grupos já propuseram algumas terapias, como é o exemplo do grupo de Palmer (2002).

O grupo de Palmer (2002) desenvolveu potenciais tratamentos para o CCR. Com a informação pré-clínica destes, foram feitos alguns ensaios clínicos. Os resultados dos ensaios de primeira fase provaram a segurança dos reagentes, mas não demonstraram benefícios terapêuticos significativos. Para contrariar isto o grupo propôs-se melhorar a potencia anti-tumoral, a eficiência da libertação génica e a precisão dos genes-alvo.

Os potenciais tratamentos desenvolvidos foram: a estimulação imunológica, recorrendo, independentemente, ao antigénio HLA e a citoquinas para estimular a resposta das células-T e ao antigénio carcino-embriónico (CEA), potencialmente uma vacina; a correção do gene mutante, nomeadamente do supressor tumoral p53; a ativação de um pró-fármaco, através da citosina desaminase/5-fluorocitosina e nitroreductase/ pró-fármaco CB 1954; a terapia com vírus oncolítico modificada geneticamente, como por exemplo utilizando o adenovírus oncolítico entre outros; a transferência de gene mielo-protetor em conjugação com a quimioterapia; a terapia com oligonucleótido *antisense*; o uso de fármacos ativos na transcrição; e a terapia génica com vetores bacterianos (Palmer et al., 2002).

O grupo de Wang & Sun (2010) propôs o desenvolvimento de três classes de moduladores da p53, que podem ser usados independentemente ou em combinação com a quimio-radiação mediante: a reintrodução da p53 *wild-type* recorrendo ao adenovírus, Ad-p53; a eliminação da p53 mutante, utilizando o adenovírus, ONYX-015, com maior efeito quando combinado com quimioterapias; o uso de pequenas moléculas, que interferem na reativação da p53 e na indução da apoptose das células tumorais, como por exemplo a molécula RITA, que tem efeito na supressão do crescimento celular tumoral.

## V. Conclusões



Na mucosa colo-retal, a presença de JCV é a exceção em grupo-controlo e a regra em grupo com adenocarcinoma.

Entre a referida presença e a lesão, parece haver uma forte ligação, que pode ser de causa-efeito, direta ou indireta, sendo a lesão a causa ou o efeito, ou apenas coincidência.

Parece existir algum tropismo do vírus JC pela lesão de adenocarcinoma.

A presença do JCV tende a ser máxima na lesão, tendencialmente menor na mucosa adjacente e ainda menor na não adjacente.

Parece haver uma tendência para um aumento do risco de ocorrerem mutações em adenocarcinoma colo-retal, em mucosa adjacente e não adjacente.

A comprovar-se este aumento e atendendo aos mecanismos patogénicos derivados da presença de algumas mutações será aconselhado desenvolver estratégias terapêuticas que as previnam, as modulem ou as tratem.



## **VI. Referências bibliográficas**



## **Referências Bibliográficas**

1. Abraham, L. K. (2002). *Histology and cell Biology: an introduction to pathology*. St. Louis: Mosby. ISBN 0-323-01639-1.
2. Alexander N., Wong C.S., & Pignatelli M. (2002). Catenin: a linchpin in colorectal carcinogenesis? *J. Pathol*, 160: 389–401.
3. Amaro P. (2003). Endoscopia e pólipos do cólon I. Diagnóstico, terapêutica e vigilância dos doentes com pólipos do cólon e recto. *Endonews*, nº 7.
4. Barcelos, A.; Endocardite infecciosa por *Streptococcus bovis* em paciente com carcinoma colônico autores Alexandre Maulaz Barcelos; Marco Antônio Teixeira; Lidianny Silva Alves; Marcelo Antunes Vieira; Marcus Lima Bedim; Noely A. Ribeiro local Brasil revista Scielo Brasil, 2009>.
5. Baron JA, Cole BF, Sandler RS, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2003;348:891–9.
6. Behbahani BA, Klapper PE, Valley PJ, et al. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridization. *J Clin Virol*. 2004;9:224-9.
7. Berger JR, Concha M. 1995. Progressive multifocal leukoencephalopathy: The evolution of a disease once considered rare. *JNeurovirol* 1:5–18.
8. Bofill-Mas S., Clemente-Casares P., Major E.O., Curfman B. & Girones R. (2003). Analysis of the excreted JC virus strains and their potential oral transmission. *J Neurovirol*, 9:498–507.
9. Bofill-Mas S., Formiga-Cruz M., Clemente-Casares P., Calafell F., Girones R. (2001). Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Neurovirol*, Nov. 2001, p. 10290-10299.
10. Boland, C.R., Luciani, M.G., Gashe, C., Goel, A. (2005). Infection, inflammation, and Gastrointestinal Cancer : *Gut* 2005; 54:1321-1331.
11. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005;352:1092–192.

