

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

ASSOCIAÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO COM O
CARCINOMA COLORRETAL

Dissertação de Mestrado

Márcio Brahm Caetano

Orientador: Prof. Dr. Daniel de Carvalho Damin

Porto Alegre, 2005

Agradecimentos

Este estudo foi realizado graças à participação de muitas pessoas.

Agradeço:

Ao amigo e extraordinário orientador Prof. Dr. Daniel de Carvalho Damin pela fundamental presença em todos os momentos e etapas do trabalho. Pelo seu exemplo de inquietude e entusiasmo frente à pesquisa e à vida.

À Dra. Andréa Damin, pela disposição, experiência e participação essencial no trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, coordenado pelo Prof. Dr. Cláudio Alexandre.

Ao Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em que conheci profissionais muito especiais.

Ao Prof. Dr. Mário Antonello Rosito, pela experiência, pelo exemplo de paixão e dedicação ao trabalho.

Aos Drs. Paulo Contu e Cláudio Tarta pelo estímulo constante e amizade.

Aos colegas de residência médica e amigos Anderson Rech Lazzaron e Paula Mancopes.

Ao curso de Pós Graduação em Cirurgia da UFRGS, pela oportunidade de crescimento pessoal e científico.

Às funcionárias Estela Araripe e Helena Costa, do curso de Pós Graduação em Cirurgia, pela alegria e eficiência.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre que foi parte da minha casa por onze anos.

Às funcionárias do bloco cirúrgico, Adriana da Silva Rosa e Ana Lúcia
A.Gonçalves, exemplos de vida.

Aos pacientes com quem convivi e cresci durante estes anos.

À minha amada esposa Ângela Beatriz John.

Lista de Abreviaturas

ASCO- Sociedade Americana de Oncologia Clinica

CCR- Câncer colorretal

CEA- *carcinoembryonic antigen*

DNA- *Deoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonuclêico

DP- Desvio Padrão

DB- *Dot Blot*

FFFCMPA – Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

HCPA- Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HCS- Sistema de Captura Híbrida

HNPCC – *Hereditary nonpoliposes colorectal câncer*

HPV – Papilomavírus Humano

IARC- *International Agency for Research on Cancer*

INCA- Instituto Nacional do Câncer

ISH- Hibridização *in situ*

LCR - *Long Control Region* – Região Controladora não Codificante

MMR – *Mismatch repair genes*

µm – Micrômetro

PAF- Polipose adenomatosa familiar

PCR – *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

pRB- Proteína do Retinoblastoma

RB- Gene do Retinoblastoma

RNA- *Ribonucleic Acid* – Ácido Ribonuclêico

SPSS- *Statistical Package for the Social Sciences for Windows*

SB- *Southern Blot*

TP53 - *Tumor Protein 53* – Proteína Tumoral 53

TNM- *Tumor, Node and Metastasis*

URR- *Upstream Regulatory Region*- Região Controladora Não Codificante

Sumário

1. RESUMO	10
2. ABSTRACT	11
3. INTRODUÇÃO	12
4. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. CÂNCER DE CÓLON E RETO	14
2.1.1. Epidemiologia	14
2.1.2. Patogênese	15
2.2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO	18
2.2.1. Estrutura e classificação viral	18
2.2.2. Métodos de detecção do HPV	21
2.2.3. Papel oncogênico do HPV	24
2.2.4. HPV e câncer colorretal	30
5. JUSTIFICATIVA	33
6. OBJETIVOS	34
3.1. OBJETIVO GERAL	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
7. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. DELINEAMENTO DA PESQUISA	35
4.2. POPULAÇÃO ESTUDADA	35
4.3. AMOSTRA ESTUDADA	36
4.4. MÉTODOS	37
4.4.1. Avaliação clínico-patológica	37
4.4.2. Coleta das amostras de tecido colorretal	40
4.4.3. Processamento e análise das amostras	41
4.4.4. Análise estatística	44
4.4.5. Ética	45
8. RESULTADOS	45
5.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	45
5.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	46
5.3. DETECÇÃO DO HPV	48

5.4. VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS EM RELAÇÃO AO HPV	51
9. DISCUSSÃO	53
10. CONCLUSÕES	61
7.1. CONCLUSÃO GERAL	61
7.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	61
11. PERSPECTIVAS	62
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Lista de Figuras

FIGURA 1. Fotografia do Genoma do papiloma vírus humano 16, localização e organização dos genes.....	19
FIGURA 2. Representação esquemática da atuação do gene <i>E6</i> do HPV 16/18 sobre o gene <i>p53</i>	26
FIGURA 3. Representação esquemática da atuação do gene <i>E7</i> do HPV16/18 sobre o gene <i>RB</i>	27
FIGURA 4. Seqüenciamento do HPV 16 - primer <i>E6</i>	50

Lista de Quadros

QUADRO 1. Tipos de HPV classificados conforme sua homologia na seqüência de DNA e associação com lesões clínicas	20
--	----

Lista de tabelas

TABELA 1. Classificação TNM dos tumores malignos da cólon e reto	38
TABELA 2. Estadiamento por grupos	39
TABELA 3. Diferenciação histopatológica	39
TABELA 4. Distribuição dos pacientes por idade	46
TABELA 5. Distribuição dos pacientes por sexo	46
TABELA 6. Localização das amostras coletadas	47
TABELA 7. Estadiamento dos tumores (TNM) observados	48
TABELA 8. PCR positivo nas amostras coletadas em pacientes com tumor	49
TABELA 9. Relação entre idade e presença do HPV	51
TABELA 10. Relação entre sexo e presença do HPV	51
TABELA 11. Presença do HPV conforme estadiamento do tumor	52
TABELA 12. Presença do HPV conforme localização do tumor	52

RESUMO

OBJETIVO: Investigar a presença do papiloma vírus humano no adenocarcinoma de cólon e reto. **MÉTODOS:** Setenta e dois pacientes com adenocarcinoma de cólon e reto foram analisados. Foram coletadas duas amostras de cada paciente: uma amostra do tumor e outra de mucosa não neoplásica distante 15 cm do tumor. Como grupo de controle, também foram estudadas amostras de mucosa de quinze pacientes sem câncer colorretal. Os tecidos foram analisados por “auto nested” PCR usando o primer *consensus* GP5+/GP6+. Dois primers específicos para região E6 dos HPV 16 e HPV 18 também foram utilizados. **RESULTADOS:** O DNA do HPV foi detectado em tecidos de cólon e reto de 60 pacientes com câncer (83 por cento), enquanto que este não foi encontrado em nenhum dos pacientes controles sem tumor ($p < 0,001$). Em vinte e três pacientes, o DNA do HPV estava presente tanto no tecido tumoral como na mucosa não neoplásica adjacente. Em vinte e três pacientes o DNA do HPV foi encontrado apenas no tumor, enquanto que em quatorze, só foram encontrados nos tecidos normais coletados próximos ao tumor de cólon e reto. Em setenta e cinco por cento dos casos positivos foram identificados os HPV tipo 16 ou 18 por PCR com primers E6 específicos. Os achados positivos obtidos por PCR foram confirmados por seqüenciamento viral. **CONCLUSÃO:** O HPV está presente no cólon e reto da maioria dos pacientes com carcinoma de cólon e reto estudados, sugerindo que este vírus pode estar relacionado à patogênese do câncer colorretal. Serão necessários mais estudos para determinar o papel do HPV na carcinogênese colorretal.

ABSTRACT

PURPOSE: This study was design to investigate the relationship between human papillomavirus (HPV) infection and colorectal cancer. **METHODS:** Seventy-two patients with primary colorectal carcinoma were included in the study. From each patient two tissue samples were collected: one sample of the tumor and one sample of noncancerous intestinal tissue from an area 15 cm away from the tumor. As a nonmalignant control group, colorectal tissue samples obtained from 15 patients without cancer were also studied. Tissues were analyzed through auto-nested polymerase chain reaction (PCR) using the consensus GP5+/GP6+ primers. Two different specific primer sets targeting E6 region of the HPVs 16 and 18 were used for typing. Direct DNA sequence analysis was conducted to confirm positive PCR results. **RESULTS:** HPV DNA was detected in colorectal tissues of 60 patients with cancer (83 percent), but in none of the colorectal tissues obtained from controls without cancer ($p < 0.001$). Twenty-three patients contained HPV DNA in both tumor and noncancerous colorectal tissue, 23 had HPV only in the tumor, and 14 had HPV only in the noncancerous tissue sample. Seventy-five percent of the positive cases had either HPV16 or HPV18 identified by PCR with specific primers E6. Positive PCR results were confirmed by the amplified viral sequences. **CONCLUSION:** HPV is present in the colon and rectum of most patients with colorectal carcinoma, suggesting that this virus may be related to the pathogenesis of colorectal cancer. Further studies to determine the ultimate role of HPV in colorectal carcinogenesis are warranted.

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é um dos tumores malignos mais prevalentes no mundo, com mais de um milhão de novos casos diagnosticados anualmente.¹ Apesar de vários fatores de risco para a doença já terem sido identificados, como a predisposição genética e o papel de alguns fatores ambientais, os mecanismos moleculares relacionados à carcinogênese colorretal continuam em investigação.^{2,3} Até o momento, a etiologia do chamado câncer colorretal esporádico, que representa 90% dos casos diagnosticados, ainda não está esclarecida. Neste contexto, estudos recentes têm sugerido que alguns tipos de vírus podem estar envolvidos na patogênese do câncer colorretal, especialmente o papiloma vírus humano (HPV).⁴⁻⁸

O HPV é um vírus DNA reconhecidamente envolvido na carcinogênese da cérvix uterina e da região anogenital^{9,10}. Mais de duzentos tipos diferentes de HPV já foram identificados¹¹. Os tipos 16 e 18, considerados como de alto risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino, são classificados como carcinógenos humanos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC).¹² Estudos clínico-laboratoriais sugerem que o efeito oncogênico do HPV seja resultante da integração do material genético viral no DNA da célula hospedeira e expressão das oncoproteínas E6 e E7, que antagonizam as funções de conhecidos

genes supressores tumorais, como o p53 e o pRb. Através destes mecanismos moleculares, o HPV transforma e imortaliza células epiteliais, determinando proliferações não controladas e formação de tumores.^{13,14,15}

Baseado em testes realizados em mais de mil amostras de câncer de colo uterino em pacientes de vinte e dois países (*Biological Study of Cervical Câncer*), verificou-se que o HPV está presente em mais de 99,7% dos carcinomas de colo uterino.¹⁶ Em relação à patogênese de outras neoplasias, como o câncer de mama, de esôfago e de trato respiratório, uma potencial influência do HPV tem sido pesquisada. Os HPVs dos tipos 16 e 18, mais frequentemente associados aos carcinomas anogenitias, também são os mais identificados em outros tipos de câncer.^{17,18,19, 20}

