



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Presença de sequências de DNA do  
poliomavírus JC em criptas  
aberrantes de mucosa colo-rectal  
humana.

Liliana de Almeida Curado

2011



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Presença de sequências de DNA do poliomavírus JC em criptas aberrantes de mucosa colo-rectal humana.

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Luís Almeida (Universidade de Medicina) e da Professora Doutora Maria da Graça Vale (Universidade de Ciências e Tecnologia)

Liliana de Almeida Curado

2011

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 Gastrenterologia do Hospital da Universidade de Coimbra

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao meu orientador de mestrado Professor Doutor Luís Manuel da Costa Marques de Almeida, pelo empenho e orientação prestada, pelos melhores e mais úteis ensinamentos que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e foram decisivos para o sucesso deste trabalho ao longo do percurso deste mestrado.*

*À minha co-orientadora Professora Doutora Maria da Graça Vale, por todo o conhecimento que me transmitiu ao longo do curso, pela total disponibilidade, amizade e ajuda que sempre me prestou.*

*Ao Prof. Doutor Pedro Narra Figueiredo do Hospital da Universidade de Coimbra, por toda a compreensão, disponibilidade e apoio que me prestou, a sua ajuda foi crucial ao desenvolvimento deste projecto.*

*À coordenadora de mestrado, Professora Doutora Isabel Luci Pisa Mata da Conceição, por toda a dedicação revelada ao longo do tempo, pelo apoio e amizade sempre demonstrada.*

*A todos os Enfermeiros e Auxiliares do Hospital da Universidade de Coimbra pela simpatia, disponibilidade e apoio que me proporcionaram.*

*À mestre Tatiana Coelho por todo o apoio e à mestre Rita Gaspar pela amizade e dedicação, por todo o ensinamento que me proporcionaram, fundamental na realização deste projecto.*

*Aos meus colegas David Moura e Pedro Pinto pelo constante empenho e amizade.*

*À minha mãe, o meu pilar vital, a base do que sou e de tudo o que consegui alcançar, pelo amor incondicional sempre demonstrado, pelas sábias palavras que me ajudaram a delimitar o meu sucesso, pelo que sonhamos juntas e me ajudou a realizar.*

*Ao meu pai, pelo saber que sempre me transmitiu, pela dedicação e apoio fundamental, pela motivação e carinho responsável pelo meu sucesso.*

*Ao André por todo o companheirismo demonstrado, pela paciência, carinho e apoio incondicional nas adversidades desta jornada acadêmica, pela fundamental e especial dedicação e incentivo.*

*Aos meus avós pelo apoio e motivação que sempre demonstraram, pelo carinho e incentivo constante.*

*Ao meu companheiro de jornada acadêmica António Monteiro, por todo o apoio e dedicação incondicional ao longo destes anos, pelas vivências passadas que marcaram o meu percurso, pela grande amizade que marcará o meu futuro.*

*Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os meus amigos e colegas de curso que comigo partilharam a vida académica.*

# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

HBV – *hepatitis B virus*

HCV – *hepatitis C virus*

CCR – Cancro colo-rectal

PAF – Polipose Adenomatosa Familiar

APC – *Adenomatous polyposis coli*

FCA – Foco de Criptas Aberrantes

JCV - Vírus JC

LMP – Leucoencefalopatia multifocal progressiva

BKV – Vírus BK

SV40 – *Vírus simiam 40*

HIV – *Human immunodeficiency virus*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

TCR – *Transcriptional Control Region*

Ag-T – Antígeno T grande

Ag -t – Antígeno t pequeno

HUC – Hospitais da Universidade de Coimbra

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

ATPase – Adenina Trifosfatase

dNTP's – Desoxinucleótidos Trifosfato

dATP – Desoxiadenina Trifosfato

dTTP – Desoxitimina Trifosfato

dCTP – Desoxicitosina Trifosfato

dGTP – Desoxiguanina Trifosfato

pb – Pares de bases.

# ÍNDICE

Resumo/ Abstract .....	1
<b>I - Introdução .....</b>	<b>4</b>
<b>1- Anatomia do intestino grosso .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 – Parede intestinal .....</b>	<b>6</b>
<b>2- Neoplasias malignas .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 – Epidemiologia .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 – Factores de risco .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 – Carcinoma Colorectal .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1 – Etiologia .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.2 – Patogénese e características anatomo-patológicas .....</b>	<b>9</b>
<b>3 – Foco de Criptas Aberrantes (FCA).....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 – Morfologia/Histologia dos focos de criptas aberrantes .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2 – Alterações genéticas em FCA.....</b>	<b>13</b>
<b>4 – Pólipos .....</b>	<b>15</b>
<b>5 - Poliomavírus neurotrópico humano JC (JCV).....</b>	<b>16</b>
<b>5.1 – Epidemiologia .....</b>	<b>19</b>
<b>5.2 – Morfologia e expressão genética .....</b>	<b>17</b>
<b>5.3 – O ciclo de vida do JCV .....</b>	<b>20</b>

<b>6- Síntese da associação do JCV ao desenvolvimento do CCR.....</b>	<b>22</b>
<b>II – Objectivos .....</b>	<b>23</b>
<b>III – Material e Métodos .....</b>	<b>25</b>
<b>1- Colheita do material biológico .....</b>	<b>26</b>
<b>2- Estratégia experimental .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 - Extração do DNA .....</b>	<b>30</b>
<b>2.2 – Reacção em Cadeia da Polimerase .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3 - Electroforese em gel de agarose .....</b>	<b>35</b>
<b>3 – Análise estatística .....</b>	<b>38</b>
<b>IV – Resultados e Discussão .....</b>	<b>39</b>
<b>V – Conclusões .....</b>	<b>50</b>
<b>VI – Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>52</b>
<b>VII – Anexos .....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da anatomia do intestino grosso.....	6
Figura 2 – Histologia do intestino grosso.....	7
Figura 3 - Modelo proposto por Vogelstein e Cols para a sequência de mutações na evolução adenoma-carcinoma.....	11
Figura 4 - Imagens de focos de criptas aberrantes.....	12
Figura 5 - Representação esquemática das principais vias de sinalização que, por factores externos, desregulam a célula, iniciando assim o processo de carcinogénese.....	15
Figura 6 - Disposição estrutural do genoma do JCV.....	20
Figura 7 - Representação esquemática do ciclo de vida do JCV.....	22
Figura 8 – Imagem do material utilizado, usado no exame de colonoscopia, captada no local onde foi realizada a colheita.....	27
Figura 9 - Representação esquemática da estratégia experimental utilizada.....	31
Figura 10 - Imagem demonstrativa do resultado final da realização da extracção do DNA de algumas das amostras colhidas, através do método fenol/clorofórmio/ácido isoamílico.....	32
Figura 11 - Esquema representativo dos ciclos térmicos necessários à amplificação dos fragmentos por PCR (A). Imagem do termociclador PCR Biometra utilizado neste projecto..	35
Figura 12 - Imagem do sistema de electroforese horizontal utilizado na separação dos produtos de amplificação por PCR.....	36

Figura 13- Imagem de um dos géis de agarose realizado neste estudo.....	38
Figura 14- Comparação das frequências absolutas da presença JCV em FCA, mucosa não- adjacente e mucosa normal.....	42
Figura 15 – Comparação da presença e ausência da sequência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC entre amostras de mucosa colo-rectais e pólipos.....	43
Figura 16 - Comparação da presença e ausência da sequência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC entre amostras colhidas em FCA e pólipos.....	44
Figura 17 - Comparação da presença e ausência da sequência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC entre amostras colhidas em mucosa não-adjacente ao FCA e pólipos.....	45
Imagem 18 - Comparação da presença e ausência da sequência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC entre amostras colhidas em mucosa do grupo de controlo e pólipos.....	47
Imagem 19 - Comparação da presença e ausência da sequência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC em amostras colhidas em FCA e mucosa não-adjacente ao pólipo, e em a mucosa não-adjacente ao FCA e a mucosa não-adjacente ao pólipo.....	49

# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Dados demográficos dos pacientes do grupo - controlo (E) e respectivas amostras colhidas de mucosa normal.....	29
Tabela II – Dados demográficos dos pacientes do grupo de estudo (D) e respectivas amostras recolhidas de FCA e de mucosa normal.....	30
Tabela III – Resumo das características dos <i>primers</i> usados nas amostras de estudo.....	34
Tabela IV – Frequência absoluta e relativa da presença do vírus JCV nas amostras do grupo de controlo e no grupo de estudo.....	41
Tabela V - Estimativa de “risco” (RC), e intervalos de confiança (IC95%) da presença de DNA do JCV em FCA <i>versus</i> pólipos.....	43
Tabela VI - Estimativa de “risco” (RC), e intervalos de confiança (IC95%) da presença de DNA do JCV da mucosa não-adjacente a FCA <i>versus</i> pólipos.....	45
Tabela VII - Estimativa de “risco” (RC), e intervalos de confiança (IC95%) da presença de DNA do JCV em mucosa normal do grupo de controlo <i>versus</i> pólipos.....	46
Tabela VIII - Estimativa de “risco” (RC), e intervalos de confiança (IC95%) da presença de DNA do JCV em FCA e mucosa normal não-adjacente ao pólipo e em mucosa normal não-adjacente ao FCA e mucosa não-adjacente ao pólipo.....	48

## **Resumo/Abstract**

## Resumo

O carcinoma colo-rectal é uma das principais causas de morte em Portugal e no mundo.

Vários estudos têm sugerido existir uma associação entre o surgimento da doença carcinogénica colo-rectal e a infecção pelo poliomavírus humano JC. Deste modo, o despoletar desta doença poderá surgir a partir da infecção não lítica das células epiteliais da mucosa.

Segundo trabalhos realizados na área da biologia molecular presume-se que existam etapas percussoras do carcinoma colo-rectal, nomeadamente a sequência Foco de Criptas Aberrantes/Pólipo/Carcinoma colo-rectal.

Neste projecto foi estimado o “risco” da presença do poliomavírus JC estar significativamente associado ao foco de criptas aberrantes, avaliando assim se o vírus estimula a formação da cripta aberrante.

A presença da sequência de DNA do poliomavírus humano JC foi detectada através de electroforese horizontal em gel de agarose, após ter sido amplificado o DNA de amostras de parede intestinal através do método de *Nested-PCR*.

Foi analisada a presença do poliomavírus JC em: 15 amostras de mucosas colo-rectais (grupo-controlo), 15 amostras colhidas em focos de criptas aberrantes (grupo de estudo) e 9 amostras de mucosa normal não-adjacente ao foco de criptas aberrantes recolhidas em pacientes onde foi colhida amostra de foco de criptas aberrantes (grupo de estudo).

Não foi detectada a sequência genética do poliomavírus JC em qualquer cripta aberrante, mucosa não-adjacente a estas lesões ou mucosa do grupo-controlo.

Com os resultados obtidos verificou-se que não existe tropismo do vírus JC pela cripta aberrante, ao contrário do que acontece pelo pólipo.

## Abstract

The colorectal carcinoma is one of the leading causes of death in Portugal and the World.

Several studies have suggested there is a relationship of association between the emergence of the colorectal carcinogenic disease and the infection by the human polyomavirus JC. Thus, the trigger of this disease may arise from the non-lytic infection of epithelial cells of the mucosa.

According to studies conducted in the field of molecular biology it is assumed that there is a sequence of steps that leads to colorectal cancer, namely Aberrant Crypt Foci / Polyp / Colorectal Carcinoma.

In this project was analyzed the "risk" of the association being highly associated to the presence of polyomavírus JC in aberrant crypt foci, evaluating so if this virus stimulates the aberrant crypt foci formation.

The presence and absence of the DNA sequence of human polyomavirus JC was detected by an horizontal electrophoresis in agarose gel after being amplified DNA from intestinal samples by Nested- PCR method.

Was analyzed the presence of JC virus in: 15 samples of normal colorectal mucosa, belonging to the control group, 15 samples taken from aberrant crypt foci, belonging to the study group and 9 samples of normal mucosa collected from the same patients were was taken the sample of aberrant crypt focus (sample of normal mucosa adjacent to non-aberrant crypt foci), belonging to the study group.

It wasn't detected the genetic sequence of poliomavírus JC in any aberrant crypt, non-adjacent mucosa to this lesions or mucosa from control group.

With the obtained results was verified that there is no tropism from JC virus for the aberrant crypt foci as it is for the polyp.

## **I – Introdução**

## **1- Anatomia do intestino grosso**

O sistema digestivo humano é formado por um longo tubo muscular bastante diferenciado, ao qual estão associados alguns órgãos e glândulas que também participam na digestão.

O intestino é constituído por duas partes, o intestino delgado e o grosso, distintos a nível morfológico e funcional (Parker S, 2007).

O intestino grosso tem como função principal a absorção de água e alguns nutrientes contidos nos resíduos da digestão que provêm do intestino delgado. Para além desta função, apresenta ainda a de digestão através das bactérias da flora intestinal e formação de muco segregado por glândulas intestinais que vai contribuir para a formação da matéria fecal, posteriormente expelida pelo ânus.

O intestino grosso varia entre 1,5 a 1,8m de comprimento e tem cerca de 5 a 8cm de diâmetro, estando dividido em quatro partes: o cego (e apêndice), o cólon o recto e o ânus (Figura 1).

O cego, situado na zona inferior direita da cavidade abdominal, é a primeira porção do intestino grosso e mede cerca de 7cm. Possui uma excrescência tubular denominada de apêndice cecal (McCann & Wise, 2008).

A maior parte do intestino grosso é constituída pelo cólon que por sua vez se divide em quatro segmentos: ascendente, transverso, descendente e sigmóide.

O cólon ascendente mede aproximadamente entre 15 e 20 cm de comprimento e ascende pelo lado direito do abdómen até quase à altura do fígado, onde forma o ângulo hepático.

O cólon transverso, com 30 a 60 cm de comprimento, atravessa a cavidade abdominal da direita para a esquerda passando por baixo do estômago. Forma outro ângulo denominado de ângulo esplénico.

O cólon descendente atinge cerca de 20 a 25 cm de comprimento e desce pelo lado esquerdo do abdómen até chegar à pélvis.

O cólon sigmóide mede entre 30 a 40 cm de comprimento e descreve uma forma em S no interior da pélvis antes de chegar ao recto.

O recto e o ânus são a última parte do intestino grosso. O recto mede entre 15 e 20 cm de comprimento e, com um diâmetro muito variável nas suas diferentes partes, desce pelo centro da pélvis e termina no ânus, orifício que contacta com o exterior. Os

últimos 2/3cm do recto correspondem ao canal anal, onde se podem encontrar formações musculares particulares, o esfíncter anal interno e o esfíncter anal externo, que regulam a defecação.

Como já referido, no intestino grosso a flora intestinal é constituída por microrganismos, como as bactérias que facilitam o processo final da digestão. Contudo, nem todos os microrganismos são benéficos e, frequentemente, o intestino é exposto a seres patogénicos, como vírus, que contribuem para o desenvolvimento de doenças como o carcinoma colo-rectal (Guarner F, 2006).

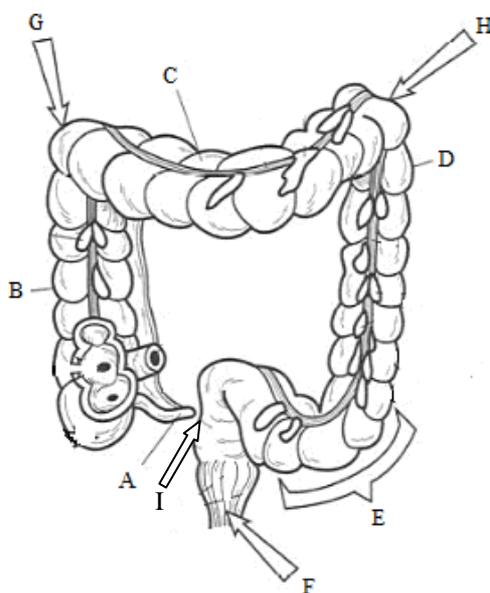


Figura 1- Representação esquemática da anatomia do intestino grosso. A- Cego; B- Cólon ascendente; C – Cólon transverso; D – Cólon descendente; E – Cólon sigmóide; F – Ânus; G – Ângulo hepático; H – Ângulo esplênico; I – Recto (Adaptado de Alcamo I E & Bergdahl J, 2003).

### 1.1 - Parede Intestinal

A parede do intestino grosso é composta por quatro camadas concêntricas: a mucosa, a submucosa, a camada muscular, e a serosa (ou adventícia). A mucosa é a camada mais interna e pode ser dividida em epitélio, lâmina própria e *muscularis-mucosae*.

O epitélio é composto por uma fila de células simples, cilíndricas, absorptivas. A disposição destas células forma milhões de invaginações denominadas de criptas (Figueiredo I N,2010). Cada cripta é constituída por um conjunto de células, formando um tubo cilíndrico, com uma abertura na zona apical (Figueiredo I N,2010).

As células epiteliais estão intercaladas por células caliciformes produtoras de muco e desprovidas de vilosidades (Figura 2).

A lâmina própria contém glândulas intestinais longas de Lieberkühn e folículos linfáticos que podem atravessar a *muscularis-mucosae* e a submucosa.

A *muscularis-mucosae*, composta por várias camadas finas de fibras musculares lisas orientadas de maneiras diferentes, confere suporte ao epitélio.

São várias as doenças que podem afectar a mucosa intestinal, um dos exemplos é o carcinoma colo-rectal, que se poderá iniciar a partir da alteração das criptas (Abraham L K, 2002; Parker S, 2007).