12. Campos, F. et al., (2003). Manifestações extracolônicas da polipose adenomatosa familiar: incidência e impacto na evolução da doença..Arquivo de gastroenterologia vol.40 São Paulo abril/junho ISSN 0004-2803.
13. Carbone D., et al. (1991). Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene*. 6:1691-1692.
14. Chesters PM, Heritage J, McCance DJ. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 1983;147:676–82.
15. Coelho, T.R., Almeida L. & Lazo P.A. (2010). JC virus in the pathogenesis of colorectal cancer, an etiological agent or another component in a multistep process? *Virology Journal*, 7:42.
16. Cole C.N. (1996). Polyomavirinae: the viruses and their replication,. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fundamental virology*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. p. 917–946.
17. Cravo M. (2000) Tumores do Cólon e do Recto. Diagnóstico precoce. In: Quina MG, ed. *Gastroenterologia clínica*. Lousã: Lidel:499-505.
18. Dang X., Wüthrich C., Gordon J., Sawa H., Koralnik I. (2012). JC virus encephalopathy is associated with a novel agnoproteína-deletion JCV variant. *PLoS ONE* ([www.plosone.org](http://www.plosone.org)) April 2012, Volume 7, Issue 4, e35793.
19. Daniel A. M., Swenson J. J., Mayreddy R. P., Khalili K. & Frisque R. J. (1996). Sequences within the early and late promoters of archetype JC virus restrict viral DNA replication and infectivity. *Virology* 216:90–101.
20. Darbinyan A, Darbinian N, Safak M, Radhakrishnan S, Giordano A, Khalili K. 2002. Evidence for dysregulation of cell cycle by human polyomavirus, JCV, late auxiliary protein. *Oncogene* 21:5574– 5581.
21. Darbinyan A., Siddiqui K.M., Slonina D., Darbinian N., Amini S., White M.K. & Khalili K. (2004). Role of JC Virus Agnoprotein in DNA Repair. *J Virology*, 78 (16): 8593–8600.
22. Darbinyan A, White MK, Akan S, Radhakrishnan S, Del Valle L, Amini S, Khalili K. 2007. Alterations of DNA damage repair pathways resulting from JCV infection. *Virology* 364:73–86.
23. Del Valle, L. , Khalili, K. (2010) . Detection of Human Polioma vírus Proteins, T-Antigen and Agnoproteína, in Human Tumor Tissue Arrays: *Journal of Medical Virology* 82:806-811.