Recentemente, o papel do HPV no câncer de cólon e reto tem sido investigado. Até o momento, os resultados são conflitantes. Enquanto alguns autores têm identificado o DNA do HPV em amostras de câncer colorretal por diferentes técnicas laboratoriais, como a hibridização *in situ* e a reação em cadeia da polimerase (PCR), outros falharam em identificar a presença do vírus, mesmo usando as mesmas técnicas de detecção.^{21,22}

O objetivo principal deste estudo foi avaliar, por uma combinação de técnicas de biologia molecular, a presença do HPV em uma amostra de carcinomas colorretais, assim como em tecidos de cólon e reto obtidos de pacientes operados por patologias não malignas. Os resultados obtidos foram correlacionados com as

características demográficas dos pacientes estudados e com fatores prognósticos conhecidos para o câncer colorretal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER COLORRETAL

2.1.1 Epidemiologia

O carcinoma colorretal é o segundo câncer mais prevalente em todo o mundo, depois do câncer de mama, com cerca de meio milhão de óbitos anuais relacionados. Estima-se que, globalmente, 2,4 milhões de pessoas tenham recebido este diagnóstico nos últimos 5 anos. A taxa de incidência global por 100.000 indivíduos é de 19 para homens e 14 para mulheres.^{23,24}

O risco acumulado de desenvolvimento do câncer colorretal é de 6% ao longo da vida. No ano de 2000, a neoplasia representou 9,4% do total de novos casos de câncer. As mortes causadas por câncer de cólon e reto representam 8% de todos os óbitos que ocorrem por câncer.²³

Estimativas para o ano de 2005 no Brasil apontam o câncer colo-retal como o 4º tumor maligno mais freqüente para ambos os sexos. A maior incidência de casos ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos. Estima-se que no ano de 2000,

20.000 novos casos tenham sido diagnosticados no Brasil. As taxas de incidência são de 13 e 14 por 100.000 em homens e mulheres, respectivamente. No Rio Grande do Sul a incidência anual é muito alta, ocorrendo cerca de 28 novos casos por 100.000 habitantes. A doença representa 5,47% e 7,94%, nos homens e nas mulheres, respectivamente, do total de mortes causadas por câncer.^{23,25}

2.1.2 Patogênese

A patogênese do câncer colorretal é resultado de uma complexa interação de variáveis, incluindo fatores ambientais e fatores hereditários.²⁶

As diferenças entre populações de diversas nações inspirou a hipótese de Denis Burkitt de que uma dieta pobre em resíduos e rica em carboidratos e gorduras representa um fator predisponente para este tipo de câncer. Segundo este autor, a maior incidência da doença é verificada em nações com populações predominantemente urbanas e com padrão dietético ocidental. Entretanto, as evidências epidemiológicas da associação do câncer colorretal com o consumo aumentado de açúcar e gorduras permanecem conflitantes. Da mesma forma, o papel do consumo de fibras na proteção contra o câncer colorretal é ainda controverso.^{23,27}

As influências genéticas são atualmente reconhecidas como fatores independentes de risco para o câncer colorretal. Fearon e Vogelstein sugeriram que o surgimento deste tumor seria o resultado de um acúmulo seqüencial de mutações

genéticas distintas, correspondendo cada uma destas a um estágio histológico diferente na seqüência adenoma- carcinoma. Mutações dos genes APC, K-ras, DCC (*deleted in colorectal cancer*) e p53 ocorreriam cumulativamente, levando à formação da maioria dos carcinomas esporádicos de cólon e reto.^{26,29}

Os chamados carcinomas esporádicos, que representa mais de 90% dos casos diagnosticados, são os adenocarcinomas colorretais não relacionados a síndromes genéticas específicas, a exemplo da polipose adenomatosa familiar (PAF) e da síndrome de Lynch. Mutações pontuais no gene *ras*, amplificação gênica do *c-myc*, deleção de alelos em sítios específicos dos cromossomos 5, 17 e 18 estão envolvidos no processo de desenvolvimento destes tumores. A deleção de alelos está presente em mais de 70 % dos casos, causando alterações na ação de genes supressores tumorais e prejudicando os principais mecanismos de defesa da célula, como a interrupção do ciclo celular e a apoptose.²⁷

Atualmente, há duas síndromes genéticas principais relacionadas ao desenvolvimento do câncer colorretal. A primeira é a PAF, que contribui para 1 a 3% dos casos de neoplasias malignas do cólon e reto. Esta é uma doença hereditária, de herança autossômica dominante, com penetrância de quase 100%, causada por uma mutação no gene *APC*. A PAF se caracteriza pelo desenvolvimento de centenas a milhares de pólipos adenomatosos no cólon e reto que surgem na adolescência e início da vida adulta. Estes pólipos tendem a permanecerem assintomáticos até os pacientes atingirem cerca de 30 anos de idade, quando se manifestam por sangramento e diarreia. Virtualmente, todos os pacientes acometidos irão

desenvolver adenocarcinoma colorretal se não forem tratados. O câncer ocorre precocemente por volta dos 36 a 39 anos de idade na PAF, enquanto na população ocorre em média aos 65 anos.^{27,28}

A segunda doença hereditária é a chamada síndrome Lynch ou HNPCC (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*). Esta é uma patologia de herança autossômica dominante na qual há tendência ao desenvolvimento de múltiplos tumores primários colônicos envolvendo predominantemente o cólon proximal, que tem início em idade precoce (antes dos 40 anos). Além disso, há também predisposição marcada para o desenvolvimento de adenocarcinomas em outros órgãos, como endométrio, ovário, estômago, trato urinário e intestino delgado. A principal alteração estrutural nesta síndrome é a perda da função dos genes responsáveis pelo reparo do DNA (*mismatch repair genes – MMR*), incluindo o hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 e hMSH6. Como resultado desta incapacidade de reparo, ocorre um acúmulo de mutações levando a formação do carcinoma. O diagnóstico deste estado de reparo defeituoso é feito a partir da comparação entre microssatélites (seqüências repetidas do DNA) existentes nas células. Quando estas seqüências são diferentes entre si, diz-se que há uma instabilidade de microssatélites, sendo então estes tumores classificados como positivos para erros de replicação.^{26,28}

No presente estudo, apenas carcinomas colorretais esporádicos foram incluídos na investigação, uma vez que os tumores hereditariamente determinados

têm comportamento clínico diverso e que a infecção pelo HPV representaria um potencial fator etiológico ambiental.

2.2 Papilomavírus Humano

2.2.1 Estrutura e Classificação Viral

O HPV pertence à família papovavírus, sendo um vírus icosaédrico, não envelopado e composto por ácido desoxirribonuclêico (DNA) circular de dupla fita com 7.900 bases de comprimento. O genoma viral é organizado em três regiões. Duas regiões codificadoras que expressam 8 proteínas virais: duas proteínas de aparecimento tardio no ciclo de vida viral denominadas L1 e L2, que formam o capsídeo, e seis proteínas de aparecimento precoce denominadas E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão relacionadas à infectividade, manutenção do vírus na célula hospedeira e proliferação viral. A terceira região não tem capacidade de codificação protéica, mas atua como reguladora, sendo denominada LCR (*long control region*) ou URR (*upstream regulatory region*) que, por sua vez, controla a transcrição dos genes virais. Todos os tipos de HPV possuem a estrutura do genoma basicamente organizada com as mesmas características (figura 1).^{14,30}

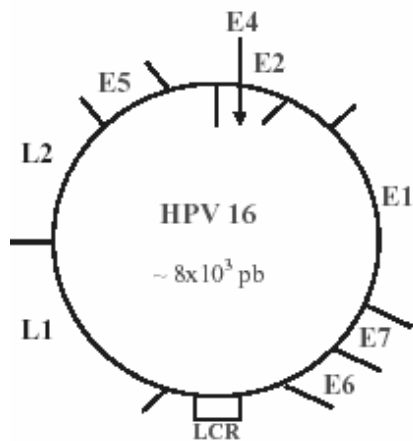


FIGURA 1: Genoma do papiloma vírus humano 16, localização e organização dos genes.³¹

Mais de 230 tipos de HPV já foram identificados até o momento.³² Estes tipos são definidos pela análise da seqüência de DNA que apresentam, sendo uma seqüência considerada nova quando a composição de bases de uma região específica (E6, E7 e L1) difere em mais de 10% das seqüências originais já estudadas.³³ A maioria dos HPVs conhecidos já foi completamente seqüenciada e agrupada conforme a superfície epitelial que costuma infectar no hospedeiro e conforme a homologia da seqüência de seu DNA (Quadro 1).

QUADRO 1. Tipos de HPV classificados conforme sua homologia na seqüência de DNA e associação com lesões clínicas.

Lesões Clínicas	Tipos de HPV
Cutâneos/associados à epidermodisplasia Verruciforme	14,19,29,46,21,25 9,15,17,37,38 5,8,12,36,47 22,23,24, 49,50
Cutâneos	1,63 4,48,60,65 41
Cutâneos/mucosos	2,27,57 3,10,28,29 7,40,43 61,72
Mucosos	6,11,13,44,55 16,31,33,35,52,58,67 18,39,45,59,68,70 26,51,69 30,53,56,66 32,42 34,64,73, 54

A contaminação pelo HPV pode ocorrer através de vários mecanismos. Os tipos virais causadores de lesões cutâneas são geralmente adquiridos por micro traumas na pele, por auto-inoculação ou por contato direto com lesões de outra pessoa. Em lesões anogenitais, a transmissão sexual é a mais freqüente.¹⁰ A transmissão através de fômites já foi documentada, com a detecção do DNA viral em toalhas, roupas e materiais utilizados por pacientes infectados. Finalmente, há fortes evidências da transmissão transplacentária e hematogênica do vírus.^{14,34}

A infecção pelo HPV pode se manifestar de três formas. A primeira ocorre como uma infecção latente quando o genoma do HPV estabiliza-se de forma não integrada, como um episossoma, e permanece na célula hospedeira sem determinar dano. A segunda, como uma infecção ativa na qual o vírus sofre multiplicação vegetativa, manifestada por uma proliferação celular acelerada característica dos tumores benignos. A terceira, de caráter oncogênico, ocorre quando o DNA viral integra-se ao genoma da célula hospedeira alterando o controle da proliferação celular pela ação sobre os genes supressores de tumor.³⁵

2.2.2 Métodos de Detecção do HPV

Os métodos de detecção do HPV têm se tornado gradualmente mais precisos e específicos, com a identificação direta do DNA ou ácido ribonucleico (RNA) viral. Existem técnicas que não amplificam o DNA antes da análise molecular, a exemplo do *Southern blot* (SB), do *Dot blot* (DB), da hibridização *in situ* (ISH) e do sistema de captura híbrida (HCS). Com estes procedimentos, a identificação do vírus depende da presença de uma grande quantidade de DNA viral nos tecidos ou sistemas celulares analisados. Estes testes apresentam, portanto, menor sensibilidade quando comparados com técnicas que utilizam a amplificação do DNA, a exemplo da reação em cadeia da polimerase (PCR).³⁶

A PCR representa um dos maiores avanços técnicos da medicina contemporânea. O método consiste, em linhas gerais, na amplificação enzimática *in vitro* de um segmento específico de DNA a partir de quantidades mínimas de

material genético presente em um determinado meio ou tecido. Basicamente, é um processo termo-cíclico que inclui três etapas.