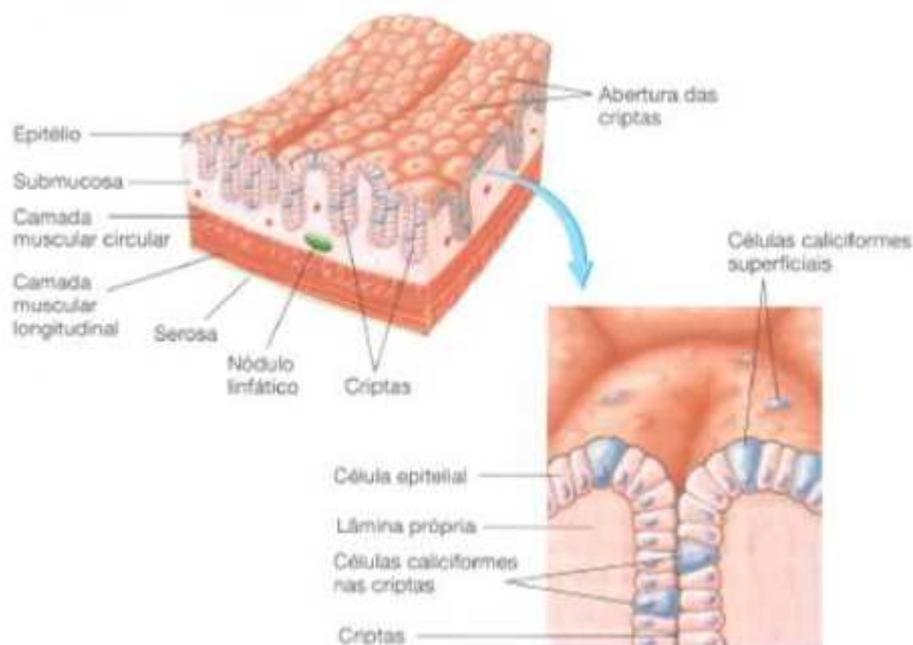


Figura 2 – Histologia do intestino grosso (Adaptado de Seeley R, 2003).

## **2- Neoplasias Malignas**

### **2.1- Epidemiologia**

O cancro é uma das principais causas de morte no mundo. Estimativas realizadas em 2008 apontam que 7,6 milhões de pessoas morreram devido a esta doença nesse ano (Katalinic D, 2010; WHO2011).

Perspectivas futuras da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que a incidência desta doença irá aumentar exponencialmente na próxima década atingindo em 2030 cerca de 12 milhões de pessoas anualmente (Katalinic D, *et al*, 2010; WHO 2011).

A acumulação de mutações genéticas provoca a desregulação do ciclo celular e as células dividem-se de forma atípica, desorganizada e descontrolada, resultando no desenvolvimento de cancro (Pinho MSL,2008). Por este motivo, o cancro é considerado uma doença genética.

A divisão celular acelerada das células mutadas torna-as malignas quando ocorrem seis alterações fundamentais: a auto-suficiência em sinais de crescimento, a insensibilidade aos sinais anti-crescimento, o potencial replicativo ilimitado, a capacidade de evitar a apoptose, a angiogénese sustentada e a capacidade de invadir tecidos através das metástases (Cavallo F, *et al*.2011).

### **2.2 - Factores de risco:**

Existem certos factores ambientais que estimulam directamente o desenvolvimento da doença carcinogénica e potenciam o seu agravamento.

Os principais factores de risco como o tabaco, o álcool, a luz solar, o envelhecimento, a alimentação inadequada e infecções por alguns vírus, como o da hepatite B (HBV), o da hepatite C (HCV) e alguns tipos de Papiloma Humano (HPV), são exemplos de factores ou organismos que comprovaram estimular directamente o desenvolvimento desta doença (Guerra M. R, *et al*, 2005; WHO 2011).

## 2.3 - Carcinoma colo-rectal (CCR)

### 2.3.1- Etiologia

Segundo a OMS, o CCR é a terceira neoplasia mais frequente no mundo. Na Europa foi realizado um estudo em 2006 que mostra que a incidência anual de cancro é aproximadamente de 3,2 milhões de pessoas e apresenta uma mortalidade de 1,7 milhões/ano. O CCR é a segunda principal causa de morte por tumor, sendo ultrapassado apenas pelo cancro de pulmão. Em Portugal, esta doença é a terceira principal causa de morte por neoplasia (Ferlay J, *et al*, 2007; WHO, 2011).

O CCR é uma doença que afecta maioritariamente os idosos, sendo a idade média de ocorrência os 73 anos. Em 2008, foi planeado um projecto pela OMS com medidas de acção tendo como finalidade contrariar o aumento exponencial de ocorrência desta doença (Fenoglio L, *et al.*,2010).

A localização mais frequente desta doença ocorre na sigmóide e no recto, no entanto, nos últimos anos, a tendência de ocorrência da doença em zonas mais proximais tem aumentado (Hamilton SR & Aaltonem LA, 2000).

Certos factores desempenham papéis-chave na etiologia do CCR. Foi comprovado que o risco de desenvolvimento desta doença aumenta quando existe elevada exposição a:

- Factores ambientais como:
  - Dieta alimentar (principal factor ambiental potenciador de CCR):
    - ◆ Excessiva em alimentos calóricos (hidratos de carbono refinados) ricos em gordura animal e proteína animal (ex: carnes vermelhas e derivados);
    - ◆ Reduzida em fibras, frutas, vegetais e cereais;
  - Sedentarismo;
  - Álcool;
  - Tabaco;
- Factores pessoais como:
  - Idade;
  - História anterior de pólipos;
  - Doença inflamatória intestinal;
  - História familiar de CCR;

- Factores genéticos de transmissão hereditária.
  - CCR Não-Polipóide Hereditário (gene alterado - HNPCC)
  - Polipose Adenomatosa Familiar (gene alterado – APC)

Cerca de 80% dos doentes com CCR têm carcinomas esporádicos não hereditários. Os restantes 20% apresentam elevada susceptibilidade hereditária, nomeadamente o CCR Não-Polipóide Hereditário ou a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), que surgem com mais frequência e manifestam-se em idades mais precoces comparativamente com o CCR esporádico (Hamilton & Aaltonem, 2000; Petersen *et al.*,1999).

Na maioria dos casos, os pacientes com CCR são assintomáticos, contudo, os sintomas podem incluir, entre outros, febre, mal-estar, perda de peso, dor abdominal, obstrução, perfuração, hematoquezia ou anemia (Hamilton SR & Aaltonem L A, 2000).

### 2.3.2 - Patogénese e características anátomo-patológicas

A carcinogénese do CCR engloba várias fases de desenvolvimento até alcançar o estado de malignidade (Figura 3). Trabalhos pioneiros sobre a sua biologia morfológica e molecular permitiram distinguir a sequência de alterações que leva à formação do adenocarcinoma colo-rectal. Deste modo, as neoplasias colo-rectais derivam da alteração da epiderme intestinal (Winawer S J, 1999).

Inicialmente, a alteração genética das células epiteliais do intestino provoca a degeneração do tecido normal, sofrendo alteração da morfologia e aumento de volume. Esta deformação epitelial tem como consequência a formação de criptas anormais, defeituosas, denominado o seu conjunto de Foco de Criptas Aberrantes (FCA). Acredita-se então que o desenvolvimento desta lesão a antecede o pólipo (Figueiredo I N,2010; Winawer S J, 1999).

O pólipo sofre alterações de tamanho ao longo do tempo. A contínua divisão celular aumenta gradualmente o seu tamanho até formar um pólipo com uma massa celular de grandes dimensões. Este evolui para carcinoma, que por sua vez adquire malignidade quando a massa celular obtém capacidade invasiva. A fase invasiva é a fase mais avançada da doença com capacidade de destacar células do tumor primário (as metástases) para a corrente sanguínea e posteriormente contaminar outros órgãos.

Investigações feitas na área da genética sugerem que existe uma possível sequência de mutações que culminam no aparecimento do cancro esporádico. Acredita-

se que este tipo de CCR ocorre devido principalmente a mutações nos genes APC, *k-ras*, DCC e p53 (Pinho MSL,2008).

Os estudos sugerem que mutações nos genes APC e *k-ras* são responsáveis por originar as criptas aberrantes (Yuan P, *et al*, 2001), mutações no gene APC e DCC formam e desenvolvem o pólip e mutações no gene p53 são os responsáveis por desencadear o CCR (Pinho MSL,2008).

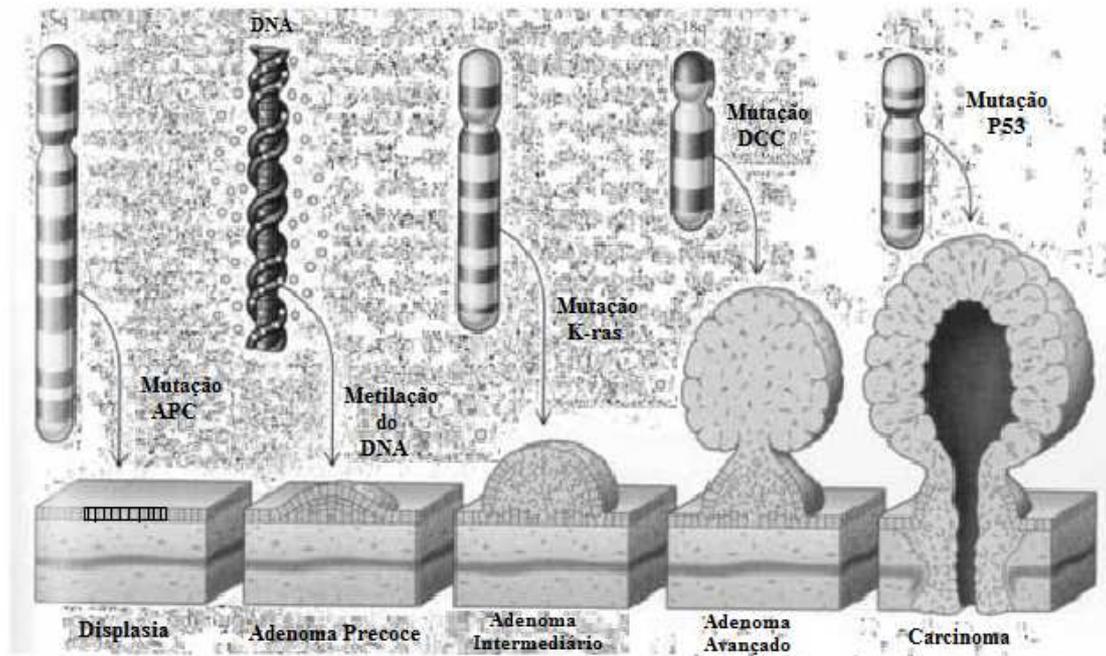


Figura 3 - Modelo proposto por Vogelstein e Cols para a sequência de mutações na evolução adenoma-carcinoma (Adaptado de Weimberg RA & Hanahan DS, 1996).

### **3- Focos de Criptas Aberrantes (FCA)**

Como foi referido anteriormente, a carcinogénese colo-rectal é um processo complexo constituído por várias etapas que inclui mudanças histomorfológicas da mucosa e as criptas aberrantes possivelmente enquadram-se numa forma precedente ao desenvolvimento da doença (Norlida AO & Phang KS, 2010; Figueiredo I N,2010).

Acredita-se que os FCA (Figura 4) são lesões precursoras do pólip, caracterizados pela presença de displasia, monoclonalidade e mutações do gene APC e *k-ras* (Khare S *et al*, 2008; Siu M, *et al*, 1997).

Vários estudos feitos com animais e amostras humanas ajudaram a perceber o processo precursor de lesões pré-malignas a partir das criptas aberrantes (Khare S, 2008). Ensaios realizados com roedores tratados com uma substância cancerígena (azoximetano) resultaram no maior aparecimento de FCA, que ao longo do tempo

foram-se tornando maiores, com maior atipia nuclear e displasia (McLellan E A, *et al*, 1991).

Em humanos também existem indícios que apontam para a veracidade da sequência FCA/pólipo/adenocarcinoma (Takayama T, *et al*, 1998). Estudos feitos em pacientes com carcinoma colo-rectal apresentam maior número de FCA em relação a pacientes com lesões não cancerosas ou sem qualquer tipo de lesão (Pretlow TP, *et al*, 1991).

A identificação destes focos é realizada através de técnicas de cromoscopia, nos quais se utilizam dois tipos de corantes vitais: o Azul de metileno, que penetra dentro das células; e o Índigo Carmim, que cora as células à sua superfície sem as penetrar. O corante Índigo Carmim é menos abrasivo e a probabilidade de destruição do material genético é menos elevada, contudo o azul de metileno permite melhor identificação e recolha.

Os FCA foram descritos pela primeira vez em 1987 por Bird, em intestino de rato, como lesões volumosas, através de um método colorimétrico. Os ratos foram submetidos a uma substância cancerígena (azoximetano) e posteriormente foram analisados os seus intestinos. Comparativamente com a mucosa normal identificaram-se criptas de maiores dimensões, mais escuras, de espessura epitelial maior e congregadas num foco (Bird RP, 1987).

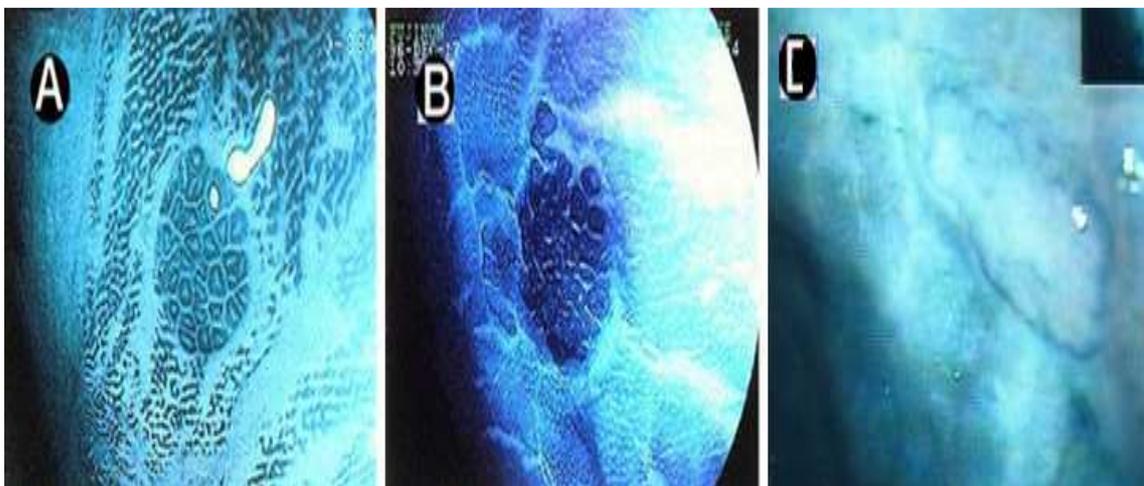


Figura 4 – Imagens de Focos de Criptas Aberrantes. A/B - Histologia de dois FCA identificados através de ampliação endoscópica. (Adaptado do trabalho elaborado pelo Professor Niitsu Yoshiro, Takayama T, 1998); C – FCA observada através do exame de colonoscopia, nos HUC.

Os FCA estão presentes frequentemente em indivíduos com carcinomas esporádicos e também em indivíduos que apresentam PAF. Nesta forma hereditária

autossômica dominante de CCR existe uma mutação germinativa no gene APC, provocando a alteração celular e formação dos FCA (Takayama T, *et al*, 1998).

Pessoas que apresentem antecedentes de pólipos avançados, CCR ou indivíduos idosos, demonstram ter uma maior incidência de FCA.

Existem substâncias promotoras dos FCA como por exemplo o quenodiol ou o azoximetano, assim como existem substâncias repressoras como o ácido docosaheptaenóico ou a aspirina (Takayama T, *et al*, 1998).

### 3.1- Morfologia / Histologia dos focos de criptas aberrantes

As criptas aberrantes distinguem-se principalmente pelo seu volume elevado e dismorfia (Smith, A. *et al*, 1994).

A análise histológica destas lesões mostrou alterações peculiares que, para além do aumento de tamanho, quando observadas endoscopicamente apresentavam um maior espessamento epitelial, maior espaço peri-criptal e, nalguns casos, displasia (Hurlstone DP & Cross SS, 2005).

O número de criptas aberrantes é variável por foco, apresentando em regra entre 150 e 200 criptas aberrantes (Khare S, *et al*, 2008).

Os FCA devem ser identificados e colhidos *in situ* e analisados posteriormente. Esta análise não deve ser precedida de cortes histológicos, dado que as características específicas que definem as criptas aberrantes poderão perder a fiabilidade em cortes histológicos (Khare S, *et al*, 2008).

### 3.2 - Alterações genéticas em FCA

Como foi visto anteriormente, os estudos mostram que principalmente mutações no gene APC e K-ras estão intimamente relacionadas com o aparecimento dos FCA (Figura 5) (Yuan P, *et al*, 2001).

### ❖ Mutações no gene APC

Estudos realizados demonstram que alterações no gene APC são detectadas em CCR esporádicos (Powell *et al.*, 1992) e em FCA (Smith *et al.*, 1994), evidenciando assim que a mutação neste gene pode ocorrer numa etapa precoce da sequência do carcinoma colo-rectal (Bernstein C, *et al.*, 2000).

A função do gene APC consiste em promover a apoptose celular e a regulação da proteína  $\beta$ -catenina.

A mutação deste gene no cólon induz a inativação do processo de apoptose, que estimula a transformação neoplásica (Morin PJ, *et al.*, 1996). Quando ocorre nas células germinativas, o gene APC mutado poderá vir a ser herdado pelas gerações seguintes, constituindo assim o passo inicial para o desenvolvimento da PAF (Ichii S, *et al.*, 1992).

A  $\beta$ -catenina desempenha a função de adesão entre células epiteliais. Em tecido normal, quando as células estabelecem contacto com a célula vizinha, deixam de se multiplicar – é a inibição por contacto (Ogata D C, *et al.*, 2010). Essa proteína é degradada no citoplasma através de proteólise pelo complexo de ataque APC/ axina/ GSK-3 $\beta$ . Quando ocorre mutação do gene APC, a expressão genética é defeituosa, o que leva à dissolução do complexo de ataque, promovendo a contínua formação de  $\beta$ -catenina e provocando a acumulação desta proteína no citoplasma celular. Esta pode posteriormente alcançar o núcleo e modular a expressão de vários genes-alvo potenciadores da carcinogénese. Deixa assim de haver a inibição por contacto e as células proliferam descontroladamente (Ogata D C, *et al.*, 2010).

### ❖ Mutação do gene K-Ras

O gene K-Ras é responsável por codificar a proteína K-RAS que pertence à família das GTPases. A família das GTPases corresponde a proteínas da membrana celular que promovem a transdução de várias vias de sinalização (Minamoto T, *et al.*, 1995).

Entre a transdução de várias vias de sinalização, a K-RAS é responsável por fazer a transdução de factores de crescimento. A mutação no gene K-Ras vai provocar o mau funcionamento da proteína K-RAS e conseqüentemente a desregulação da transdução dos factores de crescimento. Assim, dá-se o descontrolo celular e inicia-se o processo de carcinogénese (Shen H, *et al.*, 2011).