24. Del Valle L, Piña-Oviedo S. 2006.HIV disorders of the brain: Pathology and pathogenesis. *Front Biosci* 11:718–732.
25. DiMaio D. & Liao J.B. (2006). Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Virus Res.*; 66:125-59.
26. Eaden J. Review article: the data supporting a role for aminosalicylates in the chemoprevention of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18(suppl 2):15–21.
27. Enam S., Del Valle L., Lara C., Gan D.D., Ortiz-Hidalgo C., Palazzo J.P. & Khalili K. (2002). Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin. *Cancer Res*, 2:7093–7101.
28. Esperança Pina J. A. “Anatomia humana dos órgãos” 2ª edição, 2010, Lidel, ISBN: 9789727576623, pags 137 a 176.
29. Faias S., Correia J.D., Chaves P. & Leitão C.N. (2004). Pólipos do cólon e recto. Diagnóstico e vigilância. 144 Cadernos de formação em gastroenterologia. GE Vol. 11.
30. Fan R. et al.(2000). The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9:1037-1042.
31. Fearon, E.; “Molecular genetics of colorectal cancer” (2011) *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2011.6:479-507.
32. Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C. & Parkin D.M. (2001). Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 IARC CancerBase No. 5 [CD-ROM]. Version 1.1. Lyon: IARCPress.
33. Gardner & Knowles (1995) *Human polyomaviruses – Principles and practical clinical virology*, 3ª edição, p. 635-651.
34. Gasche C, Goel A, Natarajan L, et al. Mesalazine improves replication fidelity in cultured colorectal cells. *Cancer Res* 2005; 65:3992-7.
35. Gaspar, R. Associação do poliomavírus JC com pólipos colo-rectais humanos. Coimbra:2010. Dissertação apresentada à Fac. De Ciência e Tecnologias da Universidade de Coimbra.
36. Goel A, Chang DK, Ricciardiello L, et al. A novel mechanism for aspirinmediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9:383–90.
37. Gordon J. & Khalili K. (1998). The human polyomavirus, JCV, and neurological diseases. *Int. J. Mol. Med.*,1: 647–655.

38. Guarner, F. (2006). Enteric flora in health and disease. *Digestion*; 73 Suppl 1:5 – 12.
39. Hallervorden J. Eigennartige und nicht rubriziebare Prozesse. In: Bumke O, ed. *Handbuch der Geisteskrankheiten. Vol 2. Die Anatomie der Psychosen.* Berlin: Springer, 1930:1063 – 107.
40. Hamilton, S.R. & Aaltonen, L.A. (2000). Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. World Health Organization Classification of Tumours. Chapter 6: Tumours of the colon and rectum.
41. Henson J.W., Schnitker B.L., Lee T.S. & McAllister J. (1995). Cell-specific activation of the glial-specific JC virus early promoter by large T antigen. *J. Biol. Chem.*, 270: 13240– 13245.
42. Hori R., Murai Y., Tsuneyama K., Abdel-Aziz H.O., Nomoto K., Takahashi H., Cheng C.M., Kuchina T., Harman B.V. & Takano Y. (2005). Oct. Detection of JC virus DNA sequences in colorectal cancers in Japan. *Virchows Arch.*; 447(4):723-30.
43. Iacopetta, B.; “TP53 mutation in colorectal cancer” (2003) Wiley-Liss, Inc., *Human mutation* 21:271-276 (2003).
44. Katkooi, V. et al “Prognostic significance of p53 codon 72 polymorphism differs with race in colo-rectal adenocarcinoma” (2009) *Clin Cancer Res* 2009;15(7) April 1, 2009.
45. Khalili K., Del Valle L., Otte J., Weaver M. & Gordon J. (2003). Human neurotropic polyomavirus, JCV, and its role in carcinogenesis. *Oncogene*, 22: 5181–5191.
46. Kepes JJ, Chou SM, Price LWJr. Progressive multifocal leukoencephalopathy with 10 year survival in a patient with nontropical sprue: report of a case with unusual light and electron microscopic features. *Neurology* 1975; 25:1006–12.
47. Kim H.S., Henson J.W. & Frisque R.J. (2001). Transcription and replication in the human polyomaviruses. In: Khalili, K., Stoner, G.L. (Eds.), *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspective*. Wiley-Liss, New York, pp. 73–126.
48. Kitamura T., Yogo Y., Sugimoto C., Kato A., Ebihara H., Suzuki M., Taguchi F., Kawabe K. & Yogo Y. (1997). Persistent JC Virus (JCV) Infection Is Demonstrated by Continuous Shedding of the Same JCV Strains. *J Virol*.
49. Koehne CH, Dubois RN. COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol* 2004;31(suppl 7):12–21.