A primeira etapa é a desnaturação por ação térmica, com separação das fitas de DNA. A estabilidade das fitas é mantida por pontes de hidrogênio entre as bases complementares. As fitas se separam a uma temperatura específica, quando a mobilidade térmica excede a força de ligação das pontes de hidrogênio, geralmente entre 90 e 95°C.

Uma vez separadas as fitas que compõem a molécula de DNA, inicia-se a fase de anelamento, que depende da presença das seqüências iniciadoras ou *primers*. Estas seqüências irão parear com suas respectivas seqüências de bases complementares no DNA-alvo de fita simples, a 37-55°C. Os *primers* se constituem de oligonucleotídeos compostos de 20-25 bases de comprimento agrupados em uma seqüência determinada. No caso do HPV, existem variações na sensibilidade da PCR dependendo do tipo de *primer* empregado.^{37,38}

Entre os *primers* mais utilizados para o diagnóstico de HPV estão os denominados *primers consensus*, MY09/MY11 e GP5+/GP6+. Estes são pareados com regiões de *L1*, que se constituem em uma seqüência de DNA comum aos diversos tipos de HPV. Desta forma, estes *primers* podem identificar diferentes tipos de HPV em uma mesma reação, e também podem ser utilizados para detecção de novos tipos virais. Entretanto, estes *primers* apresentam menor sensibilidade em lesões nas quais o DNA viral tem a seqüência de bases de *L1* interrompida, o que

pode ocorrer quando o vírus se integra ao genoma da célula hospedeira, como frequentemente ocorre nas lesões malignas.^{38,39}

Em contraste, os *primers* chamados de específicos tem a propriedade de detectar determinados tipos de HPV, por identificarem os genes *E6* ou *E7* que têm sua expressão aumentada após a integração viral ao genoma do hospedeiro. Desta forma, são altamente sensíveis e específicos para os tipos virais analisados, em particular os HPVs 16 e 18 que apresentam o maior potencial oncogênico.³⁸

Após a fase de anelamento, à temperatura de 37-55°C, inicia-se a fase de extensão do *primer* através de uma enzima termoestável denominada de *Taq* polimerase. A ação desta enzima é a de reproduzir um segmento da fita de DNA a partir da região onde houve a ligação entre o *primer* e o segmento de DNA correspondente. Ambas as fitas simples iniciais de DNA, por conseguinte, são convertidas em quatro fitas pareadas, as quais servem de modelo para um novo ciclo de PCR que se iniciará. Este processo passa a ocorrer sucessivamente por 35 a 40 ciclos havendo em consequência um crescimento exponencial no número de cópias do DNA-alvo formadas. Após a amplificação, o produto da PCR é submetido à eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio, o que permite então a visualização do DNA amplificado à luz ultra-violeta.³⁷

2.2.3 Papel Oncogênico do HPV

As novas técnicas de biologia molecular foram fundamentais para melhor esclarecer o papel do HPV no processo de desenvolvimento de tumores malignos. A ação oncogênica deste vírus foi primeiramente reconhecida na década de 1930, quando estudos experimentais mostraram que lesões benignas em coelhos podiam ser induzidas à transformação maligna e ao carcinoma invasivo por ação de um tipo específico de papilomavírus (*cottontail rabbit papillomavirus*).⁴⁰

Em seres humanos, a associação entre HPV e câncer foi inicialmente sugerida na epidermodisplasia verruciforme, uma doença genética rara caracterizada por deficiência no sistema imune. Os pacientes acometidos desenvolvem lesões verrucosas características na pele, que em 30 a 60% dos casos evoluem para transformação maligna nas áreas expostas ao sol. Nesta doença, em mais de 90% das lesões que progridem para o carcinoma de células escamosas, são encontrados o HPV tipo 5 e o HPV tipo 8.³⁰

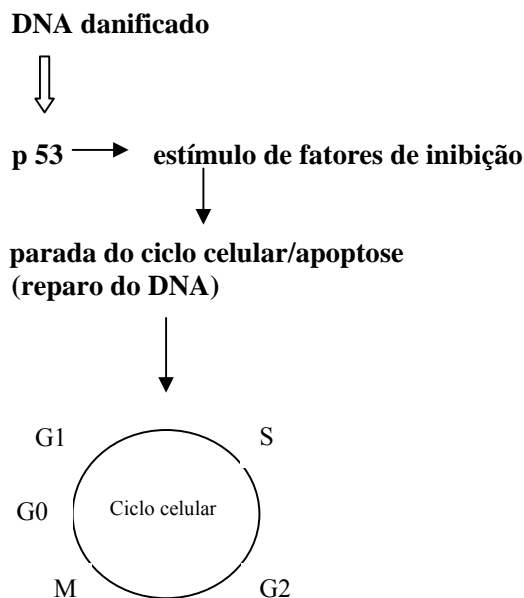
O mecanismo oncogênico do HPV tem sido objeto de vários estudos. Diferentes tipos de HPV possuem capacidade variável de indução maligna dos tecidos que infectam. Desta forma, os mais de 30 tipos de HPV que acometem a região anogenital são classificados de acordo com seu potencial oncogênico como grupo de alto risco, a exemplo dos tipos 16 e 18, e grupo de baixo risco, correspondendo principalmente aos HPVs 6 e 11.¹¹

Sabe-se que em lesões benignas e pré-malignas o DNA viral é mantido de forma episomal, ou seja, não integrado ao genoma da célula hospedeira. O

contrário se observa nos carcinomas, onde o genoma viral está geralmente integrado ao genoma do hospedeiro. Esta integração provoca a ruptura dos genes *L1*, *L2*, *E1* e *E2* do vírus. Sendo o gene *E2* responsável pelo controle da transcrição dos genes *E6* e *E7*, sua inativação leva a superexpressão destes dois genes. O aumento da expressão dos genes *E6* e *E7* é fundamental para carcinogênese induzida pelo HPV 16 e 18. O gene *E6* forma um complexo com o gene *p53* e o degrada pela via da ubiquitina, o que resulta na inativação deste gene supressor tumoral.³⁹

O gene *p53* é denominado o “guardião do genoma” porque atua sempre que ocorre um dano ao DNA. Nesta situação, há um aumento na sua expressão, o que ocorre com o objetivo de promover a interrupção do ciclo celular em G1 para reparo do DNA ou promover a indução de apoptose, a morte celular programada (figura 2).⁴¹

A: Condições Fisiológicas



B: Infecção pelo HPV 16/18

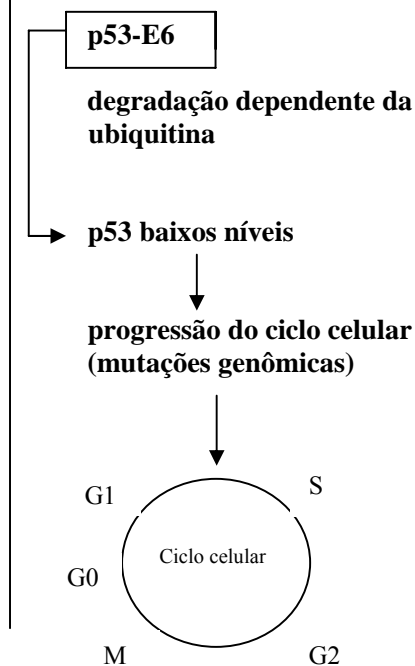


FIGURA 2. Representação esquemática da ação do gene *E6* do HPV 16/18 sobre o gene *p53*.

Em conjunto com a ação do *E6*, o gene *E7* irá se ligar a outro gene supressor tumoral da célula hospedeira, o gene do retinoblastoma (*RB*). Este codifica uma proteína, a pRB, que tem a função de manter o ciclo celular quiescente através de sua ligação com o fator de transcrição E2F na fase G1. Para que ocorra a progressão do ciclo celular a partir de G1, a pRB sofre uma fosforilação que leva à desintegração do complexo com E2F. A proteína E7 do HPV liga-se às formas hipofosforiladas da pRB, liberando o fator de transcrição E2F e promovendo deste modo a síntese de DNA não programada biologicamente pelos mecanismos

celulares do hospedeiro. A interação destas duas proteínas virais com os genes supressores tumorais leva a instabilidade do genoma celular com conseqüente imortalização da célula infectada (figura 3).^{41,42,43}

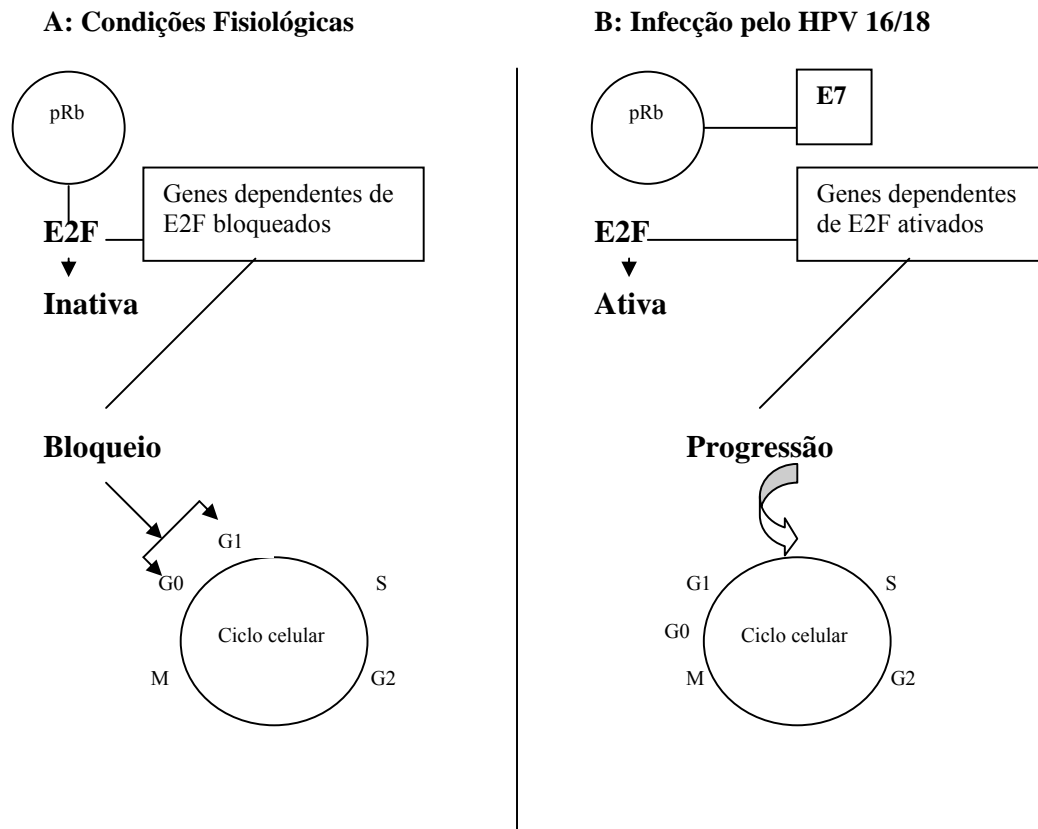


FIGURA 3. Representação esquemática da atuação do gene *E7* do HPV 16/18 sobre o gene *RB*.