As estatísticas mostram que a mutação do gene K-Ras no nosso organismo e em FCA é frequente (Smith *et al*, 1994).

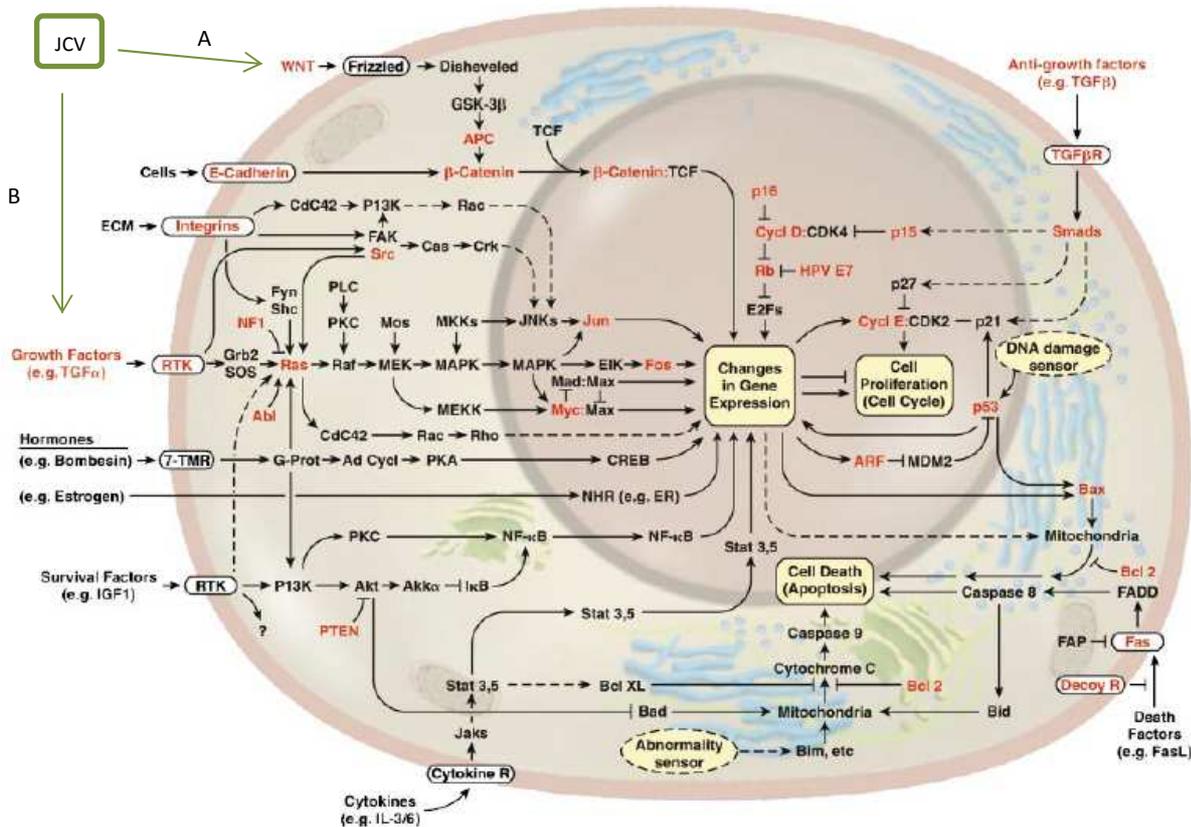


Figura 5 - Representação esquemática das principais vias de sinalização que, por factores externos, desregulam a célula, iniciando assim o processo de carcinogénese. A- Via de sinalização do APC. B- Via de sinalização do k-ras. (Adaptado de Hanahan D & Weinberg RA, 2000).

#### 4 - Pólipos

A caracterização morfológica dos pólipos e as diferenças entre os vários tipos existentes são bem conhecidas. Uma das distinções feitas entre pólipos consiste na presença ou ausência de pedículo. Na presença de pedículo o pólipo denomina-se de pediculado, na ausência apelida-se de sésil (Faias S, *et al*, 2004).

Os pólipos separam-se em dois grupos principais: não neoplásicos, quando não apresentam malignidade, e pólipos neoplásicos, quando a demonstram. As estatísticas indicam que 30% dos pólipos recolhidos por colonoscopia são não neoplásicos e em grande parte dessas recolhidas (cerca de 70%) são neoplásicos (Cerato M M, *et al*, 2007; Faias, *et al*, 2004).

Os pólipos não neoplásicos, em regra, não desenvolvem displasia excluindo, assim a probabilidade de risco de desenvolvimento da doença cancerígena. Dentro deste tipo de pólipos incluem-se os pólipos hiperplásicos, hamartomas, agregados linfóides e pólipos inflamatórios (Lane, *et al*, 1971; Faias S, *et al*, 2004).

Os pólipos neoplásicos caracterizam-se por terem a capacidade de desenvolver malignidade, e geralmente são denominados de pólipos adenomatosos ou adenomas. Clinicamente provocam consequências mais severas para o paciente, isto porque 95% dos CCR são gerados a partir de adenomas (Faias S, *et al*, 2004).

Por definição, os adenomas são displásicos e comportam modificações atípicas e arquiteturais que se vão sobrepondo até culminar em CCR (Costantini M, *et al*, 2003).

Os adenomas subdividem-se em três tipos consoante a quantidade de componente viloso que contêm: tubulares, túbulo-vilosos e vilosos.

Os adenomas tubulares possuem 0-25% de componente viloso e desenvolvem-se em cerca de 70-85% dos adenomas.

Os adenomas túbulo-vilosos possuem 25- 75% de componente viloso e 10-25% dos adenomas recolhidos são deste tipo.

Os adenomas vilosos possuem 75-100% de componente viloso. Este tipo de adenoma é o menos frequente, surgindo apenas em 5% dos adenomas.

Quanto maior for a quantidade de componente viloso no adenoma, maior será a severidade apresentada pelo mesmo (Faias S, *et al*, 2004; Fenoglio L, *et al*, 1999).

## **5 - Poliomavírus neurotrópico humano JC (JCV)**

O vírus JC (descrito pela Comissão Internacional de Nomenclatura de Vírus), o BK (BKV) e o Simiam 40 (SV40 ) pertencem à família *Papovaviridae* (Field A M, *et al*, 1974).

Considerado um vírus humano, o JCV infecta predominantemente a nossa espécie.

A infecção é generalizada, porém, a replicação viral está restrita a células permissivas, ou seja, as células capazes de suportar a replicação do DNA viral, como células da glia (predominantemente oligodendrócitos onde desenvolve a doença Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva) e células linfóides da linhagem B. Isto deve-se ao facto de somente neste tipo de células existirem os mecanismos intracelulares específicos que promovem o tropismo do vírus e permitem a sua

multiplicação. A infecção deste tipo de células resulta numa infecção lítica por parte do vírus (Darbinyan A, *et al.*2004).

Apesar de o vírus não se conseguir replicar em células não permissivas pode infectá-las, potenciando assim a origem de doenças (entre as quais possivelmente o CCR como tentamos estudar neste projecto).

Nas células não permissivas englobam-se todas as células em que o vírus não consegue replicar o seu DNA, como por exemplo as células do epitélio gastrointestinal estudadas neste projecto. Neste tipo celular não existem as condições essenciais para o processo viral acontecer, o que resulta na infecção não lítica ou latente. A infecção latente desregula a cascata de sinalização celular e transformará a célula em neoplásica, culminando no carcinoma (White & Khalili, 2004; Coelho *et al.*, 2010).

A replicação viral não acontece enquanto o JCV não reunir as condições favoráveis para tal, depositando-se numa forma latente principalmente nos rins e órgãos linfóides dos indivíduos até conseguir se replicar (Chen S T, *et al*, 2010).

A infecção acontece durante a infância, é geralmente subclínica, assintomática e pode permanecer na forma latente durante toda a vida (Safak M & Khalili K, 2003; Gordon & Khalili, 1998; Gosert R, *et al*, 2010).

Em 1971 foi identificado pela primeira vez o JCV, numa recolha de tecido cerebral humano. Padgett, Walker, ZuRhein, e Eckroade foram os pioneiros na descoberta deste vírus, que o denominaram de John Cunningham vírus (JCV) em homenagem ao paciente do qual foi isolado (Padgett B L, *et al*, 1971).

Posteriormente foram descobertos os restantes poliomavírus pertencentes à família *Papovaviridae*. O BKV foi isolado da urina de um paciente de transplante renal por Gardner, e mais tarde foi isolado o SV40, através de tecido cerebral de dois pacientes, por Weiner (Penney J B & Narayan O, 1973; Gardner SD, *et al*, 1971; Field A M, *et al*, 1974).

#### ❖ **Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP)**

O JCV é o agente etiológico da doença LMP que foi descrita pela primeira vez em 1958. A LMP é uma doença desmielinizante fatal que resulta da infecção lítica de oligodendrócitos. Esta doença neurodegenerativa do sistema nervoso central provoca a destruição das células produtoras de mielina, os oligodendrócitos, que sendo células permissivas permitem a replicação do JCV, desenvolvendo assim lesões cerebrais que culminam na morte do doente (Safak M & Khalili K, 2003).

O JCV apenas se replica e desenvolve esta doença quando o organismo se encontra imunocomprometido, como por exemplo, em pacientes a realizar terapia imunossupressora pós-transplante, pacientes em tratamento quimioterápico, pacientes com doenças auto-imunes como Esclerose Múltipla e Doença de Crohn ou em pacientes portadores do vírus HIV. O vírus tira benefício da instabilidade do sistema imunitário para se replicar e, entre outros efeitos patogénicos e fisiológicos, causar a LMP (Gordon & Khalili, 1998; Gosert R, *et al*, 2010; Darbinyan A, *et al*, 2004).

### 5.1 - Epidemiologia

O JCV é muito comum na população humana. Estima-se que 70 a 90% dos seres humanos estejam infectados por este vírus (Lam G E & Saez DM, 2007).

Na maioria dos casos a infecção ocorre na infância (vírus respiratório de infância) e adolescência e estima-se que mais de 60% das crianças com menos de 15 anos apresentam seroprevalência do JCV (anticorpos contra o vírus), aumentando gradualmente com a idade (Padgett B L, *et al*, 1973; Gordon & Khalili, 1998; Knowles W A, *et al*, 2003).

Este vírus é encontrado em altas concentrações nos esgotos urbanos em todo o mundo, o que levou alguns pesquisadores considerarem a hipótese que as águas contaminadas são a principal via de transmissão humana (Bofill S, *et al*, 2001; Pavesi A, 2005).

### 5.2 - Morfologia e expressão genética

Quando comparado com o SV40 e o BKV, o JCV apresenta semelhanças ao nível do tamanho do DNA (~5.2 pares de bases), da organização genómica e da sequência de DNA.

O JCV não possui cápsula, possui capsídeo icosaédrico e contém um DNA pequeno, circular e de dupla cadeia.

O seu genoma circular (Figura 6) contém duas regiões codificantes de tamanho aproximadamente igual, conhecidas como unidades de transcrição precoce e tardia e uma região reguladora que controla a replicação do DNA, denominada de *TCR* (*Transcriptional Regulatory Region*) (Cole C N, 1996).

As regiões codificantes produzem 6 proteínas, duas proteínas precoces e quatro tardias.

As proteínas precoces, antígeno T grande (Ag-T) e antígeno t pequeno (Ag-t), são altamente oncogênicas e são expressas na fase inicial da contaminação antes da replicação do DNA. Seguidamente são produzidas as quatro proteínas tardias.

Para se replicar, o vírus necessita de controlar a célula a seu favor. As proteínas precoces são responsáveis por induzir a célula hospedeira a entrar na fase S e replicar o DNA viral.

O Ag-T é uma fosfoproteína nuclear essencial na replicação do DNA viral. O JCV necessita de enzimas e cofactores presentes na fase S da interfase mitótica da célula infectada para se conseguir replicar e o Ag-T tem um papel muito importante funcionando como helicase e ATPase. Esta fosfoproteína liga-se ao DNA da célula e promove o desenrolamento da dupla hélice, intervindo assim na manipulação celular para potenciar a integração do DNA viral no DNA celular e a sua multiplicação viral (White & Khalili, 2004).

O Ag-T modula ainda as vias de sinalização celular e estimula a célula, através da capacidade de se ligar a várias proteínas celulares que controlam a progressão do ciclo celular e a apoptose. Assim, o Ag-T direcciona a célula a entrar na fase S do ciclo celular, possibilitando a replicação do seu genoma.

A acção do Ag-t ainda não é amplamente conhecida, contudo sabe-se que *in vitro*, esta fosfoproteína coopera com o Ag-T na transformação celular (White & Khalili, 2004).

Com o avançar da replicação viral são expressos os genes tardios que originam as quatro proteínas tardias. Três dessas proteínas, a VP1, a VP2 e a VP3, são proteínas estruturais com capacidade de se auto-agregar que entram na formação do capsídeo. A formação do capsídeo é originada principalmente pela proteína VP1, sendo assim a proteína que compõe maioritariamente o capsídeo. VP2 e VP3 são estruturalmente muito semelhantes e apresentam-se em menor quantidade na formação desta estrutura (White & Khalili, 2004).

Para além das proteínas referidas, é formada a agnoproteína, que é uma proteína pequena, simples e reguladora, que contribui para a propagação do vírus nas várias etapas do seu ciclo de replicação. Esta proteína aumenta a permeabilidade membranar da célula infectada pelo vírus, o que potencia a saída do vírus da célula através da via não lítica (Merabova N, *et al*, 2008).

A agnoproteína é composta por 71 aminoácidos e funciona como viroporina. As viroporinas são proteínas integrais da membrana que interagem com a membrana

celular para aumentar a permeabilidade a íões e outras moléculas pequenas. Após a sua inserção na membrana, a agnoproteína forma um poro hidrofílico por onde as partículas virais saem da célula. Deste modo, não é provocada a lise da membrana celular (Merabova N, *et al*, 2008).

Pensa-se que este modo de infecção não lítico seja a forma possível de propagação do vírus em células não permissivas.

Estudos realizados sobre agnoproteínas de poliomavírus têm sugerido que, para além da função referida em cima, esta proteína pode contribuir para a propagação do vírus nas várias etapas do seu ciclo de replicação, como por exemplo:

- Incitação da transcrição,
- Processamento de proteínas virais,
- Montagem dos viriões,
- Propagação viral.

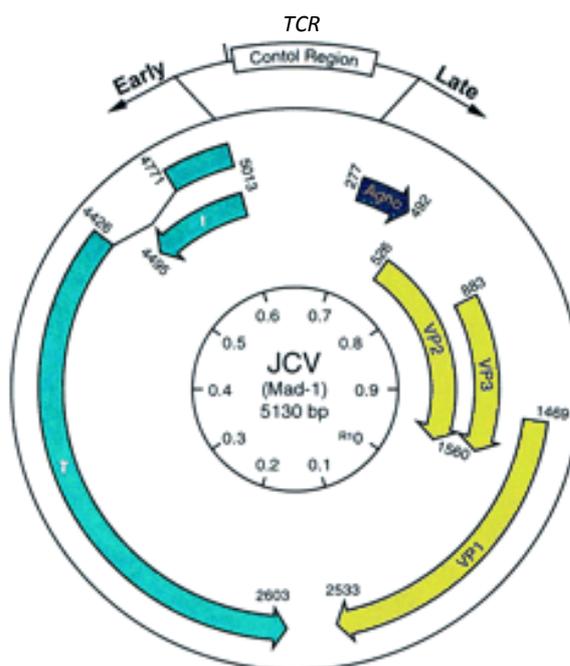


Figura 6 – Disposição estrutural do genoma do JCV (Adaptado de Trowbridge e Frisque, 1995).

### 5.3 – O ciclo de vida do JCV

A infecção viral das células (Figura 7) inicia-se quando o JCV estabelece ligação com os receptores da membrana celular externa  $\alpha(2-3)$  e  $\alpha(2-6)$ . Estes receptores são glicoproteínas e glicolípidos, situados na membrana plasmática das células de todos os mamíferos (Liu C, *et al*, 1998; Fonseca A & Fonseca F, 2006).

Contudo, como foi referido anteriormente, a replicação viral é restrita às células da glia e células linfóides da linhagem B (células permissivas). Após a ligação do vírus à superfície das células referidas, este é endocitado e transportado por vesículas revestidas por clatrina para o núcleo da célula hospedeira. A membrana nuclear é uma barreira de passagem para o JCV, que se auxilia das importinas e do complexo dos poros nucleares para ser transportado para o interior nuclear. Uma vez dentro do núcleo da célula hospedeira, inicia-se a transcrição viral originando dois mRNAs que codificam as duas proteínas precoces, Ag-T e Ag-t (White & Khalili, 2004). Estas duas oncoproteínas, mas principalmente a Ag-T, vão intervir na indução da célula hospedeira a entrar na fase S do ciclo mitótico celular auxiliando assim a integração do DNA viral no DNA da célula.

A mitose celular prossegue e replica o DNA viral, uma vez que este se encontra integrado no DNA da célula.

As proteínas tardias podem assim ser expressas e ocorre a síntese da VP1, da VP2, da VP3 e da agnoproteína.

As VP1, VP2 e VP3 apresentam capacidade de se auto-agregarem e vão formar o capsídeo, que é composto maioritariamente por VP1. Com a formação do capsídeo a montagem viral é concluída e os novos víriões estão em condições de sair da célula hospedeira.

A agnoproteína vai, entre outras funções, facilitar a saída do vírus para fora da célula, através da formação de poros hidrofílicos na membrana celular.