50. Komarova N.L. (2005). Cancer, aging and the optimal tissue design. *Semin Cancer Biol*;15:494 – 505.
51. Laghi L., Randolph A., Chauhan D., Major E., Neel J., Boland C. (1999). JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 7484–7489, June 1999.
52. Lassak A, Del Valle L, Peruzzi F, Wang JY, Enam S, Croul S, Khalili K, Reiss K. 2002. Insulin receptor substrate I translocation to the nucleus by the human JC virus T-antigen. *J Biol Chem* 277:17231– 17238.
53. Ledoux S, Libman I, Robert F, Just N. Progressive multifocal leukoencephalopathy with gray matter involvement. *Can J Neurol Sci* 1989; 16:200–2.
54. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997; 272:3406–10.
55. Liu C. & Crawford J.M. O trato gastrointestinal. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds. *Patologia, bases patológicas das doenças*. 7a ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2005:900-13.
56. Liu, Y.; Bodmer, W.; “Analysis of p53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines” (2006) *PNAS* January 24, 2006 (vol.103, no. 4).
57. Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus–induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:49–73.
58. Major EO. Human polyomavirus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al, eds. *Fields virology*. 4th ed. Vol 2. New York: Lippincott, 2001: 2175–96.
59. Mak T., Lalloo F., Evans D.G. & Hill J. (2004). Molecular stool screening for colorectal cancer. *Br J Surg*; 91:790 – 800.
60. Markowitz S., Bertagnolli M. (2009). Molecular basis of colo-rectal cancer: *The new England journal of medicine*; 361:2449-2460| December 17,2009.
61. Martin J., King D., Slauch J., Frisque R. (1984) Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Jan. 1985, p. 306-311.
62. Martyn K.W. & Khalili K. (2004). Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology*, 324: 1– 16.

63. Merabova N. et al., (2008) Agnoprotein JC virus inhibits in vitro differentiation of oligodendrocytes and promotes apoptosis. *Journal of virology*. P.1558-1569, vol.82, No.3.
64. McCann, S. & Wise E. (2008). *Anatomy Coloring Book*.
65. Monaco M. C., Jensen P. N., Hou J., Durham L. C. & Major E. O. (1998). Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J. Virol.* 72:9918–9923.
66. Mou et al.(2012). Prevalence of JC virus in Chinese Patients with Colorectal Cancer. *PLoS ONE*. 7( 5):e35900.
67. Newcomb PA, Bush AC, Stoner GL, Lampe JW, Potter JD, Bigler J. No evidence of an association of JC virus and colon neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:662 – 6.
68. Oyasu R., Samma S., Ozono S., Bauer K., Wallemark C.B. & Homma Y. (1987). Feb 1. Induction of high-grade, high-stage carcinomas in the rat urinary bladder. *Cancer.*; 59(3):451-8.
69. Padgett B.L., Walker D.L., ZuRhein G.M. & Eckroade R.J. (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* i: 1257–1260.
70. Palmer D., Chen M., Kerr D. (2002). Gene therapy for colorectal cancer. *British Medical Bulletin* 64. 201-225.
71. Petersen G.M., Brensinger J.D., Johnson K.A. & Giardiello F.M. (1999). Genetic testing and counseling for hereditary forms of colorectal cancer. *Cancer*; 86 (11 Suppl.): 2540 50.
72. Philips S.F. & Scand J. Funções do intestino grosso: uma visão geral. *Gastroenterol Suppl.* 1984; 93:1-12 Phillips SF ..
73. Pickhardt P.J. (2004). Differential Diagnosis of Polypoid Lesions Seen at CT Colonography (Virtual Colonoscopy). *RadioGraphics*, 24, 1535-1556.
74. Piña-Oviedo S, Urbanska K, Radhakrishnan S, Sweet T, Reiss K, Khalili K, Del Valle L. 2007. Effects of JC virus infection on antiapoptotic protein survivin in progressive multifocal leucoencephalopathy. *Am J Pathol* 170:1291–1304.
75. Pleasants L.M. & Hansen M.F. (1994). Identification of a polymorphism in intron 2 of the p53 gene. *Hum Genet.* May; 93(5):607-8.
76. Pontes L., Silva M.A. & Matoso F. (2005) Registo Oncológico Nacional – Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil.