A ação carcinogênica do HPV foi extensivamente investigada com relação ao câncer de colo uterino. No estudo pioneiro de Dürst e colaboradores (1983), tipos específicos de HPV, particularmente o 16 e o 18, foram isolados de biópsias de tumores de colo uterino. Vários estudos posteriores confirmaram este achado,

detectando material genético do HPV na grande maioria dos tumores cervicais e indicando um papel crítico do vírus nesta neoplasia.⁴¹

A mais forte evidência epidemiológica da ação carcinogênica do HPV no colo uterino foi fornecida pela Agência Internacional para Pesquisa no Câncer-*International Agency for Research on Cancer (IARC)*. A pesquisa consistiu de estudos multicêntricos de casos e controles que compararam 2000 mulheres com carcinoma de colo uterino com 2000 mulheres saudáveis. Foram incluídos pacientes da Espanha, Colômbia, Brasil, Paraguai, Marrocos, Mali e Filipinas. A análise dos dados demonstrou uma razão de chances (*odds ratio*) para associação da presença do HPV e câncer de colo uterino que variou entre 17 e 156, obtidas na Colômbia e nas Filipinas respectivamente, sendo a razão de chances comum de 60% (95%, intervalo de confiança de 49-73). A associação foi observada tanto nos tumores escamosos (razão de chances de 62) quanto nos adenocarcinomas (razão de chances de 51).⁹

A razão de chances foi de 129 para o HPV 16 e de 104 para o HPV 18, sendo também elevada para tipos virais menos comuns. Para se dimensionar a importância destes achados, cita-se o fato de que mesmo a menor razão de chances observada foi maior do que aquela verificada na associação entre tabagismo e câncer de pulmão, sendo similar àquela entre hepatite infecciosa e câncer hepático, ambas aceitas universalmente como relações causais estabelecidas.⁴⁴

Finalmente, foi detectado DNA viral através de PCR com *primers consenso* MY09/MY11 em 93% de mais de 1000 biópsias de carcinoma de colo uterino obtidas de 22 países. Após a análise inicial, as biópsias negativas (7%) foram testadas novamente com *primers* consensos mais sensíveis (GP5+/GP6+) e com *primer* específico E7, sendo então constatada a prevalência do HPV em 99,7% das amostras. Estes resultados, marcantes do ponto de vista epidemiológico, permitiram aos autores concluir que o HPV representa uma causa necessária para o surgimento do câncer cervical.⁹

O HPV também é fator de risco definido para as neoplasias da região anogenital como o carcinoma epidermóide de vulva e pênis, nos quais o vírus está presente em cerca de 50% dos casos.¹⁴ A relação com câncer de canal anal é ainda mais importante. Num estudo de casos e controles, Frisch e colegas encontraram DNA de HPV em 88% de 388 pacientes com a doença. Em contrapartida, não houve a identificação do vírus em nenhum dos 20 casos de adenocarcinoma de reto usados como controles. Tal qual se dá no câncer de colo uterino, o tipo 16 foi encontrado em 73% dos carcinomas invasivos.¹⁰

O possível papel oncogênico do HPV também tem sido investigado em neoplasias extragenitais, a exemplo dos carcinomas de laringe, faringe, esôfago, pulmão, bexiga e mama. Embora com menor significância epidemiológica, o DNA viral foi identificado tanto em tumores de células escamosas, quanto em tumores de células transitórias e adenocarcinomas, com graus variáveis de positividade de acordo com o tipo histológico e a origem anatômica do tumor.¹⁷⁻²⁰

2.3 HPV e Câncer Colorretal

Kirgan e colaboradores, no começo da década de 1990, foram um dos primeiros a investigar o papel potencial do HPV na etiologia do câncer colorretal. Em seu estudo inicial, foi testada a presença de antígenos do HPV através de imunohistoquímica em amostras teciduais de diferentes pacientes armazenadas em blocos de parafina. Em 97% dos 30 casos de câncer colorretal estudados foram detectados antígenos virais, bem como em 60% de adenomas tubulovilosos e em 23% de amostras teciduais de mucosa colônica normal ($p < 0,001$).⁴

Cheng e colaboradores, em 1991, estudaram a presença de seqüências de DNA do HPV usando a técnica de hibridização por *Southern blot* em três linhagens celulares de adenocarcinoma colorretal obtidas de pacientes chineses. Seqüências de DNA dos HPVs 16 e 18 foram detectadas nas colônias de células tumorais, mas não em amostras de tecido colônico não neoplásico usadas como controle. Além disso, foi sugerida uma potencial associação entre a infecção viral e alterações no oncogene *c-myc*.⁴⁵

McGregor e colaboradores estudaram tecidos colorretais armazenados em parafina e detectaram a região L1 do genoma do HPV através de PCR e *Southern Blotting* em 32% dos 38 carcinomas colorretais analisados, em 38% dos adenomas e em 8% das biópsias de mucosa normais. No estudo publicado por Lee e colaboradores, foram analisados tecidos coletados de 38 pacientes com CCR na sala de cirurgia e mantidos congelado a menos 70 graus centígrados. De cada um dos

pacientes eram obtidas uma amostra do tumor colorretal e uma amostra de mucosa colônica normal, posteriormente testadas por PCR e *Southern Blotting*. O HPV18 foi encontrado em 53% (10/19) dos fragmentos de mucosa colônica normal e em 84% (16/19) dos tumores ($p < 0,01$).⁵

Novamente Cheng e colaboradores, em 1995, demonstram haver relação significativa entre os graus de displasia de uma série de os adenomas e a presença do HPV-16 através da análise por PCR e *Southern blot*. Foram analisadas 109 adenomas colorretais em parafina. A infecção pelo HPV 16 foi detectada em 8% dos adenomas com displasia leve, em 25% dos adenomas com displasia moderada e em 58% dos adenomas com displasia severa.⁶

Recentemente, Bodaghi e colaboradores utilizaram as técnicas de PCR (*nested e in situ*) e seqüenciamento em um estudo controlado para investigação da presença do HPV em tecidos colorretais. O vírus foi detectado em 55% (28 de 55) das amostras de tecidos obtidas de pacientes com CCR, não sendo detectado em nenhuma das amostras de cólon normal obtidas de controles sem câncer.⁴⁶

O maior estudo em número de pacientes foi conduzido por Weinberger e colaboradores, que utilizaram a técnica de *microrarray* para detectar a expressão tecidual da oncoproteína E6 dos HPVs 16 e 18. Foram analisados tecidos neoplásicos de 447 pacientes com câncer de cólon e reto. Este estudo não foi publicado como artigo original, mas sob a forma de resumo por ter sido apresentado no congresso anual da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO). Os

autores não relatam em que percentagem de pacientes o HPV foi detectado. Não foram analisadas amostras de tecido colorretal normal como controles. Foi demonstrado, no entanto, que há expressão significativamente maior da proteína E6 em tumores com estadiamento mais precoce e com localização anatômica mais distal no intestino grosso. Baseando-se na maior expressão protéica observada nos tumores de reto e sigmóide os autores sugeriram que a infecção pelo HPV ocorreria a partir da transmissão retrograda do vírus do períneo para trato gastrointestinal baixo.⁴⁷

Em contraposição aos autores que sugeriram a participação do HPV no desenvolvimento do câncer colorretal, alguns estudos falharam em demonstrar a presença do vírus em pacientes com este tipo de neoplasia. Boguszakova e colaboradores analisaram biópsias de 13 pacientes com adenocarcinoma de cólon e de 10 pacientes com adenomas para a presença de DNA de citomegalovírus, epstein-Barr vírus e HPV (tipos 2, 6, 16 e 18). A técnica utilizada foi *Southern blot*, tendo uma sensibilidade estimada de 0.05 equivalentes de genoma viral por célula. Não foi encontrado DNA viral em nenhuma das amostras teciduais testadas.⁴⁸

Shah e cols. analisaram a DNAs obtidos de 50 tumores colorretais para a presença de seqüências de HPV através da técnica de PCR utilizando *primers consensus* L1 para a amplificação. Os produtos da PCR eram também rastreados com um probe genérico de HPV que consistia de amplímeros dos HPVs 16 e 18. Todas as amostras foram negativas para a presença do vírus, sendo estes resultados

confirmados por seqüenciamento. Em sua conclusão, os autores questionaram a associação entre a infecção pelo HPV e o câncer colorretal.²¹

No estudo conduzido por Shroyer e colaboradores foi utilizada PCR (*primers consensus* L1 – MY11) e hibridização *in situ* para investigar a presença do HPV (tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35) em secções de tecido em parafina. Foi detectado DNA viral em todos os 5 casos de carcinoma escamoso de canal anal, mas em nenhuma das 22 amostras de adenocarcinoma colônico estudadas. Os autores concluíram com isso que o HPV está uniformemente presente no carcinoma anal, mas não parece ter qualquer participação na carcinogênese colônica.²²

3. JUSTIFICATIVA

Baseado nos resultados controversos da literatura quanto a potencial associação entre o HPV e o desenvolvimento do carcinoma colorretal e considerando a alta prevalência desta infecção viral no Brasil, decidimos realizar um estudo prospectivo em nosso meio investigando a presença do vírus no cólon e reto de pacientes com este tipo de câncer. A definição de um papel etiológico do HPV no processo de carcinogênese colorretal poderá mudar significativamente a compreensão da biologia desta neoplasia, abrindo novas perspectivas de diagnóstico e prevenção da doença.

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Determinar se o HPV está presente no adenocarcinoma de cólon e reto.

3.2. Objetivos específicos

1. Comparar a prevalência do HPV em amostras de adenocarcinoma colorretal com a prevalência em amostras de tecido colorretal não neoplásico obtidas de 2 fontes diferentes:
 - A) Cólon ou reto de pacientes sem câncer operados para tratamento de doenças intestinais benignas.
 - B) Áreas de tecido intestinal sem tumor obtidas do próprio cólon ou reto dos pacientes com câncer colorretal.

2. Correlacionar a presença do HPV nos adenocarcinomas colorretais com as seguintes variáveis clínico-patológicas da doença:
 - A) idade dos pacientes
 - B) sexo dos pacientes
 - C) localização do tumor no intestino grosso
 - D) estadiamento da doença

4. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento da pesquisa

Trata-se de um estudo transversal controlado, com unidade de estudo individual.

4.2. População estudada

Foram considerados elegíveis pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma primário de cólon ou reto, comprovado por exame anatomopatológico, que foram tratados por ressecção cirúrgica eletiva no Serviço de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de março de 2004 a fevereiro de 2005.