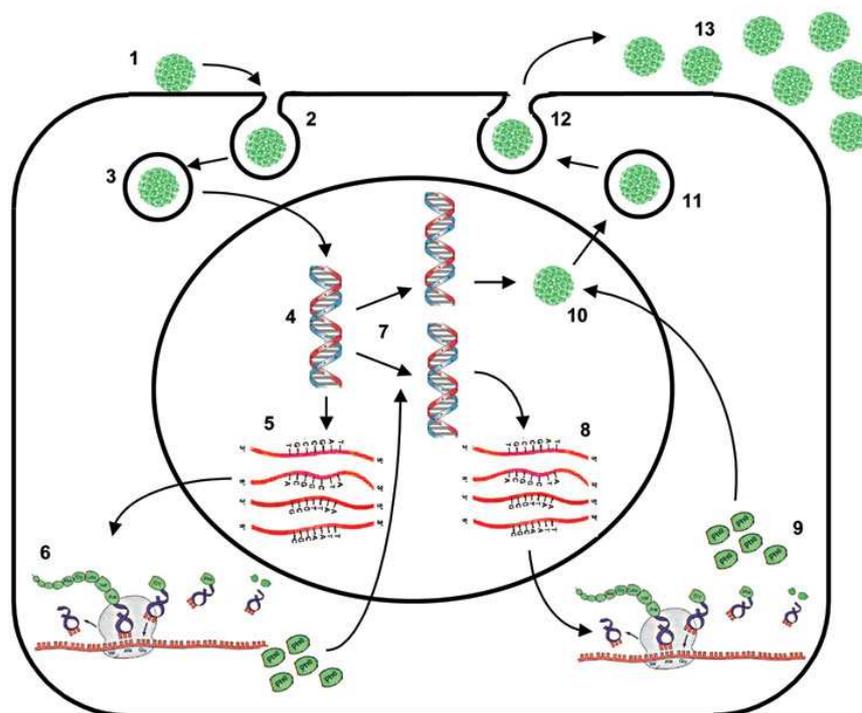


Figura 7 - Representação esquemática do ciclo de vida do JCV (Adaptado de Khalili, K., Gordon, J., & White, M. K. (2006)) 1- Ligação do vírus à membrana celular; 2- Endocitose do vírus; 3- Transporte do vírus por vesículas revestidas por clatrina; 4- Incorporação do DNA viral dentro do núcleo; 5- Manipulação genética da célula por parte do vírus e formação das proteínas precoces; 6- Expressão, por parte da célula, de proteínas virais essenciais à sua replicação; 7- Replicação de genoma viral; 8- Expressão dos genes tardios; 9- Formação das proteínas tardias; 10- Montagem; 11- Transporte do vírus para a membrana plasmática; 12- Saída do virião de dentro da célula, através da agnoproteína; 13- Novos vírus JCV.

Com a finalização da montagem viral resulta a formação de vários vírus descendentes de apenas um progenitor, que saem da célula e estão em condições de infectar outras células do organismo, iniciando do mesmo modo o ciclo de vida viral.

## **6- Associação do JCV ao desenvolvimento do CCR**

A influência oncogénica de certos microrganismos patogénicos infecciosos na formação de neoplasias malignas humanas é conhecida, sendo este um factor de risco importante e a ter em conta, como é o caso da infecção por HIV, associado ao aparecimento de neoplasias malignas em vários locais do corpo, por HBV ou HCV

associados ao cancro de fígado ou por HPV, associado ao carcinoma colo-uterino (Lang TU, *et al*, 2011; Ghazizadeh S, *et al*, 2011; Ohishi W, *et al*, 2011).

A relação entre JCV e a mucosa colo-rectal não está profundamente estudada, contudo várias investigações sugerem a associação deste vírus ao aparecimento de carcinoma por todo o trato gastrointestinal, como é o exemplo do CCR (Enam S, *et al*, 2002; Hori R, *et al*, 2005; Padgett B L & Walker DL, 1971; Sabath & Major, 2002).

A via de infecção não lítica das células pelo JCV revela-se potencialmente oncogénica e com capacidade de desregular e transformar a célula. Como foi referido, a ligação deste vírus aos receptores das glicoproteínas e glicolípidos situadas na membrana celular permite a infecção por parte do vírus a vários tipos celulares e de tecidos humanos ((Liu C, *et al*, 1998; Fonseca A & Fonseca F, 2006).

Ao que tudo indica o distúrbio causado nas vias de sinalização APC e K-Ras está directamente relacionado com o vírus, sugerindo assim que seja o estímulo responsável pelo aparecimento da doença CCR. As oncoproteína Ag-T e Ag-t com características transformantes poderão intervir no início deste processo, indicando assim o JCV como o factor de mutabilidade genética das células colo-rectais, culminando no CCR (White & Khalili, 2004) .

Contudo, nenhum estudo revelou com certeza que o potencial oncogénico de JCV induz a formação do CCR, sendo que a influência deste vírus no desenvolvimento carcinoma humano continua por esclarecer

## **II – Objectivos**

Ainda que o CCR seja uma das principais causas de morte em Portugal e no mundo, a relação do JCV associado a esta doença ainda não é suficientemente compreendida.

Os FCA aparentam ser a forma antecedente ao pólipó. A informação acerca da influência do JCV no desenvolvimento dos FCA é ainda desconhecida, não existindo nenhuma investigação à semelhança da realizada neste projecto.

Com a realização deste projecto, mostrando uma perspectiva inovadora nesta área de investigação, pretendeu-se adquirir novos contributos científicos para compreender a influência do JCV no desenvolvimento dos FCA.

Este trabalho tem assim como objectivo principal a:

Estimativa grosseira do “risco” da presença de sequência de DNA do poliomavírus JC em criptas aberrantes de mucosa colo-rectal humana.

### **III- Material e Métodos**

## **1- Colheita do material biológico**

A colheita do material de estudo foi efectuada no Serviço de Gastreenterologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC). O protocolo da recolha do material biológico foi aprovado pelo Comité de Ética dos HUC e a monitorização e realização da colheita do material foi efectuada pelo Prof. Doutor Pedro Figueiredo conforme o protocolo previamente estabelecido (Anexo I).

Foram recolhidas no total 53 (cinquenta e três) amostras, sendo que 29 (vinte e nove) pertencem ao grupo-controlo de 15 pacientes e 37 (trinta e sete) pertencem a ao grupo de estudo de 15 pacientes (Tabela I e II). Todos os pacientes tinham indicação médica para a realização de colonoscopia (Figura 8) e, eventualmente, de biópsia no decurso desta.

Em cada individuo foi efectuada uma ou duas biópsias, contudo, nos pacientes em que foram colhidas 2 amostras foi utilizado apenas uma delas, uma vez que nos métodos utilizados para extracção de DNA não foi necessário utilizar mais material.

Durante o procedimento reuniram-se os dados clínicos relevantes de cada paciente (Anexo V e Anexo VI).



Figura 8 – Imagem do material utilizado, captada no local onde foi realizada a colheita.

A- Imagem de um Colonoscópio e Azul-Metileno.

## **Grupo-Controlo**

Este grupo é composto por amostras de material biológico proveniente da mucosa normal do intestino grosso de pacientes sem lesões colo-rectais (FCA, pólipos ou CCR).

De cada indivíduo foi efectuada uma a duas biópsias de mucosa cólica normal de uma zona aleatória do intestino.

Das 15 amostras recolhidas, 9 eram de mulheres e 6 eram de homens, com uma idade média de 60 anos (Tabela I).

## **Grupo de estudo**

Do grupo de estudo, colheram-se amostras de FCA identificadas na mucosa colo-rectal dos pacientes, através do método colorimétrico com azul de metileno, e por amostras de mucosa normal colhidas em paciente com FCA.

O azul de metileno é administrado em forma de spray sobre a mucosa colo-rectal, actuando num período de 2 a 3 minutos.

Dos quinze indivíduos (Tabela II), 4 eram mulheres e 11 eram homens, com uma idade média de 64 anos.

Neste grupo recolheram-se 15 amostras de FCA e 9 amostras de mucosa normal não-adjacente ao FCA.

Todas as amostras de mucosa colo-rectal foram colocadas em tubos *ependorf* de 1,5mL com 200µl de RNAlater (Applied, Carlsbad, California) (um reagente de estabilização para RNA) e foram conservadas a -80°C.

Tabela I – Dados demográficos dos pacientes do grupo - controlo (E) e respectivas amostras colhidas de mucosa normal.

Número de Ordem	Designação do Doente	Idade	Género	Nº de amostras
				Mucosa normal
1E	MAFMD	41	Feminino	2
2E	JAS	58	Masculino	2
3E	MCRP	74	Feminino	2
4E	LAMS	66	Masculino	2
5E	MCMT	56	Feminino	2
6E	AV	84	Masculino	2
7E	MLCR	65	Feminino	2
8E	ESSF	23	Feminino	2
9E	AAMF	64	Masculino	1
10E	MOG	52	Feminino	2
11E	MPAF	71	Feminino	2
12E	JMDM	52	Masculino	2
13E	MAF	82	Feminino	2
14E	APPS	25	Feminino	2
15E	ADS	79	Masculino	2

Tabela II – Dados demográficos dos pacientes do grupo de estudo (D) e respectivas amostras recolhidas de FCA e de mucosa normal.

Número de Ordem	Designação do Doente	Idade	Género	Nº de amostras	
				Criptas Aberrantes	Mucosa normal não-adjacente a FCA
1D	MO	80	Masculino	2	–
2D	MAPA	81	Feminino	1	–
3D	AS	72	Masculino	1	–
4D	CCMF	40	Feminino	2	–
5D	DYY	53	Masculino	2	–
6D	CANR	58	Masculino	1	–
7D	AAMF	64	Masculino	1	1
8D	MRM	50	Masculino	1	1
9D	JPP	51	Masculino	2	2
10D	MLF	83	Feminino	1	2
11D	ADS	82	Masculino	2	1
12D	JAAS	39	Masculino	2	1
13D	JDSR	54	Masculino	2	1
14D	RS	82	Feminino	2	1
15D	MASG	68	Masculino	2	1

## 2 - Estratégia experimental

Este trabalho experimental fundamenta-se na detecção do genoma do JCV. Para isto, foi necessário extrair o DNA das amostras colhidas e amplificar esse DNA por *Nested-PCR*. Por fim, a amplificação resultante foi analisada através de electroforese horizontal, em gel de agarose (Figura 9).

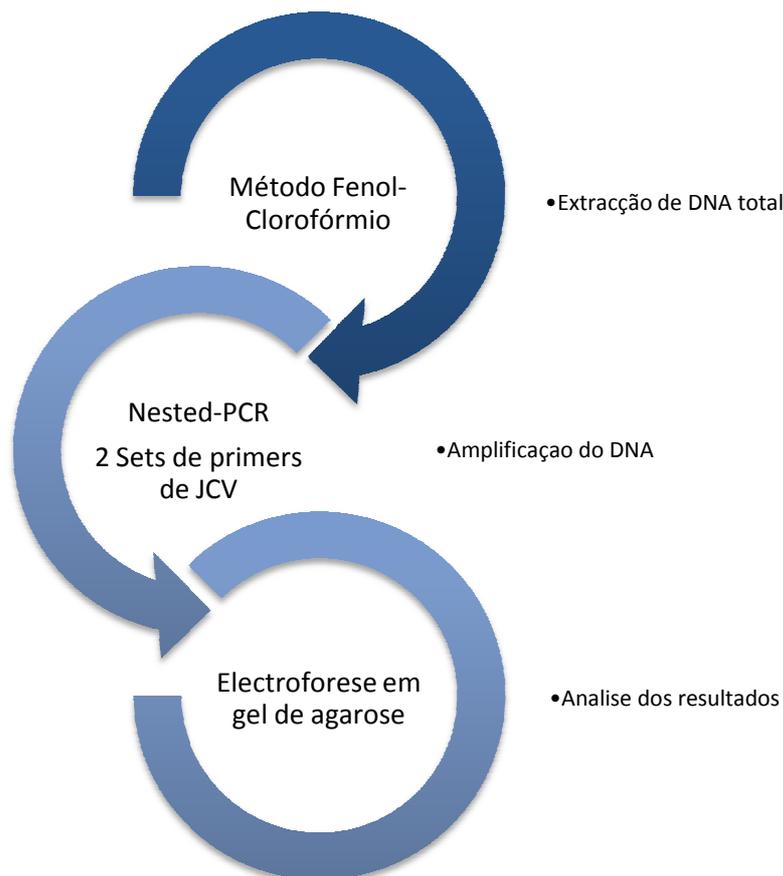


Figura 9 - Representação esquemática da estratégia experimental utilizada.

### 2.1 - Extração do DNA

Inicialmente, foram descongeladas as amostras de mucosa colo-rectal que se encontravam conservadas em *RNAlater* a  $-80^{\circ}\text{C}$  e foram colocadas em novos *ependorfs*.

De seguida, efectuou-se a extração de DNA das amostras de mucosa colo-rectal a partir do método de fenol/clorofórmio/ácido isoamílico (Anexo VII). Em todas as amostras foi possível extrair DNA através deste método (Figura 10). Esta técnica de

fenol/clorofórmio/ácido isoamílico apresenta consideráveis desvantagens no tempo necessário para a sua execução, dado que, comparativamente a outras técnicas de extracção de DNA, é um método bastante demorado, no entanto é o método que apresenta custos menos elevados.



Figura 10 – Imagem demonstrativa do resultado final da realização da extracção do DNA de algumas das amostras colhidas, através do método fenol/clorofórmio/ácido isoamílico.

## 2.2– Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica PCR é uma metodologia molecular *in vitro* que se baseia na amplificação exponencial selectiva de um segmento específico de DNA.

Esta é uma técnica simples que se baseia no processo normal de replicação do DNA da divisão celular e tem como objectivo o aumento exponencial do fragmento de DNA pretendido, cujo tamanho (em pares de bases ou pb) corresponde à distância que medeia entre os dois *primers* utilizados na reacção (Kim *et al.*, 2001).

Para a sua realização foi necessário o conhecimento prévio das sequências de bases nucleotídicas (*Primers*) que complementam, a montante e a jusante, a sequência-alvo, para posteriormente delimitar essas extremidades a fim de obter a ampliação específica da sequência pretendida.

Os *primers* são curtas sequências sintéticas de nucleótidos, que contêm aproximadamente 20 a 30 bases.

A actividade do PCR depende da participação de vários componentes químicos e térmicos, que vão ser utilizados pela enzima que catalisa a reacção, a Taq DNA polimerase.

A Taq polimerase é uma polimerase de DNA termoestável, ou seja, mantém-se activa a temperaturas elevadas. Esta particularidade permite a automatização do processo e o aumento da especificidade da reacção.

Para ocorrer a catálise enzimática a Taq DNA polimerase apresenta alguns requisitos, nomeadamente:

- Dois primers pré-sintetizados (*forward e reverse*), que forneçam uma extremidade 3'-OH livre, a partir da qual vão sendo adicionados os nucleótidos.
- Um segmento de DNA que sirva de molde (a sequência-alvo), a partir do qual vai efectuar o alongamento e copiar a cadeia complementar simples.
- Nucleótidos livres (dNTP's) para produzir a cadeia complementar (dATP, dTTP, dCTP e dGTP);
- Iões Mg<sup>2+</sup> que funcionam como co-factor.

Este é um processo que decorre em três passos (Figura 11A), a desnaturação, o *annealing* e a extensão que, em conjunto, correspondem a um ciclo que se repete um número específico de vezes (35-40 ciclos) e resulta na multiplicação do número de moléculas de DNA mediante a relação  $2^n$  (n = número de ciclos).

Um ciclo de PCR consiste assim nos seguintes passos:

#### 1º Passo – Desnaturação térmica

Aquando da desnaturação térmica, ocorre a elevação da temperatura no aparelho de PCR, o termociclador (Figura 11B), até aproximadamente 94°C, para que aconteça a separação da cadeia de dupla hélice da sequência alvo.

## 2º Passo – Hibridização ou *Annealing*

A hibridização dos *primers* nas regiões complementares consiste na ligação dos *primers* às extremidades da sequência-alvo. A temperatura de hibridização necessária depende do tipo de nucleótidos constituintes dos primers e a escolha criteriosa desta temperatura vai permitir que estas sequências iniciadoras se liguem à sequência-alvo com elevada especificidade.

## 3º Passo: Extensão

Após a ligação dos *primers*, a temperatura eleva-se a aproximadamente 72°C e a Taq DNA polimerase atinge o seu máximo de eficiência, uma vez que esta temperatura é a temperatura óptima de funcionamento da enzima. A ligação da enzima inicia-se sempre no extremo 3' do *primer* e a extensão da cadeia ocorre exclusivamente na direcção 5' para 3'.

O processo de síntese é iniciado e a polimerase começa a incorporar os dNTP's complementares na sequência-alvo.

Acontece assim o alongamento das duas cadeias anteriormente desnaturadas, originando-se duas cadeias exactamente iguais às cadeias de origem. Na conclusão do processo vão resultar duas cadeias de dupla hélice.

Para este projecto foi utilizado um conjunto de *primers* desenhados especificamente para a região de consenso do DNA viral inserida no gene que codifica o Ag-t (Tabela III). A escolha destes *primers* resultou da sua eficácia comprovada na detecção da sequência do vírus em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de laboratório.

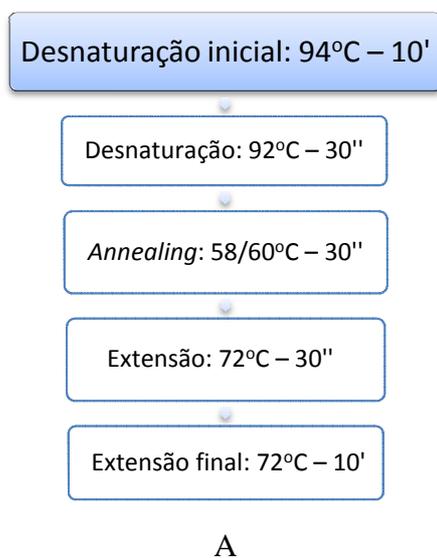
Tabela III – Resumo das características dos *primers* usados nas amostras de estudo.

Designação dos <i>Primers</i> ( <i>Forward e Reverse</i> ) (Stabvida, Caparica, Portugal)	Gene alvo	Sequência de Nucleótidos	Temperatura de <i>Annealing</i> (°C)	Tamanho do Amplímero (pb)
JCTR1 F JCTR2 R	Antigénio-t (região consenso)	5'-cttgggtaagtacaccca-3' 5'-atgcaagaactccacctg-3'	58°C	347pb
JCTR3 F JCTR4 R		5'-tccacacaagtggtgctt-3' 5'-ggtggggacgaagacaagat-3'	60°C	265pb

As condições utilizadas nas reacções de amplificação dos fragmentos por *Nested-PCR*, foram:

- Volume de reacção = 50 $\mu$ L;
- 1 $\times$ PCR Buffer (Bioron, Ludwigshafen Alemanha);
- 2 mM Mg 2+ (Bioron, Ludwigshafen Alemanha);
- 200 $\mu$ M dNTP's (Bioron, Ludwigshafen Alemanha);
- 2.5 uni Taq DNA polimerase (Bioron, Ludwigshafen Alemanha);
- 20pmoles *primer forward*
- 20pmoles *primer reverse*

O termociclador automático é o aparelho onde se efectuam os ciclos térmicos que são manualmente programados. Neste trabalho realizaram-se 40 ciclos térmicos que ocorreram da seguinte maneira:



B

Figura 11- Esquema representativo dos ciclos térmicos necessários à amplificação dos fragmentos por PCR (A). Imagem do termociclador PCR Biometra (Maryland, United States of America) utilizado neste projecto (B).