77. Prinz C., Schwendy S. & Volland, P. (2006). Sep 14. H pylori and gastric cancer: shifting the global burden. *World J Gastroenterol.*; 12(34):5458-64.
78. Reid M.E., Marshall J.R., Roe D., Lebowitz M., Alberts D., Battacharyya A.K. & Martinez M.E. (2003). Smoking exposure as a risk factor for prevalent and recurrent colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 12:1006–11.
79. Reinacher-Schick A, Schoeneck A, Graeven U, et al. Mesalazine causes a mitotic arrest and induces caspase-dependent apoptosis in colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2003;24:443–51.
80. Ricciardiello L, Chang DK, Laghi L, Goel A, Chang CL, Boland CR. Mad-1 is the exclusive JC virus strain present in the human colon, and its transcriptional control region has a deleted 98-base-pair sequence in colon cancer tissues. *J Virol* 2001;75:1996 – 2001.
81. Ricciardiello L., Laghi L., Ramamirtham P., Chang C.L., Chang D.K., Randolph A.E. & Boland C.R. (2000). JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 119: 1228– 1235.
82. Rodrigues, N et al.; “p53 mutations in colo-rectal cancer” (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 87, pp. 7555-7559, October 1990) *Medical Sciences*.
83. Rossi A., Delbue S., Mazziotti R., Valli M., Borghi E., Mancuso R., Calvo M.G. & Ferrante P. (2007). Presence, quantitation and characterization of JC virus in the urine of Italian immunocompetent subjects. *J Med Virol*.
84. Sabath B. F. & Major E.O. (2002). Traffic of JC Virus from Sites of Initial Infection to the Brain: The Path to Progressive Multifocal.
85. Safak M., Barucco R., Darbinyan A., Okada Y., Nagashima K. & Khalili K. (2001). Interaction of JC virus Agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J. Virol*, 75:1476–1486.
86. Sandler RS, Halabi S, Baron JA, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:883–90.
87. Santos et al. (2004). Association of p53 arginine polymorphism with skin cancer. *Int J Dermatol*. 43:489-493.
88. Seth P., Diaz F., Tao-Cheng J., Major E., (2003). JC virus induces nonapoptotic cell death of human central nervous system progenitor cell-derived astrocytes. *JOURNAL OF VIROLOGY*, May 2004, p. 4884–4891.