Para que fossem estudados apenas casos de câncer colorretal esporádico, foram excluídos os pacientes com diagnóstico de PAF ou HNPCC. Da mesma forma, pacientes com câncer associado à doença inflamatória intestinal não foram avaliados. Nenhum dos participantes foi submetido a tratamento neo-adjuvante quimio ou radioterápico. A recusa em participar do estudo, embora não tenha ocorrido em nenhum caso, era também considerada critério de exclusão do estudo. Todos os participantes concordaram formalmente em participar da pesquisa através da assinatura de consentimento informado, previamente aprovado pela Comissão de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA.

Como controles, foram incluídos pacientes escolhidos ao acaso provenientes do Serviço de Coloproctologia do HCPA submetidos a ressecções colorretais não relacionadas a câncer, tais como tratamento da doença diverticular, doença inflamatória intestinal, colite isquêmica. Nenhum dos pacientes do grupo controle tinha história prévia de câncer de cólon ou reto ou apresentava suspeita clínica ao exame físico, exames de imagem ou revisão transoperatória de neoplasia maligna. A participação no estudo destes pacientes foi também autorizada mediante termo de consentimento informado.

4.3. Amostra estudada

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão de pacientes, a amostra em estudo ficou constituída 72 pacientes com câncer colorretal. Este grupo era formado por 36 homens e 36 mulheres, com idade média de 64,1 anos (variação de 39 a 75 anos).

Como grupo controle, foram analisados 15 pacientes com doenças colorretais não malignas. Foram estudados 8 homens e sete mulheres. A idade média destes pacientes foi 52,3 anos (variação de 25 a 75 anos). As indicações cirúrgicas nestes pacientes foram: doença diverticular (5 casos), colite isquêmica (2 casos), doença inflamatória (5 casos), endometriose colônica (1 caso), correção de prolapso de colostomia (2 casos).

4.4. Métodos

4.4.1. Avaliação clínico-patológica

Todas os pacientes foram avaliadas no período pré-operatório através de uma seqüência de exames para diagnóstico e estadiamento da doença conforme a rotina do Serviço de Coloproctologia do HCPA. Após a realização de história e exame físico completo, os pacientes eram investigados por colonoscopia. A localização anatômica dos tumores era a seguinte: 39 tumores (54,17%) localizados no reto, 17 (23,61%) no cólon sigmóide, 13 (18,06%) no cólon ascendente ou ceco, 2 (2,78%) no cólon transverso e 1 (1,39%) no cólon descendente. Sempre era realizada biópsia da lesão tumoral, mesmo nos casos encaminhados ao Serviço já com diagnóstico histológico, para confirmação anatomopatológica do carcinoma.

A extensão da doença era avaliada por ultrassonografia e/ou tomografia de abdominal total e radiografia e/ ou tomografia de tórax. Para todos os pacientes eram solicitados eletrocardiograma, hemograma, bioquímica completa, provas de função renal e dosagem sérica do antígeno carcinoembriônico (CEA).

O estadiamento de cada paciente de acordo com a classificação TNM (tabelas 1 e 2) era estabelecido após a revisão trans-operatória da cavidade abdominal e a realização de exame anatomopatológico da peça cirúrgica. Os tumores encontrados eram classificados conforme o grau de diferenciação histológica (tabela 3).⁴⁹

TABELA 1 –Classificação TNM

Tumor primário (T)

Tx Tumor primário não pode ser avaliado

T0 Sem evidências de tumor primário

Tis Carcinoma *in situ*

T1 Tumor invade a submucosa

T2 Tumor invade a muscular própria

T3 Tumor invade através da muscular própria a subserosa ou tecido pericólico ou peritretal não peritonializado

T4 Tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou perfura peritônio visceral.

Linfonodos regionais

NX Linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 Ausência de metástases nos linfonodos regionais

N1 Metástases em 1 a 3 linfonodo(s) regional(is)

N2 Metástases em 4 ou mais linfonodos

Metástases à distância

MX A presença de metástases à distância não pode ser avaliada

M0 Ausência de metástases à distância

M1 Metástases à distância

TABELA 2. Estadiamento por Grupos

ESTÁDIO 0	Tis	N0	M0
ESTÁDIO I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
ESTÁDIO II	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
ESTÁDIO III	qualquer T	N1	M0
	qualquer T	N2	M0
ESTÁDIO IV	qualquer T	qualquer N	M1

TABELA 3. Graduação histopatológica

Bem diferenciado
Moderadamente diferenciado
Pouco diferenciado

Os pacientes do grupo controle eram também submetidos à colonoscopia com biópsia, sempre que este exame não estava clinicamente contra-indicado. A presença de doença colorretal maligna era afastada pela avaliação endoscópica, pela revisão intra-operatória do intestino grosso e da cavidade abdominal e pelo exame anatomopatológico definitivo da peça cirúrgica.

4.4.2. Coleta das amostras de tecido colorretal

Todos as amostras de tecido colorretal foram coletadas na sala de cirurgia pelos cirurgiões da equipe de Coloproctologia diretamente envolvidos no estudo, logo após a ressecção do segmento de intestino grosso. Foram coletadas duas amostras de tecido de cada caso de câncer colorretal: uma amostra da lesão tumoral e uma amostra de tecido intestinal não neoplásico obtida de uma área localizada a 15 cm do tumor.

A coleta de tecidos era realizada de acordo com um protocolo padronizado para evitar a contaminação cruzada entre as amostras durante a manipulação do espécime cirúrgico. Luvas e instrumentos cirúrgicos esterilizados eram utilizados. O segmento ressecado de intestino era sempre aberto longitudinalmente a partir da extremidade proximal, exceto quando o tumor se localizava no ceco. A amostra de tecido não neoplásico era então coletada da luz intestinal. Na seqüência, após a troca de luvas, novos instrumentos cirúrgicos eram usados para completar a abertura da peça e coleta da amostra de tecido tumoral.

No grupo controle sem câncer, a coleta de tecidos era também realizada na sala de cirurgia pelos mesmos médicos logo após a remoção da peça e em condições estéreis. A abertura do intestino era iniciada a partir da extremidade proximal e a amostra de tecido era obtida de uma área central do espécime.

Após a coleta, as amostras eram armazenadas em tubos de ensaio de vidro sem reagentes químicos e congelados a – 30 graus centígrados.

4.4.3 Processamento e análise das amostras

O DNA das diferentes amostras foi extraído usando o *NucleoSpin® Tissue Kit* (Macherey & Nagel, Solana Beach CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi feita com o dispositivo GeneQuantII (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd. England).

A integridade do DNA das amostras foi verificada pela amplificação de uma região com 280 pares de bases do gene da β -globina humana. O conjunto de *primers* utilizados foi: PC04 (CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC) e GH 20 (GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC).⁵² Todas amostras tiveram esta reação positiva, ou seja, apresentavam DNA viável.

As amostras foram inicialmente submetidas a PCR com *primers* consenso GP5+/GP6+, que permitem a detecção de um amplo espectro de tipos de HPV. As amostras que foram negativas com o uso do PCR GP5+/GP6+ foram re-amplificadas através de PCR “*auto-nested*” usando os mesmos *primers*. Por definição, a técnica de *nested-PCR* consiste na utilização de *primers* em combinação na mesma reação com objetivo de aumentar a sensibilidade da análise.⁵⁰

Neste estudo, foi realizada, pela primeira vez em pacientes com câncer colorretal, a técnica de *auto-nested* PCR conforme descrita por Remmerbach e cols. Em resumo, após a primeira amplificação usando os *primers* GP5+/GP6+, coleta-se 1 microlitro do produto da PCR e realiza-se uma nova amplificação com os mesmos parâmetros de tempo e temperatura utilizando-se o mesmo kit de *primers* previamente empregado, o que aumenta a sensibilidade desta PCR em até 65,1% em comparação à chamada *single-round PCR*.⁵¹

Os produtos amplificados do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados a partir da incorporação de brometo de etídio. Os controles negativos incluíram todos os reagentes com exceção do DNA. Os controles positivos para presença do HPV se constituíram no DNA isolado de células das linhagens SiHa, que contém 1-2 cópias do HPV 16 integrado ao genoma, e de células da linhagem HeLa, que contém 10-50 cópias do HPV 18 integrado ao seu genoma.⁵²

Para a genotipagem viral foram conduzidas PCRs com *primers* específicos E6 para os HPVs 16 e 18. As seqüências utilizadas para os *primers* específicos foram: HPV16 E6 – CAG GAC CCA CAG GAG CGA CC / ATC GAC CGG TCC ACC GAC CC e HPV 18 E6 – GCT TTG AGG ATC CAA CAC GG / TGC AGC ACG AAT GGC ACT GG.⁵³ Cada reação com volume de 25µl, continha uma solução tampão para PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl), aproximadamente 0,2 µg de DNA amostral, 10 picomóis de cada *primer*, 1 unidade da enzima PLATINUM® Taq DNA Polymerase e 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP). A concentração de MgCl₂ variou com os diferentes *primers*. Para os *primers* E6

específicos foi utilizado 1,5 mM de MgCl₂ e para o *primer* consenso foi utilizado 2,5 mM MgCl₂. Os reagentes, com exceção dos *primers*, foram de origem GIBCOBRL® (Grand Island, NY USA).

As amostras foram amplificadas no termociclador modelo PTC – 100™ (MJ Researchs, Watertown, Massachusetts, USA) com o primeiro ciclo de desnaturação a 94°C por 4 min e com o ciclo final de extensão a 72°C por 10 min. As condições e o número de ciclos de desnaturação-anelamento-extensão variaram com os diferentes conjuntos de *primers*. Para o *primer* consenso foram utilizados 35 ciclos com os seguintes parâmetros: 94°C por 30 segundos; 42°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Para os *primers* específicos a PCR consistiu de 35 ciclos com os seguintes parâmetros: 94°C por 1 minuto; 58°C por 2 minutos e 72°C por 3 minutos.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de Agarose–1000 (GIBCOBRL®) e visualizados a partir da incorporação de brometo de etídio. Os fragmentos de L1 amplificados continham aproximadamente 140 pb e os fragmentos da região E6 do HPVs 16 e 18 continham respectivamente 380 e 440 pb. As células SiHa e HeLa foram usadas como controles positivos. As reações nas quais não foi adicionado DNA, foram consideradas como controles negativos.

As amostras positivas na PCR foram submetidas a seqüenciamento direto do DNA com objetivo de confirmar os resultados. Os produtos da PCR foram purificados com kit específico (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Após purificação, os produtos foram marcados com o *BigDye® V3.1 Cycle Sequencing Kit*. Desta

forma, cada nucleotídeo era marcado como uma cor específica, que era detectada no seqüenciador automático 310 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA) e traduzida graficamente como eletroferograma. Os resultados obtidos eram posteriormente comparados com as seqüências de E6 dos respectivos HPVs, publicada on-line pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - Bethesda, MD, USA).