Em cada reacção de PCR foram amplificados, além das amostras, um controlo positivo e um controlo negativo do JCV. Como controlo positivo foi utilizado o plasmídeo pBR322 – BamHI, gentilmente cedido por Kamel Khalili MD PhD (Investigador do Neurovirology and Cancer Biology Department, Temple University, Philadelphia- USA), que é o genoma do JCV-Mad-1. Este plasmídeo permite fiabilizar a experiencia, garantindo o sucesso dos resultados.

No controlo negativo, foi utilizada água destilada para despistagem de potenciais contaminações dos reagentes de PCR.

### 2.3 - Electroforese em gel de agarose

A electroforese (Figura 12) é uma técnica básica de biologia molecular que consiste na separação de biomoléculas de acordo com sua carga eléctrica e peso molecular. Este método permite a separação de partículas orgânicas como RNA, DNA e proteínas pela sua migração num gel durante a aplicação de uma diferença de potencial.

Na matriz porosa do gel são impostas maiores restrições ao movimento das moléculas maiores (menor migração), enquanto que as moléculas mais pequenas se difundem facilmente através dos poros do gel (maior migração);

A mobilidade da biomolécula no gel vai ser maior quanto menor for a sua razão carga/massa.

Neste trabalho, a realização da técnica de electroforese em gel de agarose teve como objectivo obter a separação e resolução dos fragmentos resultantes da amplificação feita anteriormente por PCR.

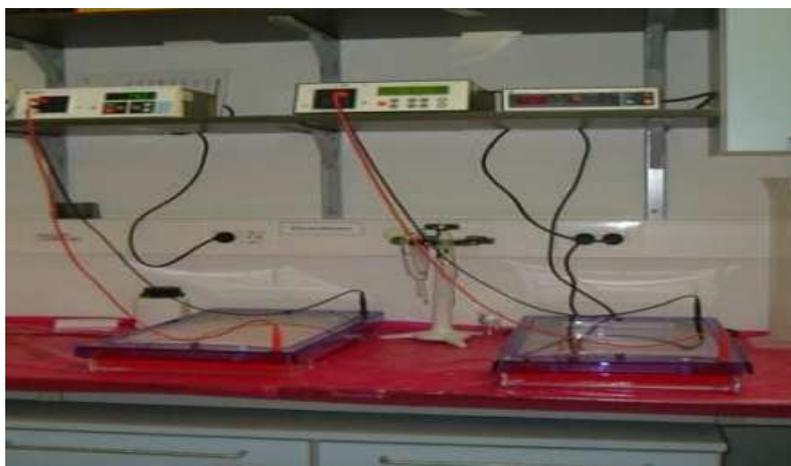


Figura 12- Imagem do sistema de electroforese horizontal utilizado neste projecto para a separação dos produtos de amplificação por PCR.

Na realização desta experiência apenas foi utilizada em electroforese a separação do DNA pelo seu peso molecular, sendo assim necessários vários componentes, nomeadamente:

- Uma solução que contenha a mistura de biomoléculas que se pretendem separar;

- Um suporte físico, como por exemplo o gel de agarose, com uma constituição que imponha restrição ao movimento de migração das moléculas que se pretendem separar;
- Um aparelho específico para electroforese que gere o campo eléctrico necessário para induzir o movimento de moléculas;
- Uma solução tampão que confira a todas as moléculas uma carga com o mesmo sinal, e de igual densidade, de modo a que as moléculas sejam separadas apenas de acordo com a sua massa.

Os ácidos nucleicos, como o DNA, devido à presença de grupos fosfato nos seus nucleótidos, encontram-se carregados negativamente. Consequentemente quando sujeitos a um campo eléctrico migram em direcção ao ânodo. Todos os ácidos nucleicos apresentam a mesma relação carga/massa, portanto a separação das moléculas de DNA no gel acontece de acordo com o seu tamanho, ou seja, de acordo com o seu número de pares de bases.

No final da electroforese obtêm-se várias bandas, em que cada uma é constituída por diferentes moléculas com o mesmo peso molecular. O tamanho dos fragmentos de DNA presentes em cada banda pode ser estimado por comparação com as bandas de um padrão molecular, que constitui uma mistura de fragmentos de DNA de tamanho conhecido (Williams *et al.*, 2001).

A execução desta técnica electroforética realizou-se do seguinte modo:

- Prepararam-se geles de agarose, concentrados a 2%, para resolução de produtos de PCR entre 265-347pb, por adição de agarose em pó e de tampão de electroforese TAE 1×, contendo Tris HCl 50mM, ácido acético 10% e EDTA 10mM.
- Antes da polimerização dos geles, adicionou-se à mistura um corante fluorescente (quando com luz UV) que se intercala nas moléculas de DNA, denominado Brometo de etídio (Sigma, Madrid, Espanha), para posterior visualização das bandas.
- Uma vez solidificados, os geles foram colocados num sistema de electroforese horizontal e submersos com tampão de electroforese TAE 1x.
- De seguida, as amostras a analisar foram misturadas com um composto de elevada densidade (*loading buffer*), constituído por glicerol a 50% e por dois corantes a 0,025% (bromofenol azul e xileno de cianol), que permitem monitorizar a migração das moléculas durante a electroforese.

- Foi depositado no gel um volume total de 7µL por amostra.
- Os fragmentos de interesse foram identificados por comparação com o padrão de pesos moleculares de 100pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), formado por uma mistura de fragmentos de tamanho conhecido.
- O sistema de electroforese foi ligado a uma fonte de alimentação (Figura 10), deixou-se correr a electroforese até completa separação das moléculas de DNA, retirou-se o gel e colocou-se num aparelho transiluminador de emissão de luz UV, que permite visualizar as bandas fluorescentes de DNA.
- Finalmente, o tamanho da banda de interesse foi determinado por comparação com a correspondente banda do padrão (Figura 13).

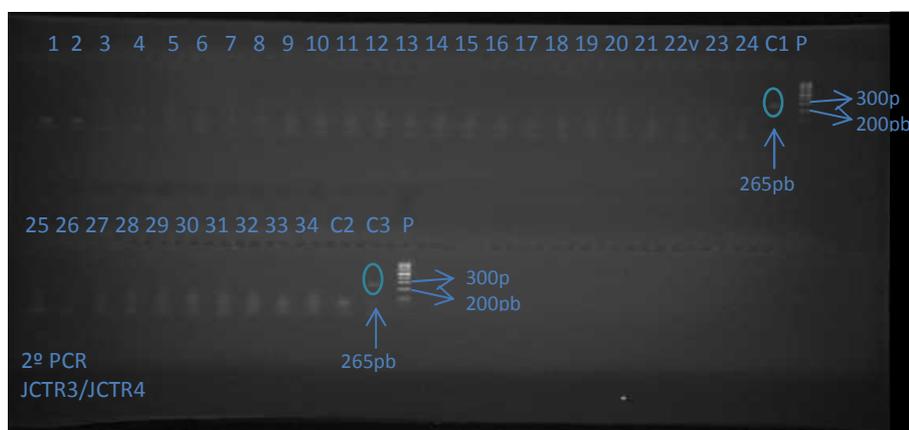


Figura 13- Imagem de um dos géis de agarose realizado neste estudo. 1-34 – Amostras biológicas; C1 e C3 - controlo positivo (plasmídeo); C2 - C2 – Controlo negativo (água destilada); PM – padrão de pesos moleculares 100pb.

### **3 - Análise estatística**

Através dos resultados obtidos, os dados foram tratados e apresentados sob a forma de frequências absolutas e relativas. Para se efectuar a comparação entre ambos os grupos e entre amostras de cada grupo, foi utilizada uma estimativa aproximada do “risco”, a razão dos produtos cruzados (RC), em inglês Odds Ratio, com os respectivos intervalos de confiança (IC) para um intervalo de confiança de 95%.

## **IV – Resultados e Discussão**

## 1 - Análise da presença da sequência de DNA do JCV

Nas amostras biológicas foi analisada a presença de DNA do poliomavírus, previamente amplificado por *Nested-PCR*, através dos resultados de electroforeses horizontais.

Seguindo a linha de investigação deste grupo de trabalho, neste projecto foram ainda analisados resultados da investigação anterior a este estudo para a presença da sequência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC em pólipos e em mucosa normal não-adjacente a pólipos, com o objectivo de compreender a influência deste vírus na formação da sequência precursora do CCR (FCA/Pólipo/CCR).

Analisando as frequências absolutas (nº total de amostras) e relativas (nº de amostras positivas para a presença de JCV/nº total de amostras) da presença do JCV observou-se que (Tabela IV): em nenhuma das amostras analisadas do grupo-controlo foi verificada a presença do JCV (no total de 15 = 0%); em nenhuma das amostras analisadas do grupo de estudo foi verificada a presença de JCV, grupo este que se subdivide em dois tipos de amostras colhidas, as amostras de FCA (no total de 15 = 0%) e as amostras de mucosa normal não adjacente ao FCA ( no total de 9 = 0%) .

Tabela IV – Frequência absoluta e relativa da presença do vírus JCV nas amostras do grupo de controlo e no grupo de estudo.

	Grupo de controlo	Grupo de estudo	
		Amostras de FCA	Amostras de mucosa normal não-adjacente ao FCA
<b>Frequência absoluta</b>	0 (15)	0 (15)	0 (9)
<b>Frequência relativa</b>	0%	0%	0%

❖ **FCA vs mucosa não-adjacente ao FCA vs mucosa normal do grupo-controlo**

Os resultados da análise de todas as amostras biológicas não detectaram a presença de JCV em qualquer FCA, mucosa colo-rectal normal de indivíduos com estas lesões ou mucosa do grupo-controlo (Figura 14).

Se o número de amostras deste estudo fosse superior e os resultados permanecessem semelhantes aos obtidos, seria possível formular duas explicações para a ausência do JCV:

- O tropismo do JCV é igualmente baixo em FCA, em mucosa colo-rectal de indivíduos com estas lesões e em mucosa do grupo-controlo, sugerindo assim que a acção do vírus nestes casos seja semelhante, o que exclui o JCV de ser o factor que estimula a formação dos FCA.
- O vírus JCV pode infectar a mucosa colo-rectal normal e despoletar o desenvolvimento da cripta aberrante. A ausência deste vírus nos FCA é explicada com a possibilidade de o ambiente dentro da cripta não ser favorável à sua permanência, saindo de dentro dela após a desregular ou permanecendo dentro da célula num estado de latência não detectável.

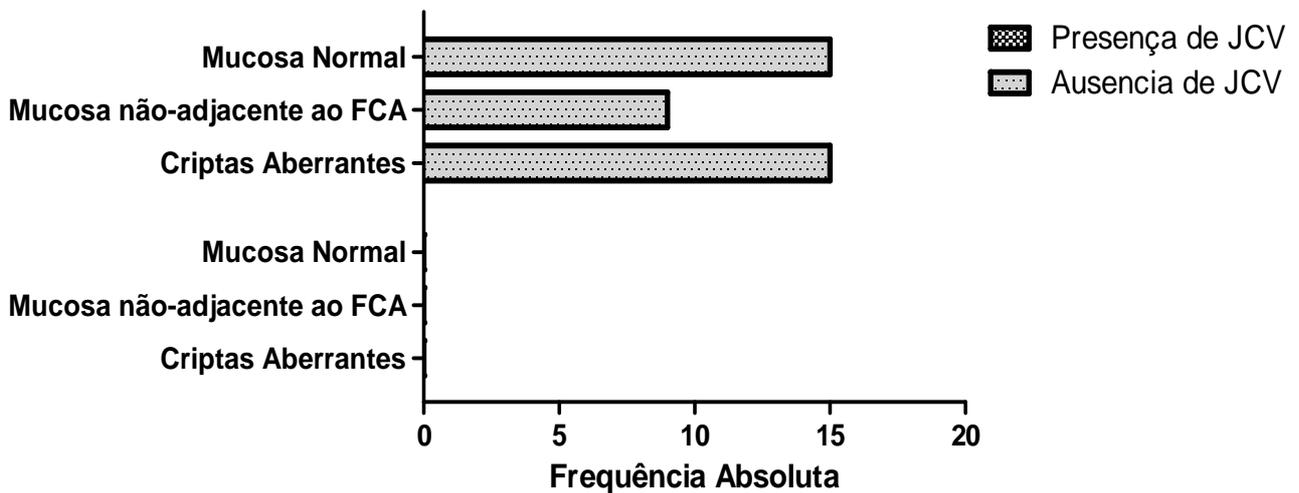


Figura 14- Comparação das frequências absolutas da presença JCV em FCA, mucosa não-adjacente e mucosa normal.

❖ **FCA vs Pólipos vs Mucosas não-adjacentes**

A comparação entre pólipos e o grupo-controlo e de estudo deste projecto revela ser bastante importante para perceber a influência do JCV em cada etapa precedente do CCR (Figura 15). No projecto realizado anteriormente sobre pólipos, observou-se que em todas as amostras de pólipos (que continha pólipos neoplásicos e não neoplásicos) foi identificada a presença do JCV (100%), enquanto que em 38 amostras de mucosa colo-rectal não-adjacente ao pólipo apenas em 5 (13,2%) foi identificado o JCV.

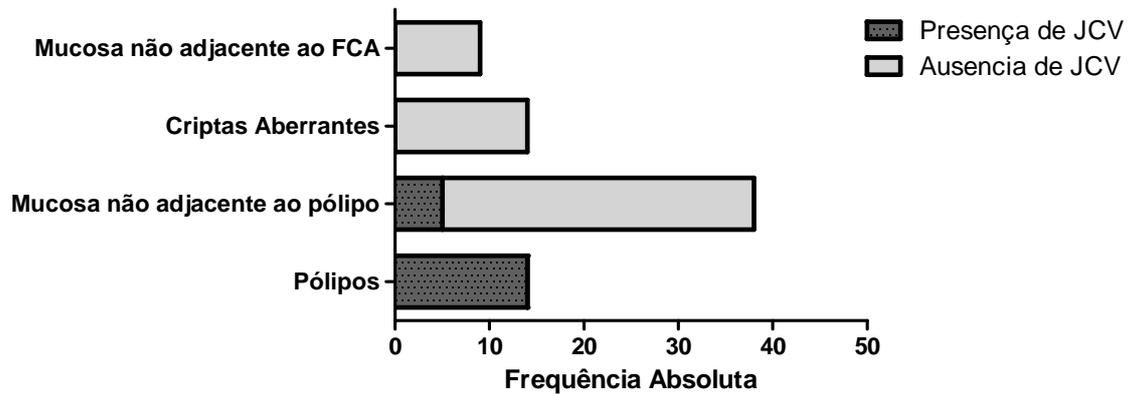


Figura 15 – Comparação da presença e ausência da sequência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC entre amostras de mucosa colo-rectais e pólipos.

❖ **FCA vs Pólipos**

Estimou-se “risco” da presença do JCV entre o FCA e pólipos que revelou que as diferenças entre os dois grupos eram significativas (Tabela V). O facto de existir 100% de presença do vírus em pólipos e nenhuma presença do mesmo em FCA (Figura 16) sugere que o vírus apresenta elevado tropismo pelo pólipo mas não o apresenta pela cripta aberrante.

Tabela V - Estimativa de “risco” (RC), e intervalos de confiança (IC95%) da presença de DNA do JCV em FCA (n=15) versus pólipos (n=14).

	Estimativa do “risco” (RC)	Intervalo de Confiança (IC95%)	Significância
<b>FCA x Pólipo</b>	899	16.70 – 48390	Sim

O teste estatístico revelou-se bastante significativo entre os dois grupos, sugerindo que o JCV apresenta comportamentos antagônicos em criptas aberrantes e pólipos.

A estimativa de “risco” (RC=899) revela que a probabilidade da presença do JCV acontecer no pólipo é 899 vezes superior do que no FCA, ou seja, em 899 repetições da análise do DNA do JCV, todas as presenças se verificam no pólipo e não no FCA. Este resultado estimado revela que há maior tropismo pelo pólipo do que pelo FCA.

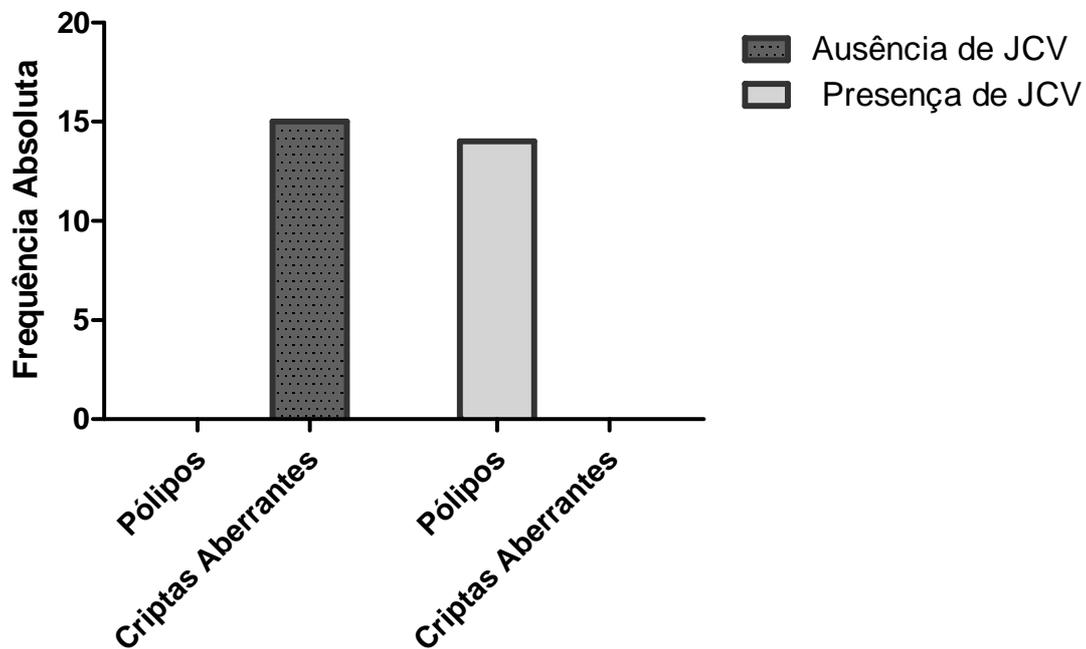


Figura 16 - Comparação da presença e ausência da seqüência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC entre amostras colhidas em FCA e pólipos.