89. Schmiegel W, Pox CP, Reiser M. Effect of 5-aminosalicylate (5-ASA) on the recurrence rate of sporadic colorectal adenomas. *Gastroenterology* 2004;126:A452.
90. Schwenger P, Bellosta P, Vietor I, et al. Sodium salicylate induces apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase but inhibits tumor necrosis factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:2869–73.
91. Shishido-Hara Y. (2010) Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies: a review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced demyelinating disease. *Acta Neuropathol.* September, 120(3): 403-417.
92. Smith G., Carey F.A., Beattie J., Wilkie M.J., Lightfoot T.J., Coxhead J., Garner R.C., Steele R.J. & Wolf C.R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*: 9433-943.
93. Sock E., Renner K., Feist D., Leger H. & Wegner M. (1996). Functional Comparison of PML-Type and Archetype Strains of JC Virus. *J Virol*, Mar.; 1512-1520.
94. Solomon E., Voss R., Hall V., Bodmer W. F., Jass J. R., Jeffreys A. J., Lucibello F. C., Patel I., & Rider S. H. (1987). Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature (Lond.)*; 328: 616–619.
95. Stark LA, Din FV, Zwacka RM, et al. Aspirin-induced activation of the NFkappaB signaling pathway: a novel mechanism for aspirin-mediated apoptosis in colon cancer cells. *FASEB J* 2001;15:1273–5.
96. Tan, C. S., Dezube, B. J., Bhargava, P., Autissier, P., Wuthrich, C., Miller, J., Koralnik, I. J. (2009). Detection of JC Virus DNA and Proteins in the Bone Marrow of HIV-Positive and HIV-Negative Patients: Implications for Viral Latency and Neurotropic Transformation: *The Journal of Infectious Diseases*; 199:881-8.
97. Tanaka, T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis*, 8:5.
98. Terry M.B., Neugut A.I., Bostick R.M., Sandler R.S., Haile R.W., Jacobson J.S., Fenoglio-Preiser C.M. & Potter J.D. (2002). Risk factors for advanced colorectal adenomas: a pooled analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 11:622–9.
99. Theodoropoulos G. et al. Assessment of JC polyoma virus in colon neoplasms. *Dis Colon Rectum*. 2005;48:86-91.
100. Trojanek J, Croul S, Ho T, Wang JY, Darbinyan A, Nowicki M, Del Valle L, Skorski T, Khalili K, Reiss K. 2006. T-antigen of the human polyomavirus JC

attenuates faithful DNA repair by forcing nuclear interaction between IRS-1 and Rad51. *J Cell Physiol* 206: 35–46.

101. Vacas, A. C.; *Jornal Correio de manha*, 05/03/2008, autora Ana Carvalho Vacas “Cancro do colon mata dez por dia”.

102. Wang Z. & Sun Y. (2010). Targeting p53 for novel anticancer therapy. *Translational Oncology* 3, 1-12.

103. Whibley C., Pharoah P., Hollstein M. (2009). p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature reviews* : volume 9: 95-107.

104. White M.K. & Khalili K. (2004). Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology*: 324:1-16.

105. White MK. & Khalili K. Interaction of retinoblastoma protein family members with large T-antigen of primate polyomaviruses; *Oncogene* (2006) 25, 5286-5293.

106. Wolfe MM. Rofecoxib, Merck, and the FDA. *N Engl J Med* 2004;351:2875–8.

107. Yeatman T.J.(2001). *Colon Cancer*. University of South Florida, Tampa, Florida, USA.

108. Yogo Y, Guo J, Iida T, et al. Occurrence of multiple JC virus variants with distinctive regulatory sequences in the brain of a single patient with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Virus Genes* 1994; 8:99 – 105.

109. Yogo Y, Kitamura T, Sugimoto C, et al. Sequence rearrangement in JC virus DNAs molecularly cloned from immunosuppressed renal transplant patients. *J Virol* 1991;65:2422 – 8.

## **Referências Bibliográficas Eletrônicas**

1. Colite ulcerativa [em linha]. Página consultada em 6 de Setembro de 2011. Disponível em WWW:<URL:[http://www.saudevidaonline.com.br/ale\\_colite\\_ulcerativa.htm](http://www.saudevidaonline.com.br/ale_colite_ulcerativa.htm)>.
2. Imagens do mês [em linha]. Página consultada em 13 de Setembro de 2011. Disponível em WWW:<URL:<http://www.clinicabragalha.com.br>>.
3. Colonic Polyps - El Salvador Atlas of Gastrointestinal Video Endoscopy [em linha]. Página consultada em 18 de Abril de 2012. Disponível em WWW:<URL:[http://www.gastrointestinalatlas.com/English/Colon\\_and\\_Rectum/Polyps/polyyps.html](http://www.gastrointestinalatlas.com/English/Colon_and_Rectum/Polyps/polyyps.html)>.