Para evitar possíveis contaminações com os amplicons, as análises das amostras amplificadas foram realizadas em outro local do laboratório. Houve controle rigoroso com relação às pipetas, tubos e aventais entre os dois locais do laboratório. Todas as análises positivas foram repetidas para confirmação do achado.

4.4.4. Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas pela média e desvio padrão. Para análise dos dados qualitativos foram utilizados percentual e freqüência absoluta. As comparações entre o grupo de pacientes positivos para a presença do HPV e os pacientes negativos foram realizadas através do teste *t* de Student (dados quantitativos) e pelo teste de qui-quadrado. Nas situações em que os valores esperados foram pequenos nas tabelas de contingência foi utilizado o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Os dados foram analisados com o auxílio do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences for Windows*) versão 12.0.

4.4.5. Ética

Os pacientes foram instruídos verbalmente sobre os objetivos do estudo. Todos autorizaram a sua participação através de assinatura de termo de consentimento informado. Foram garantidas a preservação dos dados, a confidencialidade e o anonimato dos indivíduos pesquisados. Em nenhuma etapa do estudo houve risco para os paciente participantes. O estudo não provocou mudança nos tratamento dos pacientes.

O presente estudo foi avaliado pelo Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, tendo sido aprovado no processo de número 02-264.

5. RESULTADOS

5.1. Características demográficas

A amostra estudada foi constituída de 72 pacientes com câncer colorretal e 15 pacientes analisados como controles. A média das idades nos pacientes com câncer foi de 64,08 anos com desvio padrão de 12,99 anos. No pacientes sem câncer a media de idade foi inferior, 52,27 anos com desvio padrão de 13.3 anos. A distribuição dos pacientes por idade está demonstrada na tabela 4. A diferença entre a média de idade dos grupos foi significativa ($p=0,02$).

TABELA 4. Distribuição por idade

Grupo	Média*	DP	Amplitude*
Câncer	64,08	12,98	35-90
Controle	52,27	13,29	25-75

*valores expressos em anos; DP = desvio padrão
teste T, $p=0,02$

Dos 72 paciente com câncer, 36 pacientes (50%) eram do sexo masculino e 36 eram do sexo feminino. Dos 15 pacientes sem câncer, 8 (53,3%) eram homens e 7 (46,7%) eram mulheres. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto a distribuição dos sexos (tabela 5).

TABELA 5. Distribuição por sexo

Grupo	Masculino	Feminino
Câncer	36	36
Controle	8	7

*teste exato de fischer, $p=1,0$

5.2. Características clínico-patológicas

Nos pacientes com câncer, as amostras foram coletas do reto em 39 pacientes (54,2%); do cólon sigmóide ou descendente em 18 pacientes (25%); do cólon trasnverso, descendente ou ceco em 15 pacientes (20,8%). Nos pacientes sem

câncer, as amostras foram coletadas do reto em 7 pacientes (46,7%), do cólon sigmóide ou descendente em 5 pacientes (33.3%); do cólon trasnverso, descendente ou ceco em 3 pacientes (20%). Não houve diferença significativa ($p=0,794$) entre os grupos ao se analisar os locais de onde foram coletadas as amostras. Estes dados são apresentados na tabela 6, sendo as regiões anatômicas classificadas para fins de análise em três grupos: 1) cólon proximal, incluindo o ceco, cólon ascendente e transversos; 2) cólon distal, englobando os cólons descendente e sigmóide e 3) reto.

TABELA 6. Localização das Amostras Coletadas

	Pacientes com tumor	Pacientes sem tumor
Cólon Proximal	15 (20,8%)	3 (20%)
Cólon distal	1 8 (25%)	5 (33,3%)
Reto	39 (54,2%)	7 (46,7%)
Total	72	15

teste Chi-Quadrado (Pearson), $p = 0,794$

A classificação dos tumores de acordo com o estadiamento (sistema TNM) é mostrado na tabela 7. Sessenta e três casos (87,5%) foram classificados como moderadamente diferenciados, sete casos (9,7%) e dois casos (2,78%) foram classificados como pouco e bem diferenciados, respectivamente.

TABELA 7. Estadiamento dos tumores (TNM)*

Estadio I	13 (18,05%)
Estadio II	21 (29,17%)
Estadio III	22 (30,55%)
Estádio IV	16 (22,2%)
Total	72 (100%)

* número absoluto e porcentagem de casos da amostra de pacientes com tumor analisada.

5.3 Detecção do HPV

Todas as amostras analisadas mostraram reação da PCR positiva para β -globina, evidenciando a viabilidade do DNA dos espécimens.

O DNA do HPV foi detectado nas amostras de 60 dos 72 pacientes com câncer (83,3%) usando a PCR auto-nested com primers GP5+/GP6+, não sendo identificado em nenhuma das amostras do grupo controle sem neoplasia ($p < 0.001$).

No grupo com câncer, o DNA do HPV foi encontrado em 61,1% (44 de 72) das amostras de tumor e em 50% (36 de 72) das amostras de tecido não tumoral ($p = 0.25$). A comparação de cada um destes resultados isoladamente com o resultado da análise do grupo controle sem câncer, no qual não foi detectado o HPV, alcançou diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$). Vinte e três pacientes (31,94%)

tiveram o HPV detectado somente nas amostras de tecido tumoral, 14 pacientes (19,44%) tiveram o vírus detectado somente no tecido não neoplásico e 23 (31,94%) tiveram o HPV identificado em ambos os tipos de amostra.

Os resultados obtidos com a análise dos diferentes tipos de amostras coletadas dos pacientes com tumor através dos primers GP5+/ GP6+ e primers específicos para HPV16 e para HPV18 são apresentados na tabela 8. Estes não alcançaram significância estatística, apesar de uma tendência a maior positividade para os PCR GP5+/GP6+ e PCR para HPV 16 nos tecidos neoplásicos em relação aos tecidos não tumorais coletados. Os resultados foram idênticos nestas amostras ao se comparar o HPV 18.

TABELA 8. PCR + nas amostras coletadas em pacientes com tumor

	Tumor	Mucosa adjacente ao Tumor	p-valor
GP5+/6+	61,11%	50%	0,24
HPV16	34,72%	25%	0,275
HPV 18	18,06%	18,06%	1,0

Dos 60 casos positivos identificados através da PCR com os *primers* consenso (GP5+/GP6+), 45 casos tiveram identificada a presença dos HPVs 16 ou 18 através de PCR com *primers* específicos. O HPV 16 foi o tipo viral mais frequente, sendo o único tipo diagnosticado em 22 casos (36,67%). O HPV 18 foi o único tipo identificado em 12 casos (20%). Em 11 casos (18,33%) verificou-se a

ocorrência de uma infecção mista, estando presentes concomitantemente o HPV16 e o HPV18. Em 15 paciente (25%), no entanto, não se identificou nem o HPV16 nem o HPV 18, indicando que infecção detectada através dos *primers* consenso era causada por tipos virais diversos.

O seqüenciamento direto confirmou os resultados da PCR com *primers* específicos. As seqüências das amostras positivas eram as mesmas seqüências E6 publicadas para os HPVs 16 (figura 4) e 18.

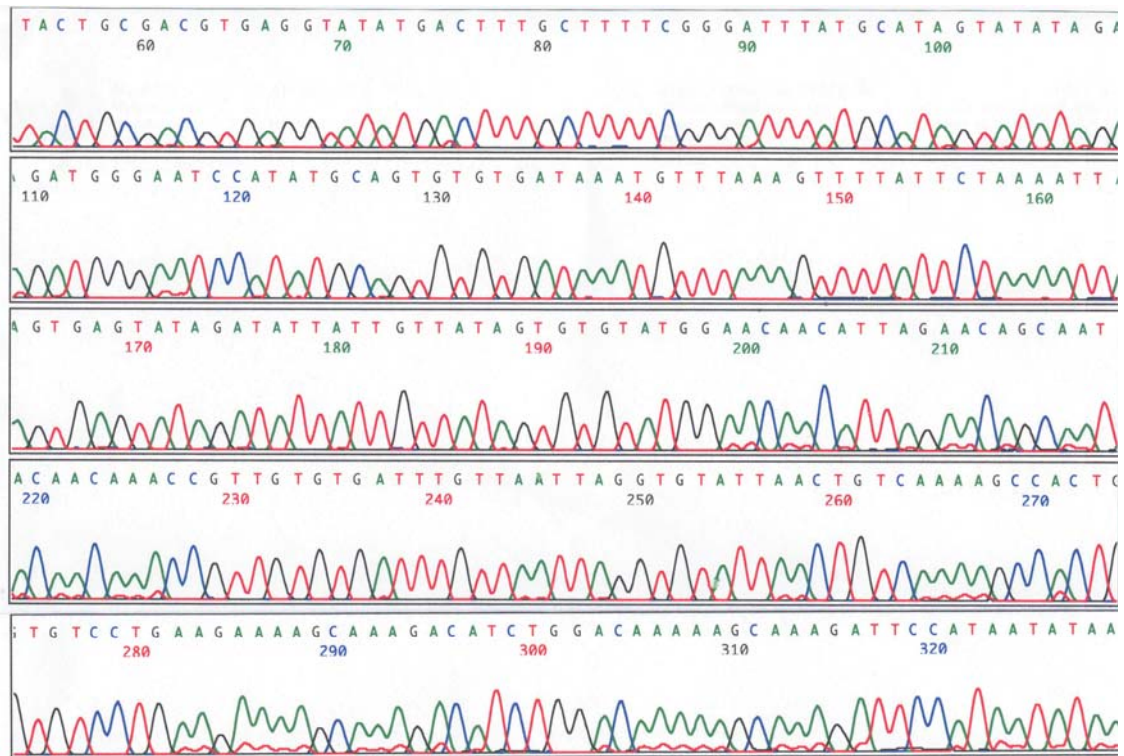


Figura 4. Seqüenciamento do HPV 16 – primer E6.

5.4. Variáveis clínico-patológicas em relação à presença do HPV

Não houve associações estatisticamente significativas entre positividade para o papiloma vírus humano e a idade (Tabela 9) e o sexo (Tabela 10) dos pacientes estudados.

TABELA 9. Relação entre idade e presença do HPV

Grupo	Nºde Pacientes	Média de idade	Desvio Padrão
HPV+	60	64,30	13,44
HPV-	12	63,0	13,045

*teste T, $p=0,76$

TABELA 10. Relação entre sexo e presença do HPV

HPV	Masculino	Feminino
HPV+	31 (86,1%)	29 (80,6%)
HPV-	5 (13,9%)	7 (19,4%)

*teste exato de fischer, $p=0,753$

Não houve associação estatisticamente significativa entre positividade para o HPV e a progressão do estadiamento tumoral (tabela 11). O mesmo aconteceu ao se analisar a presença do HPV em comparação à região anatômica onde se localizava o tumor (tabela 12).