#### ❖ Pólipos vs Mucosa não-adjacente ao FCA

No grupo de amostras de mucosa não-adjacente a presença de JCV não foi observada em nenhuma das 9 amostras (Figura 17).

Determinou-se o “risco” entre pólipos e mucosa não-adjacente ao FCA que revelou significância entre os dois grupos (Tabela VI).

Tabela VI - Estimativa de “risco” (RC), e intervalos de confiança (IC95%) da presença de DNA do JCV da mucosa não-adjacente a FCA( n=9) *versus* pólipos (n=14).

	<b>Estimativa do “risco” (RC)</b>	<b>Intervalo de Confiança (IC95%)</b>	<b>Significância</b>
<b>Mucosa não-adjacente a FCA x Pólipo</b>	551,0	10.04 - 3025	Sim

Verificou-se que o “risco” da presença do JCV é significativo entre mucosa não-adjacente a FCA e pólipo. Contudo, a comparação entre criptas aberrantes e pólipos apresenta maior “risco” (RC=899) do que entre mucosa não-adjacente ao FCA e pólipo (RC=551). Esta diferença de “risco” entre amostras do grupo de estudo e pólipos poderá sugerir a existência de uma ligação diferente por parte do vírus pela mucosa não-adjacente ao FCA e pelo FCA.

Estes resultados poderão reforçar o pressuposto, em cima referido, de que o ambiente dentro da cripta aberrante poderá não ser propício ao desenvolvimento, ou até, à permanência do vírus incitando-o a sair da célula ou ficar em estado de latência indetectável. Porém não se pode afirmar que o tropismo que existe do vírus pelo FCA e mucosa não-adjacente ao FCA, será diferente ou semelhante, pois o número de amostras recolhidas é reduzido, inviabilizando a completa certeza da suposição.

Esta suposição também é reforçada pelos resultados da investigação em pólipos obtidos anteriormente pelo grupo de trabalho, onde em 38 das amostras recolhidas em mucosa não-adjacente de pólipos, 5 apresentavam positividade para o vírus. Se a mucosa normal de indivíduos com pólipos apresenta, embora baixa, positividade para o vírus em alguns indivíduos, e se na mucosa normal de indivíduos com FCA a negatividade é total, embora que o número de amostras seja reduzida, então sugere-se que o ambiente dentro das criptas aberrantes seja inóspito para o JCV.

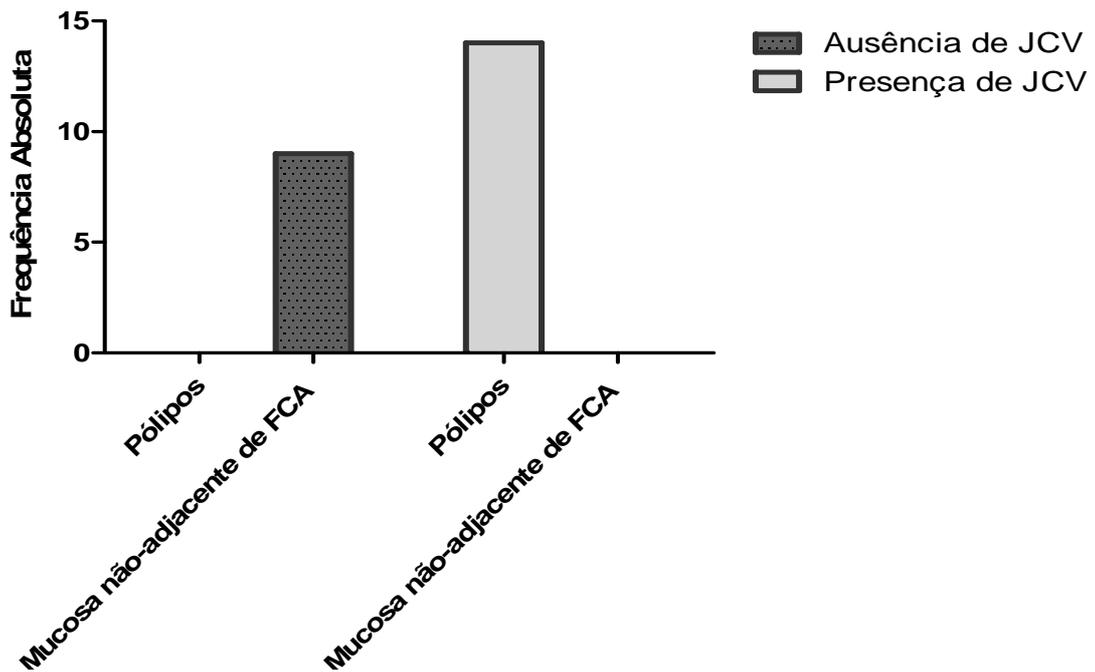


Figura 17 - Comparação da presença e ausência da seqüência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC entre amostras colhidas em mucosa não-adjacente ao FCA e pólipos.

❖ **Mucosa normal do grupo-controlo vs Pólipo**

No grupo de amostras de mucosa normal a presença de JCV não foi observada em nenhuma das 15 amostras (Figura 18).

Determinou-se o “risco” da presença viral em mucosa normal de controlo e pólipos, que revelou significância entre os dois grupos (Tabela VII).

Tabela VII - Estimativa de “risco” (RC), e intervalos de confiança (IC95%) da presença de DNA do JCV em mucosa normal do grupo de controlo(n=9) versus pólipo (n=14).

	Estimativa do “risco” (RC)	Intervalo de Confiança (IC95%)	Significância
<b>Mucosa normal x Pólipo</b>	899,0	16.70 - 48390	Sim

A significância entre estes dois grupos é elevada, o que veio fortalecer o pressuposto do estudo anterior. Na investigação anterior sobre pólipos concluiu-se que existia um elevado tropismo do vírus pelo pólipo. A significância elevada deste estudo veio confirmar e reforçar esta conclusão.

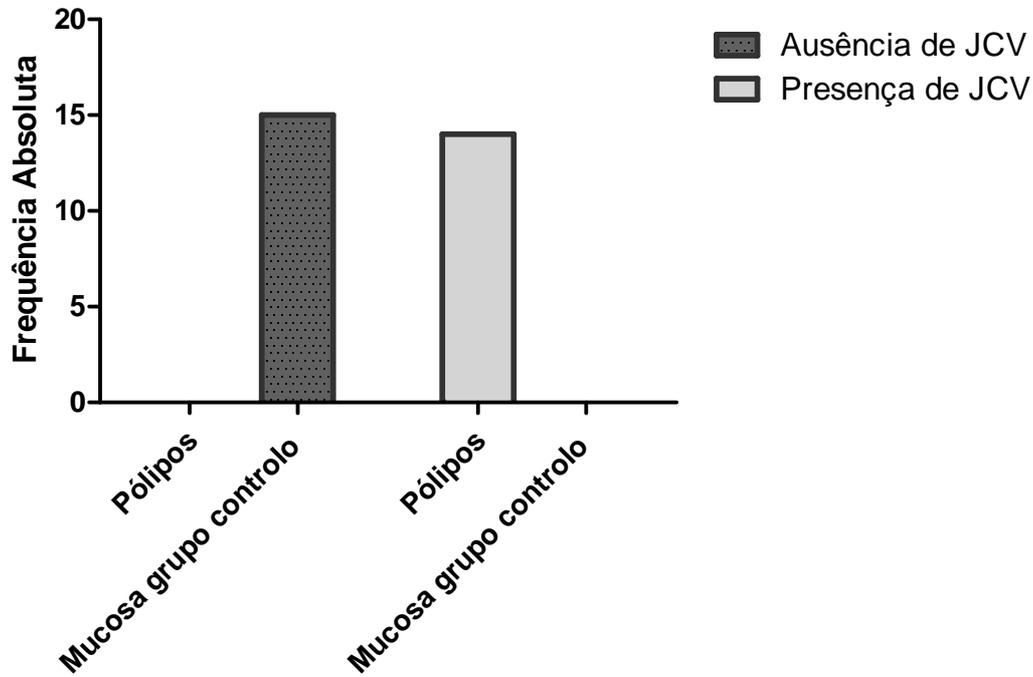


Figura 18 - Comparação da presença e ausência da seqüência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC entre amostras colhidas em mucosa do grupo de controlo e pólipos.

❖ **FCA vs Mucosa não-adjacente ao pólipo vs Mucosa não-adjacente ao FCA**

Foi realizada a comparação da presença do vírus entre a mucosa normal não-adjacente ao pólipo (com 5 amostras positivas para JCV e 33 amostras negativas, com frequência relativa para a presença de JCV=13,2%), FCA e mucosa normal não-adjacente ao FCA (Figura 18). Calculou-se o “risco” da presença do JCV em FCA e mucosa normal não-adjacente ao pólipo, e em mucosa normal não-adjacente ao FCA e mucosa normal não-adjacente ao pólipo. Nenhuma das comparações apresentou significância (Tabela VIII).

Tabela VIII - Estimativa de “risco” (RC), e intervalos de confiança (IC95%) da presença de DNA do JCV em FCA (n=15) e mucosa normal não-adjacente ao pólipó (n=38) e em mucosa normal não-adjacente ao FCA (n=9) e mucosa não-adjacente ao pólipó (n=38).

	<b>Estimativa do “risco” (RC)</b>	<b>Intervalo de Confiança (IC95%)</b>	<b>Significância</b>
<b>FCA x Mucosa não-adjacente ao pólipó</b>	0,1965	0.01020 - 3.783	Não
<b>Mucosa não-adjacente ao FCA x Mucosa não-adjacente ao Pólipó</b>	0,3206	0.01622 - 6.337	Não

Analisando a presença do JCV em FCA, mucosa não-adjacente desta lesão e mucosa não-adjacente do grupo de estudo da investigação feita anteriormente, observou-se que a presença do vírus apenas acontece na mucosa não-adjacente ao pólipó numa frequência relativa de 13,2% (Figura 19).

O teste estatístico revelou que o “risco” da presença do JCV não apresenta significância nos FCA, mucosa normal não-adjacente ao FCA e mucosa normal não-adjacente ao pólipó, o que sugere, apoiando assim os pressupostos já referidos, que o comportamento do JCV poderá ser semelhante nos três tipos de mucosa, não havendo nenhum indício que o JCV poderá influenciar de algum modo o desenvolver da cripta aberrante. Contudo a influência do JCV na formação da cripta aberrante não pode ser seguramente negada pelos resultados obtidos, uma vez que o número de amostras é baixo para definir pressupostos.

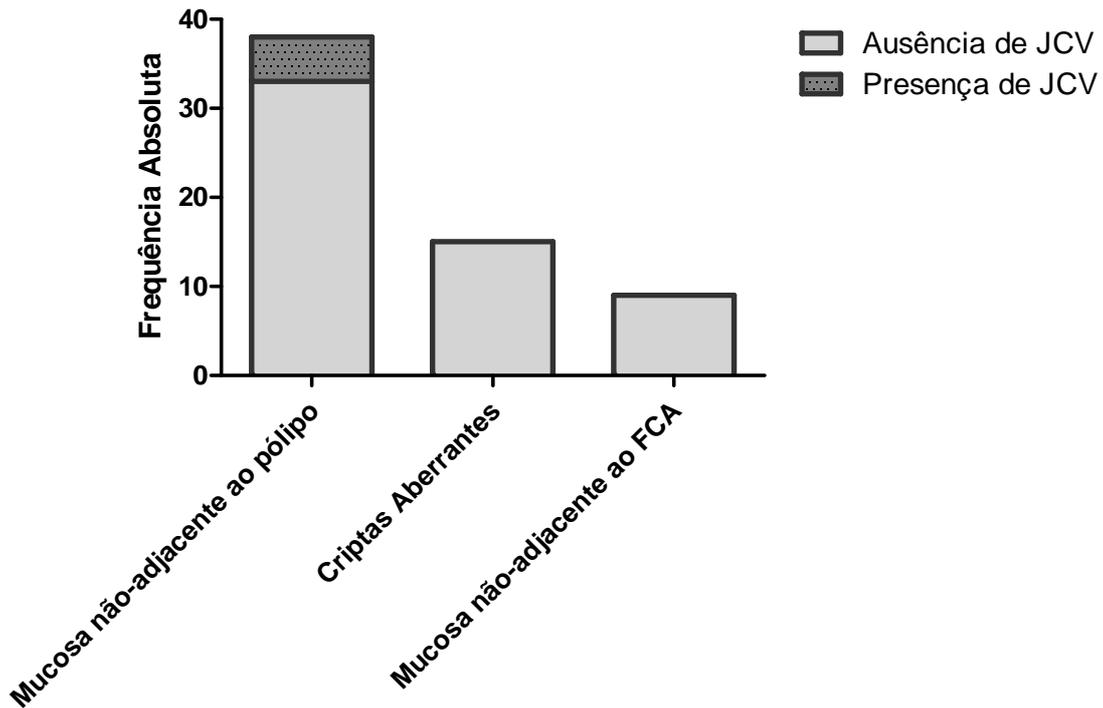


Figura 19 - Comparação da presença e ausência da sequência de DNA do poliomavírus neurotrópico humano JC em amostras colhidas em FCA e mucosa não-adjacente ao pólipo, e em a mucosa não-adjacente ao FCA e a mucosa não-adjacente ao pólipo.

De todas as amostras analisadas, apenas os pólipos (100%) e a mucosa não-adjacente ao pólipo (13,2%) apresentavam positividade para o do poliomavírus neurotrópico humano JC.

Esta presença total nos pólipos comparativamente aos resultados obtidos nesta investigação comprovou o tropismo do vírus pelo pólipo.

A presença de JCV na mucosa não-adjacente ao pólipo sugere que o estado de pólipo está directamente associado ao vírus JC, que comparativamente com estados antecedentes ao pólipo, não revela qualquer presença viral. Pressupõe-se assim que o pólipo poderá conter um ambiente celular mais vantajoso para o vírus. A presença viral de 13,2% em mucosa não-adjacente ao pólipo, comparativamente à ausência de JCV em mucosas não-adjacentes ao FCA e mucosa normal, pode sugerir que a infecção viral que ocorre no pólipo aumenta a associação entre o vírus e a mucosa normal, elevando assim a percentagem de infecção da mucosa normal.

Porém, a representatividade dos resultados apenas permitem tirar conclusões acerca dos mesmos, nunca eliminando a hipótese de a ausência de JCV nas amostras de estudo e controlo implicar a negatividade em amostras analisadas posteriormente a esta investigação.

Na recolha das amostras de mucosas colo-rectais e amostras de FCA não existiu o risco de adulteração dos resultados, uma vez que o erro de aleatoriedade topográfica e a representatividade volumétrica são quase inexistentes. Desconhece-se se a topografia e o reduzido tamanho das amostras de mucosa colo-rectais colhidas por biópsia, apresentam diferenças consideráveis em relação a toda a mucosa colo-rectal.

Os FCA foram recolhidos directamente da zona pretendida.

As amostras das mucosas colo-rectais foram aleatoriamente colhidas sem que este facto fosse necessariamente prejudicial para o estudo em causa.

Posto isto, a representatividade da colheita de FCA e mucosa colo-rectal evidencia ser inquestionável.

## **V – Conclusões**

De acordo com a análise dos resultados parece não existir tropismo do vírus JC pelo FCA, uma vez que nenhuma das amostras evidenciava a existência de DNA viral. Este comportamento do vírus revela-se muito importante e antagónico comparativamente ao que acontece em pólipos, uma vez que a sua presença foi confirmada no total das amostras, analisadas num projecto anterior do mesmo grupo de trabalho.

A ausência de tropismo nos FCA parece ser semelhante na mucosa normal colo-rectal. Contudo, o número reduzido de amostras obtidas impede que tal se afirme com clareza.

A sequência patogénica FCA/Pólipo/CCR não parece ser estimulada pela presença do DNA do vírus JC, uma vez que para além de não existir em nenhuma das amostras de FCA, confirmou-se, no estudo realizado anteriormente, a presença deste DNA em amostras de pólipos hiperplásicos (não neoplásicos).

Embora o JCV não seja exclusivamente representativo da sequência destas lesões, não se exclui a possibilidade de o JCV ser a causa que despoleta a sequência pólipo neoplásico/adenocarcinoma. O elevado tropismo pelo pólipo sugere que esta lesão poderá ser um ambiente *sui generis* para a presença de DNA viral.

Enquanto que, no caso do pólipo a influência do JCV pode ser subjacente à sua formação, coincidente à sua formação sem o influenciar directamente, ou ser um factor estimulante na sequência de formação do pólipo, no caso da cripta aberrante, concluímos que a sua intervenção não será na formação subjacente, coincidente ou sequencial, a não ser que a sua acção seja momentânea e posteriormente saia da célula, ou que ocorra num número reduzido de FCA.

## **VI - Referencias Bibliográficas**

Abraham LK (2002). *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. St. Louis: Mosby. ISBN 0-323-01639-1.

Alcamo I E & Bergdahl J (2003), *Anatomy Coloring Workbook*, Princeton Review, p.229.

Bernstein C, Bernstein H, Payne C M, *et al.* Field defects in progression to adenocarcinoma of the colon and esophagus. *Electronic Journal of Biotechnology*. (2000) Vol. 3 No. 3, DOI: 10.2225/vol3-issue3-fulltext-1.

Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* (1987); 37:147-51.

Bofill S, Formiga C M, Clemente-Casares, *et al.* "Potencial de transmissão de poliomavírus humanos através do trato gastrointestinal após a exposição a partículas virais ou DNA viral". *J. Virol.* (2001); 75 (21): 10290-10299. doi : 10.1128/JVI.75.21.10290-10299.2001 . PMC 114603 . PMID 11581397 .

Cavallo F, Giovanni C, Nanni P, *et al.* The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother* (2011) 60(3): 319–326. doi: 10.1007/s00262-010-0968-0.