TABELA 11. Presença do HPV conforme estadiamento do Tumor

	HPV +	HPV-
I	9 (69,2%)	4 (30,8%)
II	17(81%)	4 (19%)
III	21(95,5%)	1 (4,5%)
IV	13 (81,3%)	3 (18,8%)

teste exato de Fisher, $p= 0,202$

TABELA 12. Presença do HPV conforme localização do Tumor

	HPV +	HPV-	Total	%
Cólon Proximal	13	2	15	20,8
Cólon distal	15	3	18	25
Reto	32	7	39	54,2
Total	60	12	72	100

teste Chi-Quadrado, $p= 0,920$

6. DISCUSSÃO

Estimativas apontam o câncer de cólon e reto como o quarto mais freqüente no Brasil, tanto em homens como em mulheres. Apesar da melhora crescente da tecnologia médica, incluindo novos métodos diagnósticos e tratamento adjuvante, a taxa de mortalidade e cura não têm sofrido alterações consideráveis. A pesquisa em biologia molecular no câncer colorretal parece ser o caminho fundamental para melhora deste panorama.

Até o momento, a patogênese do assim chamado carcinoma colorretal esporádico, que representa mais de 90% dos casos diagnosticados, ainda necessita ser esclarecida. Neste contexto, a identificação de um agente infeccioso como parte do processo de carcinogênese colorretal representaria uma mudança radical no entendimento da biologia desta neoplasia, abrindo novas possibilidades diagnósticas e terapêuticas.

A partir do início dos anos 90, surgiram as primeiras publicações sugerindo um papel do HPV na etiologia do câncer colorretal.⁴⁻⁸ Os resultados na literatura até o momento são divergentes. Enquanto alguns autores têm identificado o DNA do HPV em amostras de câncer colorretal por diferentes técnicas laboratoriais, como a hibridização *in situ* e a PCR, outros falharam em identificar a presença do vírus, mesmo usando as mesmas técnicas de detecção.

Este é o primeiro estudo realizado no Brasil que investiga a relação entre a infecção pelo HPV e o câncer de cólon e reto. Nosso principal achado foi a detecção do vírus em 83,3% das amostras de tecido colorretal dos pacientes com câncer. Em contraste, não houve detecção de DNA viral em nenhum dos pacientes do grupo controle sem neoplasia ($p < 0.001$).

Como pode ser observado na tabela 4, houve diferença significativa na média de idade do grupo câncer (64,1 anos) em comparação à média do grupo controle (52,3 anos). Esta diferença já era esperada no início do estudo, tendo em vista que o câncer colorretal tem uma tendência a aumentar com idade, acometendo principalmente indivíduos com mais de 60 anos.^{1,27} Em contrapartida, algumas das doenças que determinaram a indicação cirúrgica nos pacientes do grupo controle, a exemplo da endometriose colônica e da doença inflamatória, costumam ocorrer preferencialmente em pacientes mais jovens.

A diferença observada nas médias de idade dos grupos, o que inicialmente poderia representar um fator de confusão na interpretação dos dados, na verdade serve para reforçar o resultado obtido de positividade para o HPV nos pacientes com câncer. Esta colocação é sustentada por estudos epidemiológicos que demonstraram uma relação inversa da infecção pelos tipos oncogênicos de HPV com a progressão da idade dos pacientes.^{54, 55}

Em pesquisa realizada no Instituto Ludwig para Pesquisa do Câncer (São Paulo, Brasil) incluiu 1425 mulheres, demonstrou-se através da PCR uma clara

diminuição na positividade para tipos oncogênicos de HPV com o aumento da idade. Houve uma redução de 24.3% de positividade na faixa etária de 18 a 24 anos para apenas 8.7% na faixa etária entre 45 a 60 anos. Este fenômeno parece refletir uma maior resposta imunológica do hospedeiro ao vírus desenvolvida após um tempo prolongado, levando a uma redução nos índices de infecção latente no colo uterino.⁵⁶

Quando nosso estudo foi iniciado, em março de 2004, não havia nenhum outro estudo publicado avaliando a presença do HPV em três grupos diferentes de amostras teciduais: amostras de tecido tumoral, de tecido não neoplásico obtidas do próprio paciente com câncer e amostras não neoplásicas de coletadas de pacientes sem câncer. Em abril de 2005, Bodaghi e colaboradores, do Instituto Nacional do Câncer (NCI-NIH, USA) publicaram estudo com o mesmo desenho por nós proposto.⁴⁶

Nosso estudo, no entanto, tem certas características metodológicas que devem ser ressaltadas. Este é o único estudo no qual todas as amostras a serem analisadas foram coletadas exclusivamente pelos cirurgiões diretamente envolvidos na pesquisa de acordo com um protocolo pré-estabelecido de manipulação dos espécimes cirúrgicos, com objetivo de evitar a contaminação cruzada entre amostras de tecido. Cuidados semelhantes não foram adotados por outros pesquisadores. A maioria dos estudos analisou tecidos conservados em blocos de parafina que foram coletados e manipulados sem cuidados para evitar a potencial contaminação pelo DNA viral. No estudo conduzido por Bodaghi e colaboradores, foram também

avaliados tecidos coletados a fresco na sala de cirurgia. Foram investigados 55 pacientes com câncer colorretal, porém um protocolo de coleta para evitar a contaminação cruzada só foi aplicado aos últimos 10 pacientes incluídos no estudo.⁴⁶

Em nosso trabalho, todas as amostras mostraram-se adequadas para a análise molecular (teste da β -globina humana positivo). Provavelmente obtivemos esta condição por terem sido analisados tecidos frescos que foram prontamente congelados após a coleta. Sabe-se que a degradação do DNA é o problema mais significativo encontrado ao se estudar peças fixadas em parafina .⁵⁷

Neste estudo, foi realizada, pela primeira vez em pacientes com câncer colorretal, a técnica de *auto-nested* PCR. A técnica foi descrita por Remmerbach e cols. que demonstram uma maior sensibilidade com os na detecção do HPV (51 cópias/ μ l) em comparação a PCR *single round* com GP5+/GP6+ (170 cópias/ μ l). Portanto, a *auto-nested* PCR é uma técnica útil para ser utilizada na detecção do HPV em tumores malignos não genitais, nos quais há presença de baixa carga viral.⁵¹

Nosso índice de detecção do HPV nos pacientes com câncer, que foi de 83,3%, está em concordância com resultados relatados por outros autores, que identificaram o HPV em amostras de carcinoma colorretal, com índices variando entre 31 e 84%. A maior prevalência do vírus foi relatada por Cheng e colaboradores, que estudaram espécimes de câncer colorretal obtidas de pacientes chineses, detectando o vírus em 16 de 19 casos estudados.⁶ Diferenças nos índices de detecção

entre os estudos podem ser explicadas por variações no desenho do estudo, tamanho amostral, técnica de coleta de amostras, diferentes métodos de detecção utilizados e mudanças no padrão da infecção pelo HPV de acordo com região geográfica e características étnicas da população analisada. Da mesma forma, acredita-se que a falha na detecção do vírus em tumores colorretais, relatada por uns alguns autores no início da década de 1990, seja resultado de diferenças técnicas no método de investigação empregado ou de tamanho amostral reduzido.

Em nosso estudo, nos pacientes com câncer, observou-se uma tendência de detecção do vírus mais comumente no tecido tumoral do que na amostra correspondente de tecido colorretal sem câncer. A ausência de diferença nestes índices de detecção do HPV entre os dois tipos de amostra provavelmente reflete o tamanho amostral deste estudo, podendo ser alterado com a inclusão de um maior número de pacientes.

O DNA viral foi identificado na maioria dos casos de carcinoma. A ausência do HPV nas amostras do grupo controle sem neoplasia sugere fortemente que a presença do vírus nos carcinomas colorretais não seja meramente um achado incidental, mas um potencial co-fator para o desenvolvimento da doença. Além disso, 75% das infecções virais detectadas foram causadas pelos HPVs 16 e 18, que são os tipos virais com papel oncogênico definitivamente estabelecido. À semelhança do achado de Bodaghi e colaboradores, o HPV 16 foi o tipo viral mais freqüente, estando presente em 55% das amostras positivas (33 casos).

A infecção concomitante por mais de um tipo de HPV, observada em 11 pacientes, sugere um possível papel da co-infecções nesta neoplasia. Bachtiry e cols. e van der Graaf e cols., ao estudarem lesões pré-malignas do colo uterino, observaram que a presença de mais de um tipo de HPV, que parece refletir exposição repetida ao vírus, está relacionada a um aumento da chance de progressão das alterações patológicas para a condição de carcinoma invasor.^{58,59}

Em 25% dos casos positivos para o HPV, a infecção não foi causada pelos tipos 16 e 18, mas por outros tipos virais. Este achado provavelmente resulta da já mencionada alta sensibilidade da *auto-nested* PCR, que permite a detecção de um amplo espectro de tipos de HPV, incluindo até novos tipos virais ainda não documentados. Também pode refletir variações regionais no padrão de infecção pelo HPV, que sabidamente é influenciada pela origem étnica e geográfica dos indivíduos investigados. Já foi demonstrado que os países latino-americanos tem maiores incidências de infecção pelo HPV que a Europa e os Estados Unidos da América.³³ Várias características demográficas das áreas em desenvolvimento podem explicar essas diferenças, tais como: baixos índices de nutrição, alta fertilidade, más condições de higiene e acesso limitado aos serviços de saúde. Neste contexto, é possível que a alta incidência da infecção pelo HPV no Brasil possa estar, de alguma forma, contribuindo para a também alta incidência do carcinoma colorretal no país.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação da presença do HPV com a localização do tumor. O vírus teve índices de detecção

semelhantes nos diferentes segmentos do intestino grosso analisados, sugerindo que a infecção colorretal não ocorra por contaminação retrógrada do vírus a partir da região anogenital. Outros autores acharam resultados semelhantes. Em contrapartida, Weinberger e colaboradores relataram que há expressão significativamente maior da proteína E6 do HPV em tumores com localização anatômica mais distal no intestino grosso.⁴⁷

A via hemática de disseminação viral poderia explicar a equidistribuição do vírus nos segmentos dos intestino grosso analisados. A detecção de DNA do HPV em amostras séricas de pacientes com doenças associadas a infecção pelo vírus tem sido descrita. De acordo com a hipótese da “genometástase”, proposta por Garcia-Olmo e Garcia-Olmo em 2001, a transformação maligna pode se desenvolver como resultado de uma “transinfecção” em órgãos alvo por tipos virais oncogênicos dominantes que circulam no plasma e que são derivados de um tecido primariamente alterado (exemplo: colo uterino). Dessa forma, o HPV circulante poderia alcançar órgãos distantes e determinar a transformação maligna daqueles tecidos.⁶⁰ Widschwendter e cols., ao estudarem a infecção pelo HPV no câncer de mama, sugeriram que o DNA do HPV pode ser transportado pela via sanguínea de um tecido originalmente infectado para o tecido mamário, onde o vírus desempenharia um papel no processo de carcinogênese.⁶¹

A presença do HPV não predominou em nenhum estágio do adenocarcinoma na amostra estudada ou em tumores pouco diferenciados. Isso parece indicar que as alterações moleculares causadas pelo HPV não tornam a

neoplasia mais agressiva. Como já sugerido por Cheng e cols, as alterações causadas pelo DNA do HPV não parecem estar envolvidas na invasão tumoral ou na disseminação metastática.⁶ Outros autores também falharam em demonstrar a relação da presença do HPV com fatores prognósticos do câncer colorretal. Em contraste, estudos em pacientes com câncer de pulmão e de cabeça e pescoço demonstraram que infecção pelo HPV está associada a tumores em estádios mais precoces e com melhor prognóstico.⁶²

Em resumo, neste estudo nós apresentamos evidência da associação entre a infecção pelo HPV e o câncer colorretal. Nossos achados podem potencialmente representar uma importante mudança na atual compreensão da biologia desta freqüente neoplasia, abrindo novas perspectivas diagnósticas e terapêuticas para pacientes com a doença.

7.CONCLUSÕES

7.1. Conclusão geral

O HPV está presente no cólon e reto de pacientes com adenocarcinoma colorretal estudados.

7.2. Conclusões específicas

1. O HPV não está presente no cólon e reto de pacientes sem carcinoma colorretal estudados.
2. Não existe associação significativa entre a presença do HPV e a idade dos pacientes com carcinoma de colorretal estudados.
3. Não existe associação entre a presença do HPV e o sexo dos pacientes com carcinoma de cólon e reto estudados.
4. Não existe associação entre a presença do HPV e a localização anatômica dos tumores colorretais estudados.
5. Não existe associação entre a presença do HPV e o estadiamento dos tumores estudados.

6. PERSPECTIVAS

A partir deste estudo surgiram novas perspectivas para a ampliação da investigação do papel do HPV na carcinogênese colorretal. Neste sentido, novos projetos de pesquisa estão sendo preparados, devendo, mais uma vez contar com a participação do Serviço de Coloproctologia do HCPA e do Laboratório de Biologia Molecular da FFFCMPA. São eles:

- 1) Pesquisa das alterações nos genes p53 e pRB em carcinomas colorretais positivos para a presença do HPV.
- 2) Pesquisa do HPV na região anogenital e no sangue de pacientes com carcinomas colorretais positivos para a presença do HPV.
- 3) Pesquisa do HPV em metástases de adenocarcinoma e cólon e reto.
- 4) Estudo do papel carcinogênico do HPV em cultura de células colorretais.
- 5) Impacto da vacinação para tipos específicos de HPV na prevalência do câncer de cólon e reto.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0 IARC Cancer Data Base N°5. Lyon: IARCPress; 2001.
2. Allen JI. Molecular biology of colorectal cancer: a clinician's review. *Perspect Colon and Rectal Surg* 1995; 8:181-202.
3. Lynch HT, Lynch JF. Genetics of colonic cancer. *Digestion* 1998; 59: 481-92.
4. Kirgan D, Manalo P, Hall M, McGregor B. Association of human papillomavirus and colon neoplasm. *Arch Surg* 1990; 125: 862-5.
5. McGregor B, Byrne P, Kirgan D, *et al.* Confirmation of the association of human papillomavirus with human colon cancer. *Am J Surg* 1993; 166:738-42.
6. Cheng JY, Sheu LF, Meng CL, Lee WH, Lin JC. Detection of human papillomavirus DNA in colorectal carcinomas by polymerase chain reaction. *Gut* 1995; 37: 87-90.
7. Lee YM, Leu SY, Chiang H, Fung CP, , Liu WT. Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34: 87-91.
8. Perez LO, Abba MC, Languens RM, Golijow CD. Analysis of adenocarcinomas of the colon and rectum: detection of human papillomavirus (HPV) DNA by polymerase chain reaction. *Colorectal Dis* 2005; 492-5.
9. Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000; 19:1-5.

10. Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, *et al.* Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *N Engl J Med* 1997; 337: 1350-8.
11. Prado JC, Calleja_Macias IE, Bernard HU, *et al.* Worldwide genomic diversity of the human papillomavirus-53, 56, and 66, a group of high-risks HPVs unrelated to HPV-16 and 18. *Virology* 2005; 340: 95-104.
12. IARC. Human papillomaviruses. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vol. 64. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1995.
13. Farthing AJ, Vousden KH. Functions of human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Trends in Microbiol* 1994; 2: 170-4.
14. zur Hausen H, de Villiers EM. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 427-47.
15. Sisk EA, Robertson ES. Clinical implications human papillomavirus infection. *Front Biosci* 2002; 7: 77-84.
16. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
17. Damin AS, Rachid K, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre COP. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 84: 131-37.
18. Syrjanen KJ. HPV infections and esophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 721-28.
19. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 709-20.

20. Lopez-Beltran A, Escudero AI, Carrasco-Aznar JC, Vicioso-Recio L. Human papillomavirus infection and transitional cell carcinoma of the bladder. Immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 154-9.
21. Sha KV, Daniel RW, Simon JW, Vogelstein B. Investigation of colon cancers for human papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction. *J Surg Oncol* 1992; 51: 5-7.
22. Shroyer KR, Kim JG, Manos MM, *et al.* Papillomavirus found in anorectal squamous carcinoma, not in colon adenocarcinoma. *Arch Surg* 1992; 127: 741-4.
23. Rossi B e cols. Câncer de Cólon e Ânus. São Paulo: Lemar e TECmedd Editora, 2004.
24. Parkin DM, Muir CS: Cancer incidence in five continents: comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* 1992; 120: 45–173.
25. Ministério da Saúde: Incidence and Mortality in Brazil. Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde, Brasília, 2004.
26. Pinho M,. *Biologia Molecular do Câncer – Fundamentos para a Prática Médica*. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter LTDA, 2005.
27. Corman ML. *Colon and Rectal Surgery*. Philadelphia, PA: Quality Medical Publishing 2005.
28. Gordon PH, Nivatvongs S. *Principles and practice of surgery for the colon, rectum and anus*. St Louis: Quality Medical Publishing 1999.
29. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
30. Howley PM. Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res.* 1991 Sep 15;51(18 suppl):5019s-5022s

31. Papilomavirus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. Revista Brasileira de Cancerologia 2005; 51(2):156.
32. Burd EM., 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin. Microbiol. Rev.16 (1), 1-17
33. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Virology 2004; 324:17-27
34. Syrjanen S, Puranen M. Human papillomavirus infections in children: the potencial role of maternal transmission. CritRev Oral Biol. Med 200; 11(2):259-74.
35. Ferenczy A, Jenson AB. Efeitos teciduais e resposta do hospedeiro. In : HPV. Attila T. Lörincz, Richard Reid, eds. trad: Deniza Omena Futuro. Interlivros Edições Ltda. Rio de Janeiro 1997:171.
36. Iftner T, Villa LL. Human Papillomavirus Technologies. Journal of the National Cancer Institute Monographs 2003, nº.31: 80-8.
37. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Fundamentos da Biologia Molecular Celular. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999.
38. Molijn A., Kleter B., Quint W., van Doorn L. Molecular diagnosis of human papilloma (HPV) infections. Journal of Clinical Virology 32S (2005) S43-S51.
39. Tjalma WAA, Van Waes TR, Van den Eeden LEM, Borges JJPM. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology vol. 19, No 4, pp. 469-483, 2005.
40. Rous P, Beard JW. J Exp Méd 62: 523-548,1935.

41. Nam Hoon Cho, Young Tae Kim, and Jae WooK Kim. Alteration of Cell Cycle in Cervical Tumor Associated with Human Papillomavirus – Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors-. *Yonsei Medical Journal*. Vol.43, No6, pp. 722-728, 2002.
42. Sisk EA, Robertson ES. Clinical implications of human papillomavirus infection. *Front Biosci* 2002; 7: e77-84.
43. Farthing AJ, Vousden KH. Functions of human papillomavirus E6 e E7 oncoproteins. *Trends in Microbiology* 2: 170-174, 1994.
44. Schiffmann MH, Briton LA, Devesa SS et al. Cervical Cancer. In: *Cancer epidemiology and prevention*. Schottenfeld and JF Fraumeni Jr, Eds. Oxford University Press, New York 1996:1090-1116.
45. Cheng JY, Meng CL, Chao CF et al. Human papillomaviruses type- related DNA and c-myc oncogene alterations in colon cancer cell lines. *Dis Colon Rectum* 1991;34: 469-474.
46. Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao SY, da Costa M, Palefski JM, Zheng ZM. Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2862-7.
47. Weinberger, P.M., Yu, Z., ZerKowski, M., Chung, G. A Possible association of Human Papilloma Virus With a Subset of Colorectal Adenocarcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post- Meeting Edition); Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004: 3544.
48. Boguszakova L, Hirsch I, Brichacek B, Faltyn J, Fric P Dvorakova H, Vonka V. Absence of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and papillomavirus DNA from adenoma and adenocarcinoma of the colon. *Acta Virol* 1998 Jul; 32(4):303-8

49. American Joint Committee on Cancer (AJCC): Manual for Staging of Cancer, 3rd ed. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1988.
50. Jacobs MV, Roda Husman AM, Brule ACJVD, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 901-5.
51. Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kühndel K, Liebert UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primers sets. *J Clin Virol* 2004; 30: 302-8.
52. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-97.
53. Nuovo GJ, Darfler MM, Impraim CC, Bromley SE: Occurrence of multiple types of human papillomavirus in genital tract lesions. Analysis by *in situ* hybridization and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1991; 138: 53-8.
54. Rosseau MC, Franco EL, Villa LL, *et al.* A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2000; 9: 469–76.
55. Parkin DM, Muir CS: Cancer incidence in five continents: comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* 1992; 120: 45–173.
56. Villa LL, Sichero L, Rahal P, et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol* 2000;81: 2959–68.
57. Mies C, Houldsworth J, Chaganti RS. Extraction of DNA from paraffin blocks for Southern blot analysis. *Am J Surg Pathol.* 1991 Feb;15(2):169-74.

58. van der Graaf Y, Molijn AC, Doornewaard H, Quint WGV, van Doom LJ, van den Tweel J. . Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol* 2002; 156(2):158-64.
59. Bachtary B, Obermair A, Dreier B, Bimer P, Breitenecker G, Knocke TH, et al. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer* 2002;102:237-43.
60. Garcia-Olmo D, Garcia-Olmo DC. Functionality of circulating DNA : the hypothesis of genomestasis. *Anm N Y Acad Sci* 2001; 945:265-75.
61. Widschwendter A, Brunhuber T, Wiedemair A, Mueller-Holzner E, Marth C.. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical history. *Journal of Clinical Virology* 31(2004) 292-297.
62. Iwamasa T, Miyagi J, Tshako K, et al. Prognostic implications of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung. *Pathol Res Pract* 2000; 196: 209-218.