Cerato M M, Cerato N L, Meurer L, *et al.* Interobserver variability in the histological diagnosis of colorectal polyps. *Rev bras. colo-proctol.*(2007). vol.27 no.1. doi: 10.1590/S0101-98802007000100001.

Chen S. Tan, Laura C. Ellis, Christian Wüthrich, *et al.* JC Virus Latency in the Brain and Extraneural Organs of Patients with and without Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *J Virol.* (2010); 84(18): 9200–9209. doi: 10.1128/JVI.00609-10

Coelho, T.R., Almeida L. & Lazo P.A. JC virus in the pathogenesis of colorectal cancer, an etiological agent or another component in a multistep process? *Virology Journal*. (2010); 7:42.

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.

Costantini M, Sciallero S, Giannini A, *et al.* Interobserver agreement in the histologic diagnosis of colorectal polyps: the experience of the multicenter adenoma colorectal study (SMAC). *Journal of Clinical Epidemiology* (2003); 56:209-14

Darbinyan A, *et al.* Role of JC Virus Agnoprotein in DNA Repair. *J Virol.* (2004); August; 78(16): 8593–8600. doi: 10.1128/JVI.78.16.8593-8600.2004.

Enam S, Del Valle L, Lara C, Gan D, *et al.* Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin. *Cancer Res.* (2002); 2:7093–7101.

Faias S., Correia J.D., Chaves P. & Leitão C.N. Pólipos do cólon e recto. Diagnóstico e vigilância. 144 Cadernos de formação em gastroenterologia. (2004); GE Vol. 11.

Fenoglio L, Preiser CM, Noffsinger AE. *Gastrointestinal Pathology An Atlas and Text.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. (1999); 909-1068.

Fenoglio L, Elisabetta Castagna, Alberto Comino, Cora Luchino, *et al.* A shift from distal to proximal neoplasia in the colon: a decade of polyps and CRC in Italy. *BMC Gastroenterol.* (2010); 10: 139. doi: 10.1186/1471-230X-10-139.

Ferlay J, Autier P, Boniol M. Estimate the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* (2007);18:581–92. doi: 10.1093/annonc/mdl498.

Field A M, Sylvia D, Gardner S D, *et al.* Identity of a newly isolated human polyomavirus from a patient with progressive multifocal leucoencephalopathy. *J. clin. Path.*(1974); 27, 341-347.

Figueiredo I N, Figueiredo P N, Stadler G, Ghattas O, Araújo A. Variational Image Segmentation for Endoscopic Human Colonic Aberrant Crypt Foci. *IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING*, (2010); VOL. 29, NO. 4, APRIL.

Fonseca A & Fonseca F. A Importância da Investigação Laboratorial do Vírus JC (Vírus Polyoma) e sua Interpretação Clínica. *Laboratório de Análises Clínicas da FMABC NewsLab - edição 78 – 2006.*

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* (1971);1(7712):1253-7.

Ghazizadeh S, Lessan-Pezeshki M, Nahayati MA. Human papilloma virus infection in female kidney transplant recipients. Saudi J Kidney Dis Transpl. (2011);22(3):433-6.

Gordon J and Khalili K. The human polyomavirus, JCV, and neurological diseases (review). Int J Mol Med. (1998 );1(4):647-55.

Gosert R, Kardas P, Major E. O, Hirsch H. H. Rearranged JC Virus Noncoding Control Regions Found in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Patient Samples Increase Virus Early Gene Expression and Replication J Virol. (2010); 84(20): 10448–10456. doi: 10.1128/JVI.00614-10.

Guarner F. (2006). Enteric flora in health and disease. Digestion;73 Suppl 1:5 – 12.

Guerra M R, Gallo C, Azevedo G, Mendonça S. The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. Revista Brasileira de Cancerologia; (2005); 51(3): 227-234.

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.

Hanahan D & Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. (2000) ;100:57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

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.

Hurlstone DP & Cross SS. Role of aberrant crypt foci detected using high-magnification-chromoscopy colonoscopy in human colorectal carcinogenesis. J Gastroenterol Hepatol. (2005);20(2):173-81.

Ichii, S, Horii, A, Nakatsuru, S, *et al.* Inactivation of both APC alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). Human Molecular Genetics(1992); 1:387-390.

Katalinic D, Plestina S. Cancer epidemic in Europe and Croatia: current and future perspectives. J Public Health. (2010); 18:575-582 DOI 10.1007/s10389-010-0347-5.

Khalili K, Gordon J, White M K. The polyomavirus, JCV and its involvement in human disease. *Advances in experimental medicine and biology*. (2006); 577, 274-287. Springer.

Khare S, Chaudhary K, Bissonnette M. (2008). Aberrant Crypt Foci in Colon Cancer Epidemiology Series: Methods in Molecular Biology. *Cancer Epidemiology: Modifiable Factors*. Volume: 472 Page Range: 373-386 DOI: 10.1007/978-1-60327-492-0\_17.

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.

Knowles W A, Pipkin P, N Andrews, *et al.* Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *Med Virol*. (2003); 71 : 115 - 123.

Lam G. E & Saez D.M. Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Nervous System Manifestations. *Rev. Fac. Med. Odontol. - Univ. Antofagasta*. (2007); 4(1): 4 – 14.

Lane N, Kaplan H, Pascal RR. Minute adenomatous and hyperplastic polyps of the colon: Divergent patterns of epithelial growth with specific associated mesenchymal changes. Contrasting roles in the pathogenesis of carcinoma. *Gastroenterology*. (1971); 60:537-51

Lang TU, Khalbuss WE, Monaco SE, *et al.* Review of HIV-Related Cytopathology. *Patholog Res Int*.(2011) 7;2011:256083.

Liu CK, Wei G, Atwood WJ. Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal alpha (2–6)-linked sialic acids. *J Virol*. (1998); 72, 4643-4649.

McCann, S. & Wise E. (2008). *Anatomy Coloring Book*.

McLellan EA, Medline A, Bird RP. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Res*. (1991);51:5270-4.

Merabova N. et al. Agnoprotein JC Virus Inhibits In Vitro Differentiation of oligodendrocytes and promotes apoptosis. *Journal of Virology*. (2008); p. 1558-1569, vol. 82, No. 3.

Metcalfe DH, Matharu M. Student's perception of good and bad teaching: report of a critical incident study. *Medical Education (ASME Journal)*. (1995); 29(3): 193-197.

Minamoto T, Yamashita, N, Ochiai A, *et al.* Mutant K-ras in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. Its potential as a biomarker of colorectal tumorigenesis. *Cancer* (1995); 75:1520-1526.

Morin, P.J., Vogelstein, B, Kinzler, K.W. (1996). Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:7950-7954.

Norlida AO & Phang KS Histomorphology of aberrant crypt foci in colorectal carcinoma. Department of Pathology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Malaysia Sarawak, Kuching. *Malays J Pathol*. (2010); 32(2):111-6.

Ogata D C, Greca F H, Luz MA, Ioshii SO, Tomasich FDS. Aberrant crypt foci and cancer of the colorectal junction: the correlation between  $\beta$ -catenin/Ki-67 expression and the occurrence of early microscopic secondary lesions surrounding periphery colorectal cancer. (2010). *Rev. Col. Bras. Cir.* vol.37 no.2 Rio de Janeiro doi: 10.1590/S0100-69912010000200008.

Ohishi W, Fujiwara S, Cologne JB, *et al.* Impact of radiation and hepatitis virus infection on risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. (2011);53(4):1237-45. doi: 10.1002/hep.24207.

Padgett B L & Walker D L., ZuRhein G.M. Eckroade R.J. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. (1971); *Lancet* i: 1257–1260.

Padgett B L & Walker DL. "Prevalência de anticorpos no soro humano contra o vírus JC, um isolado de um caso de leucoencefalopatia multifocal progressiva". *J. Infect. Dis.* (1973) 127 (4): 467-470. PMID 4571704 .

Parker S, RU (2007). *Anatomia e fisiologia do corpo humano*. Edição em português. Capítulo 10: Aparelho digestivo.

Pavesi, A. "Utility of JC polyomavirus in tracing the pattern of human migrations dating to prehistoric times J. Gen. Virol. (2005); 86 (5): 1315-1326. Doi:10.1099/vir.0.80650-0. PMID 15831942.

Penney J. B & Narayan O. Studies of the Antigenic Relationships of the New Human Papovaviruses by Electron Microscopy Agglutination. INFECTION AND IMMUNITY. (1973); p. 299-300. Vol. 8. No. 2.

Petersen G.M., Brensinger J.D., Johnson K.A. & Giardiello F.M. Genetic testing and counseling for hereditary forms of colorectal cancer. Cancer. (1999); 86 (11 Suppl.): 2540-50.

Pinho MSL. Biologia Molecular do Câncer Colorretal: Uma Revolução Silenciosa em Andamento. Rev bras Coloproct, (2008);28(3): 353-368.

Powell, SM, Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, TM, Hamilton, SR, Thibodeau, SN, Vogelstein, B. e Kinzler, KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature (Londres). (1992). 359:235-237.

Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. Cancer Res. (1991);51:1564-7.

Sabath B. F. & Major E.O. (2002). Traffic of JC Virus from Sites of Initial Infection to the Brain: The Path to Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. The Journal of Infectious Diseases;186(Suppl 2):S180-6.

Safak M & Khalili K. An overview: Human polyomavirus JC virus and its associated disorders. J Neurovirol. (2003); 9 Suppl 1:3-9.

Seeley, R., Stephens, T. "Anatomia & Fisiologia". Sexta Edição. Lusociência. 2003.

Shen H, Yuan Y, Han-Guang H, *et al.* Clinical significance of K-ras and BRAF mutations in Chinese colorectal cancer patients. World J Gastroenterol. (2011). 17(6): 809-816 doi: 10.3748/wjg.v17.i6.809.

Siu IM, Pretlow TG, Amini SB, Pretlow TP. Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. Am J Pathol (1997); 150(5):1805-13.

Smith A J, Stern H S, Penner M, et al. Somatic APC and K-ras Codon 12 Mutations in Aberrant Crypt Foci from Human Colons. Cancer Res (1994);54:5527-5530.

Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, *et al.* Aberrant Crypt Foci of the Colon as Precursors of Adenoma and Cancer. *N Engl J Med* (1998); 339:1277-1284

Walker B L, Rhein DL, Zurhein GM, *et al.* "Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy". (1971); 1 (7712): 1257–60. PMID 4104715

Weimberg RA e Hanahan DS in: *Molecular Oncology*, Scientific American Inc. (1996); New York, pg 187.

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

Winawer SJ. Natural history of colorectal cancer. *Am J Med*; (1999);106:3S–6S. doi: 10.1016/S0002-9343(98)00338-6.

World Health Organization. WHO Statistical Information System. 2011 Feb; Fact sheet N°297.

Yuan P, Sun MH, Zhang JS, *et al.* APC and K-ras gene mutation in aberrant crypt foci of human colon. *World J Gastroenterol*. (2001);(3):352-6. Department of Pathology, Medical College of Fudan University, Shanghai 200032, China.

## **VII - Anexos**

## Anexo I

### ESTIMATIVA DO RISCO DE PRESENÇA DE SEQUÊNCIAS DE DNA DO POLIOMAVÍRUS JC EM CRIPTAS ABERRANTES DE MUCOSA COLORECTAL HUMANA

Tese de mestrado de Liliana Almeida Curado

Instituições envolvidas: Área de Terapêutica Geral (Responsável: Prof. Doutor Luís de Almeida), Faculdade de Medicina de Coimbra e IBILI, Serviços de Gastrenterologia (Responsável: Prof. Doutor Pedro Figueiredo; Director: Prof. Doutor Carlos Sofia) e de Anatomia Patológica (Directora: Dra Fernanda Xavier da Cunha), Hospitais da Universidade de Coimbra

#### INTRODUÇÃO

A taxa de mortalidade por cancro colorectal atinge, no panorama europeu, um valor cimeiro em Portugal.

A mucosa colorectal normal é encriptada. Quando as células da cripta se hipertrofiam e sofrem deformação, a cripta devém aberrante.

A sequência de adenomas, desde graus de menor até maior displasia, até cancro colorectal é muito aceite, na maioria dos casos. Mas, esta sequência, começaria por uma lesão prévia à de adenoma, a de criptas aberrantes, senão mesmo antes.

O poliomavírus humano JC (JCV) infecta as células humanas, de maneira lítica ou abortiva. Esta última infecção também atinge a mucosa colorectal. Na maioria das populações, desde os 15 anos de idade, cerca de 80% dos indivíduos denotam uma infecção da mucosa colorectal. Vários autores imputam um papel desta infecção no desenvolvimento de cancro colorectal. Esta interligação baseia-se em dados epidemiológicos, de biologia molecular e de mecanismos patológicos. Um destes dados consiste na presença de sequências de DNA viral em diversos tipos de tumores neuroniais e não neuroniais.

O nosso grupo de investigação demonstrou que em quarenta pólipos coloreticais, de diferentes graus de displasia e em amostras de carcinoma coloretal, jamais as sequências de DNA viral deixaram de existir. Este dado é muito relevante, porque a estimativa grosseira do risco de haver sequências do DNA viral em pólipos e em cancro coloretal é significativamente superior à presença das mesmas na mucosa coloretal justa-lesional ou afastada da lesão ou ainda em urina dos mesmos doentes ou de mucosa coloretal ou em urina de grupo-controlo.

Há assim um trofismo de DNA viral pelas lesões adenomatosas ou carcinomatosas do cólon e recto. Tanto pode haver o envolvimento do vírus no desenvolvimento de lesões pré ou mesmo cancerosas, quanto pode haver trofismo por estas lesões, sem o fomento destas, como ainda pode haver uma coincidência da presença viral e das lesões.

Qualquer que seja o papel viral, é muito relevante que se determine a presença de DNA viral nas criptas aberrantes de mucosa coloretal humana. As criptas podem ser identificadas e delimitadas por coloração por indigo-carmim, o qual tem a vantagem de ser um corante extracelular.

## OBJECTIVO

Determinação da estimativa do risco de sequências de DNA do poliomavírus JC estar presente em criptas aberrantes de mucosa coloretal humana.

## MATERIAL E MÉTODOS

Em oito pacientes submetidos a colonoscopia de rotina, são colhidas criptas aberrantes e, caso existam, lesões adenomatosas. Na imediação de ambas as lesões e em mucosa afastada destas, sempre em criptas normais, são colhidas amostras, bem como urina.

Num outro grupo, o controlo, pelo menos quatro pacientes não denotam a existência de qualquer cripta aberrante, lesão adenomatosa ou carcinomatosa. A colheita deve incidir na urina e em criptas normais.

A identificação das criptas aberrantes é realizada por coloração por spray de indigo-carmim.

Qualquer das amostras é imersa em RNA-later.

A presença de sequências de DNA viral é determinada por Nested-PCR e a estimativa do risco é alcançada por frequências absolutas e relativas, com a razão dos produtos cruzados e os respectivos intervalos de confiança.

## CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

São excluídos do presente estudo:

- Grávidas
- Menores
- Doentes com história pessoal ou familiar de polipose adenomatosa
- Doentes com história pessoal ou familiar de qualquer outro síndrome de polipose gastrointestinal hereditária
- Doentes com síndrome de Lynch
- Pacientes com doença inflamatória intestinal
- Recessão intestinal prévia
- História pessoal de neoplasia com submissão a quimioterapia ou a radioterapia
- Diátese hemorrágica
- Doença grave, cardíaca, renal ou hepática
- Consumo recente de anti-inflamatórios não esteróides, cálcio, selénio, folatos, hormonoterapia de substituição ou ácido urseodesoxicólico

## Anexo II

### DOENTES ABRANGIDOS NA INVESTIGAÇÃO

#### GRUPO DE ESTUDO

Número: 24

As mulheres grávidas são excluídas? Sim  Não

**Recrutamento dos doentes:** Os indivíduos, a incluir no grupo de estudo, serão seleccionados com base na história clínica de neoplasia colo-rectal e/ou de lesões precursoras e exclusivamente com indicação para a realização de colonoscopia e, no decurso desta, biopsia (diagnóstica ou terapêutica) ou de cirurgia colo-rectal (ressecção tumoral e/ou de lesões precursoras).\*

Após a colheita biopsia ou cirúrgica, o anato-patologista poderá disponibilizar fragmentos, para o presente estudo, desde que não haja qualquer prejuízo para o seu trabalho habitual.

#### GRUPO-CONTROLO

Número: 15

**Seleção dos indivíduos-controlo:** Os indivíduos, a incluir no grupo-controlo, serão seleccionados com base na sua história clínica de estrita indicação para a realização de colonoscopia e biópsia diagnóstica ou de cirurgia de lesões colo-rectais não oncológicas e/ou não precursoras destas, umas e outras utilizáveis como controlo.\*

Além destas lesões, fragmentos de mucosa colo-rectal normal, adjacente às lesões, quer de natureza oncológica ou precursora, quer de natureza não oncológica, poderão ser disponibilizados pelo anato-patologista, servindo também como controlo. Após a colheita biópsica ou cirúrgica, o anato-patologista poderá disponibilizar fragmentos, para o presente estudo, desde que não haja qualquer prejuízo para o seu trabalho habitual.

## Anexo III

### CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

#### 1. Critérios de Inclusão no Protocolo de Estudo

##### 1.1. Critérios Gerais de Inclusão

Os critérios de inclusão serão os seguintes:

- 1 - Pacientes com indicação clínica para realização de colonoscopia electiva, seja em doentes sintomáticos, seja em indivíduos assintomáticos, no âmbito do rastreio do cancro colo-rectal;
- 2 – Pacientes com indicação clínica para colheita de biópsias endoscópicas colo-rectais;
- 3 – Pacientes com indicação de cirurgia colo-rectal.

Ou

- 3 – Peças provenientes de cirurgia colo-rectal.

##### 1.2. Critérios Gerais de Exclusão

Os critérios de exclusão serão os seguintes:

- 1 – Idade inferior a 18 anos;
- 2 – Gravidez;
- 3 - Distúrbios de coagulação;
- 4 - Imuno-depressão (ex.: diabetes melitus, insuficiência renal, HIV, radioterapia, corticoterapia, outros imuno-supressores). Nestes casos poderão ser indicados alguns exames para avaliar o doente antes de realizar o exame. Ex.: a contagem de linfócitos T CD4+ deve ser superior a 200/mm<sup>3</sup>, ou quando abaixo desse número, os leucócitos devem ser superiores a 3.000/mm<sup>3</sup>; 10 as plaquetas devem estar acima de 50.000/mm<sup>3</sup>; a hemoglobina superior a 10 g/dl e o tempo de protrombina maior que 60%;
- 5 - Mau estado geral;
- 6 – Não concordância com os termos do Consentimento Informado;
- 7 - Síndromes hereditários: Polipose Adenomatosa Familiar e Síndrome de

Lynch;

8 – Indicação para realização urgente de colonoscopia (ex.:quadro oclusivo, hemorragia digestiva com repercussão hemodinâmica);

9 – Ausência de indicação clínica para colheita de biópsias endoscópicas colo-rectais.

## **Anexo IV**

### **INTRODUÇÃO AO CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

**Projecto de Investigação:** -Associação do poliomavírus neurotrópico humano JC com o desenvolvimento de cancro colo-rectal e avaliação de factores modificadores do risco na carcinogénese mediada pelo vírus na população portuguesa

**Investigador Principal:** Tatiana Andrea Rasteiro Coelho, Mestre em Biologia Celular e Bolseira da Fundação para a Ciência e a Tecnologia

#### **Para doentes a serem submetidos a colonoscopia e biópsia de diagnostico/terapêutica**

- 1 - A decisão é sua: é livre de optar entre fazer ou não parte deste estudo. Para participar, terá de concordar, assinando o consentimento livre esclarecido.**
- 2 - Se consentir e se for colhida biópsia de mucosa do cólon ou recto, durante a sua colonoscopia, fragmentos da biópsia serão destinados a este projecto de investigação.**
- 3 - Não corre mais riscos, causados pelo estudo, do que aqueles que podem decorrer do exame.**
- 4 - Com o seu contributo e o dos outros participantes, espera-se melhorar a compreensão do seu estado clínico e do respectivo tratamento.**
- 5 - Não incorrerá em quaisquer despesas-extra.**
- 6 - Não está disponível qualquer tipo de pagamento para os participantes neste estudo.**
- 7 - Poderá decidir não começar ou interromper a sua participação neste estudo em qualquer altura.**
- 8 - Todos os seus dados pessoais somente serão conhecidos pela equipa médica.**
- 9 - Se tiver qualquer dúvida, leia todo o formulário ou pergunte ao médico que lhe fará o exame.**

## **Anexo V**

### **FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

*(De acordo com a versão oficial de 2004 da Declaração de Helsínquia sobre os Princípios Éticos de Investigação Médica Em Humanos e com a Convenção para a Protecção dos Direitos do Homem e da Dignidade do Ser Humano face às Aplicações da Biologia e da Medicina ratificada pela Resolução da Assembleia da República n.º1/2001, de 3 de Janeiro)*

**Projecto de Investigação:** -Associação do poliomavírus neurotrópico humano JC com o desenvolvimento de cancro colo-rectal e avaliação de factores modificadores do risco na carcinogénese mediada pelo JC na população portuguesa

**Investigador Principal:** Tatiana Andrea Rasteiro Coelho, Mestre em Biologia Celular e Bolsista da Fundação para a Ciência e a Tecnologia

#### **Para doentes com patologia colo-rectal a serem submetidos a colonoscopia e biópsia de diagnóstico/terapêutica**

### **I. INTRODUÇÃO**

Está a ser convidado(a) para fazer parte de um estudo de investigação. Antes de decidir fazer parte deste estudo, é necessário que compreenda os riscos e os benefícios envolvidos. Este formulário de consentimento fornece informações sobre o estudo de investigação. Um membro do grupo de investigação, envolvido neste estudo, estará sempre ao seu dispor para responder às suas perguntas e fornecer explicações adicionais sempre que as solicitar. Se concordar em fazer parte deste estudo de investigação, ser-lhe-á pedido que assine este formulário de consentimento. Este processo é conhecido por consentimento livre esclarecido ou com conhecimento de causa. A decisão é sua, sendo livre de optar entre fazer ou não parte deste estudo.

### **II. OBJECTIVOS**

Este projecto de investigação tem como principais objectivos: o estabelecimento de uma correlação entre a infecção por poliomavírus neurotrópico humano (JCV) e o desenvolvimento de cancro colo-rectal na população Portuguesa; a avaliação dos respectivos factores modificadores do risco e seu valor como factor de prognóstico; e a identificação dos mecanismos da carcinogénese colo-rectal potencialmente mediada pelo vírus. Uma vez comprovada aquela associação,

será possível identificar os indivíduos de risco para o desenvolvimento de cancro colo-rectal, ajustar a vigilância clínica para um diagnóstico precoce e identificar, a longo prazo, possíveis alvos terapêuticos, quer virais, quer da célula hospedeira, com o intuito de controlar a patogenicidade do JCV.

Para avaliar a frequência da infecção pelo vírus JC na população Portuguesa, e como critério de comparação, é necessário estudar mucosa colo-rectal sem qualquer doença cancerosa.

Tanto a mucosa colo-rectal com doença tumoral ou com doença precursora como a mucosa colo-rectal com outra doença não tumoral ou normal, neste caso adjacente a mucosa doente, são imprescindíveis ao presente estudo. Pelo que fragmentos das amostras que poderão ser colhidas da sua mucosa colo-rectal, serão destinados a este projecto de investigação, desde que o consinta por escrito.

### **III. PROCEDIMENTOS**

Ao concordar em participar, permite que, durante a realização da sua colonoscopia de diagnóstico ou de tratamento, se forem colhidas biópsias de mucosa do cólon, alguns fragmentos destas podem ser utilizados, no âmbito deste projecto, para estudos moleculares. A realização deste estudo não altera em nada o seu protocolo de tratamento e vigilância.

### **IV. POSSÍVEIS RISCOS**

Os riscos associados às colheitas de mucosa colo-rectal, por biópsia colonoscópica, são os mesmos associados às colheitas do material para diagnóstico ou tratamento da sua patologia, porque derivam dessas colheitas, sem que haja qualquer colheita adicional.

### **V. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS**

Com a sua participação neste estudo não existirá um benefício imediato para si, quer financeiro quer de qualquer outra natureza. No entanto, espera-se que o resultado deste projecto de investigação conduza à identificação de indivíduos de risco para o desenvolvimento de cancro colo-rectal. Se for o seu caso, poderá beneficiar de uma adequada estratégia de vigilância e diagnóstico precoce. Mais se espera, com o seu contributo pessoal, melhorar o entendimento da carcinogénese colo-rectal, mediada pelo vírus JC, e o respectivo tratamento.

### **VI. CONSENTIMENTO PARA UTILIZAÇÃO E ELIMINAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Através da assinatura deste formulário de consentimento, autoriza a utilização das suas amostras de mucosa colo-rectal, colhidas por biópsia colonoscópica, para este estudo de investigação. Simultaneamente, consente na eliminação, após manipulação, de qualquer tecido restante ou que não seja adequado ao estudo.

## VII. CUSTOS

Não incorrerá em quaisquer despesas com a colheita das amostras, análises, testes e avaliações exigidas por este protocolo.

## VIII. COMPENSAÇÕES

Não está disponível qualquer tipo de compensação financeira (nenhum tipo de pagamento) ou afim, para os participantes neste estudo.

## IX. DIREITO A DESISTIR DO ESTUDO

A sua participação neste estudo de investigação é voluntária. Poderá decidir não começar ou cessar a sua participação neste estudo em qualquer altura que pretenda. Os cuidados que receber e as relações que estabelecer, com os prestadores de assistência médica dos Hospitais da Universidade de Coimbra, não serão afectados de maneira nenhuma. Ser-lhe-ão comunicadas quaisquer novas informações, sobre o estudo de investigação, que possam fazer com que mude de opinião sobre a sua participação. Deverá notificar um dos elementos do grupo de investigação, caso decida cessar a sua participação antes do tempo previsto.

## XI. CONFIDENCIALIDADE DOS RELATÓRIOS MÉDICOS E DA INVESTIGAÇÃO

Todos os seus dados pessoais e registos médicos, excepto no que se refere à equipa clínica e aos médicos integrantes do grupo de investigação, e todos os resultados do estudo de investigação, excepto no que se refere à equipa clínica e ao grupo de investigação, serão mantidos em sigilo, a menos que sejam exigidos por decisão judicial.

## XII. PERGUNTAS

Se necessitar de algum esclarecimento relacionado com este trabalho de investigação ou se sentir algum efeito secundário ou lesão que possa estar relacionada com a sua participação no estudo, poderá contactar um dos elementos do grupo de investigação:

**Investigador Principal** - Mestre Tatiana Coelho: Telf: 239 480 054; Telm: 916 584 854; E-mail: tatiana.coelho@sapo.pt;

**Investigador Responsável** - Prof. Doutor Luís Almeida: Telf: 239 480 054; Telm: 912 133 241; E-mail: lalmeida@ci.uc.pt;

**Serviço de Gastrenterologia** – Prof. Doutor Pedro Narra de Figueiredo: Telf: \_\_\_\_\_; E-mail: \_\_\_\_\_;

**Serviço de Anatomia Patológica** – Dra. Maria Augusta Cipriano: Telf: \_\_\_\_\_; E-mail: \_\_\_\_\_.

A equipa de investigadores será responsável pelo esclarecimento de qualquer dúvida., antes e após a colheita.

### **XIII. ASSINATURAS**

Através da assinatura deste formulário de consentimento livre esclarecido, afirma que leu o seu conteúdo, que os objectivos e procedimentos deste estudo lhe foram explicados e que todas as suas perguntas foram devida e claramente respondidas. Não estará a abdicar de nenhum dos seus direitos legais, ao assinar este formulário. Adicionalmente, afirma também que todas as informações prestadas por si, acerca dos antecedentes clínicos, são verdadeiras. Caso solicite, ser-lhe-á fornecida uma cópia deste consentimento.

Eu, \_\_\_\_\_,  
portador(a) do B.I. n.º \_\_\_\_\_, emitido em \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ pelo  
Arquivo de Identificação de \_\_\_\_\_, e abaixo assinado(a), \_\_\_\_\_ li \_\_\_\_\_ e compreendi tudo  
o que consta neste formulário e esclareci todas as minhas dúvidas acerca da minha  
participação neste projecto de investigação, pelo que:

1 - Concordo em participar neste estudo, através da colheita de amostras adicionais da minha mucosa colo-rectal, aquando da realização da biópsia para diagnóstico da minha patologia:

sim ( )

não ( )

2 – Visto que respondi sim, também concordo com o estudo e posterior divulgação científica dos dados obtidos a partir da(s) minha(s) amostra(s):

sim ( )

não ( )

3 - Concordo com a posterior divulgação científica das imagens obtidas a partir da(s) minha(s) amostra(s):

sim ( )

não ( )

4 – Pretendo tomar conhecimento dos resultados referidos nas duas alíneas anteriores:

sim ( )

não ( )

Coimbra, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_

O participante

Coimbra, \_\_\_\_\_ de 200\_\_ O seu  
representante autorizado

Relação com o participante:

Se o participante puder compreender o conteúdo mas não puder, por alguma razão, ler (ex: cegueira, etc.) ou não puder assinar (ex: incapacidade motora, etc.) o formulário de consentimento livre esclarecido, será necessária a presença de uma testemunha não relacionada com o estudo.

Coimbra, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_

A testemunha

Coimbra, \_\_\_\_\_ de 200\_\_

Nome e Assinatura dos Investigadores

## Anexo VI

### FORMULÁRIO DE RECOLHA DE DADOS DO DOENTE

#### PROJECTO POLIOMAVÍRUS

**Projecto de Investigação:** -Associação do poliomavírus neurotrópico humano JC como desenvolvimento de cancro colorectal e avaliação de factores modificadores do risco na carcinogénese mediada pelo JC na população portuguesa

Etiqueta do doente

**HOSPITAL:** \_\_\_\_\_

**SERVIÇO:** \_\_\_\_\_

**N.º REGISTO/ENTRADA:** \_\_\_\_\_

**DATA:** \_\_\_\_\_

**GRUPO:** \_\_\_\_\_

DADOS PESSOAIS			
<b>APELIDO</b>		<b>SEXO:</b>	<b>M</b>
<b>NOME</b>			<b>F</b>
<b>DATA DE NASCIMENTO</b>	__/__/__		
<b>ORIGEM GEOGRÁFICA:</b>		<b>CONCELHO</b>	
		<b>DISTRITO</b>	
<b>MORADA ACTUAL</b>			
<b>CÓDIGO POSTAL</b>	____-____	<b>LOCALIDADE</b>	

<b>AGREGADO FAMILIAR</b>	___pess.	<b>ESCOLARIDADE</b>		
		<b>PROFISSÃO</b>		
<b>HÁBITOS TABÁGICOS</b>	N			
	S	<b>CONSUMO DIÁRIO:</b>	<b>MENOS DE 1 MAÇO</b>	
			<b>1-2 MAÇOS</b>	
			<b>MAIS DE 2 MAÇOS</b>	
<b>HÁBITOS ALCOÓLICOS</b>	N			
	S			
<b>DADOS CLÍNICOS</b>				
<b>N.º PROCESSO CLÍNICO</b>		<b>DATA DE ENTRADA</b>	___/___/___	
<b>MÉDICO ASSISTENTE</b>		<b>N.º MECANOGRÁFICO</b>		
<b>SERVIÇO</b>				
<b>DIAGNÓSTICO CLÍNICO</b>				
<b>IDADE AQUANDO DO DIAGNÓSTICO</b>		<b>NOTAS</b>		
<b>TIPO DE INTERVENÇÃO:</b>	<b>BIÓPSIA DIAGNÓSTICA</b>			
	<b>BIÓPSIA TERAPÊUTICA</b>			
	<b>CIRURGIA DE RESSECÇÃO TUMORAL</b>			
	<b>COLECTOMIA</b>			
	<b>OUTRA</b>	<b>QUAL:</b>		
<b>HISTÓRIA CLÍNICA ANTERIOR</b>				

<b>DADOS DA COLHEITA</b>			
<b>DATA DA COLHEITA</b>	__/__/	<b>HORA DA COLHEITA</b>	__:__
<b>MÉDICO (S) ENDOSCOPISTAS</b>			
<b>SERVIÇO</b>	GASTRENTEROLOGIA		
<b>TIPO DE MATERIAL BIOLÓGICO:</b>	<b>SANGUE PERIFÉRICO</b>		
	<b>URINA</b>		
	<b>ESFREGAÇO BUCAL</b>		
	<b>TECIDO FRESCO</b>		
	<b>TECIDO PARAFINADO</b>		
	<b>TECIDO CONGELADO</b>		
	<b>OUTRO</b>		<b>QUAL:</b>
<b>N.º DE AMOSTRAS COLHIDAS</b>	<b>DESIGNAÇÃO</b>	<b>A –</b>	
		<b>B –</b>	
		<b>C –</b>	
<b>DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS</b>	<b>A1 -</b>		
	<b>A2 -</b>		
	<b>B1 –</b>		

	<b>B2 –</b>
	<b>C1 –</b>
	<b>C2 –</b>
<p align="center"><b>DESIGNAÇÃO CORRESPONDENTE DA AMOSTRA ENVIADA À ANATOMIA-PATOLÓGICA</b></p>	
<p align="center"><b>DIAGNÓSTICO ANATOMO- PATOLÓGICO</b></p>	

## Anexo VII

### Phenol/Chloroform Total DNA Extraction Protocol

#### Required Materials:

Razor blade or scissors	55°C incubator
Nuclease-free 2.0 ml tubes	Nuclease-free water
1 M Tris, pH 8.0	Buffer saturated phenol
0.5 M EDTA	Chloroform
10% SDS	3 M Sodium acetate, pH 5.2
Proteinase K	95% Ethanol

#### Protocol:

1. Prepare digestion buffer:

60 mM Tris, pH 8.0

100 mM EDTA

0.5% SDS

2. Remove tissue from RNA*later* and mince well. Cutting the tissue into very small pieces is absolutely essential to achieving adequate digestion. Place in a 2.0 ml eppendorf tube with 1.5 ml digestion buffer.

3. Add Proteinase K to a final concentration of 500 µg/ml. Mix by inversion. Incubate the sample at 55°C for approximately 4 hours with rotation. A standard hybridization oven and bottle can be used for the digestion. Simply tape the tubes to the bottle allowing enough room for clearance and set the oven temperature to 55°C. Samples should be allowed to digest until little or no cellular matter is visible.

4. Remove the tubes from the oven and divide each sample into 2 even aliquots (approximately 750  $\mu$ l each). Add 750  $\mu$ l 50:50 phenol:chloroform and invert rapidly (do not vortex) for 2 minutes in an eppendorf rack. Spin samples on high in a microcentrifuge for 10 minutes at room temperature. Remove aqueous (upper) phase to a new 2 ml tube using a 1 ml pipet tip with the end cut off. The wide bore will prevent shearing of the DNA. Be careful not to disturb the interface (it may be gooey). Repeat phenol:chloroform extraction 2 more times. If interface is still dirty, additional extractions are recommended.

5. Extract the sample once with chloroform. Remove aqueous (upper) phase to a fresh 2 ml tube and measure volume. Add 1/10 volume 3M sodium acetate, pH 5.2, and 1 volume 95% ethanol at room temperature. Mix by inversion. DNA should spool. Remove DNA with a pipet tip to a fresh tube. Wash DNA in 70% ethanol by inversion, do not vortex. After washing for 5 minutes, pull off 70% ethanol and let pellet air dry on bench overnight.

6. Add an appropriate volume TE, pH 7.4, to each pellet. For approximately 100 mg original tissue, pellet can be resuspended in 100 to 200  $\mu$ l TE. Let sit in refrigerator overnight to resuspend. Alternatively, pellet and TE can be GENTLY shaken at room temperature for a few hours (for example on a rocking platform). Time for resuspension is dependent on the pellet size. DNA SHOULD NOT BE RESUSPENDED BY PIPET OR VORTEX, AS IT WILL SHEAR!!!

7. DNA can be quantitated by spectrophotometry. Read a 1/20 dilution of the sample in TE at  $A_{260}$  and  $A_{280}$ . Remember to use TE as a blank to zero the spectrophotometer. Use the following equation to calculate  $\mu$ g/ml DNA:

$$A_{260} \times \text{dilution factor} \times 50 = \mu\text{g/ml}$$

