

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
NEOPLASIAS COLÔNICAS EM MODELO DE
COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO**

RENATA DE ALMEIDA COUDRY

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação
Antônio Prudente para a obtenção do Grau de
Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Coudry, Renata de Almeida

Avaliação morfológica e molecular de lesões colônicas em modelo de colite experimental induzida por Dextran Sulfato de Sódio
/ Renata de Almeida Coudry -- São Paulo, 2005.

100p.

Tese(doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:

Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. RETOCOLITE ULCERATIVA. 2. NEOPLASIAS COLORECTAL. 3. DEXTRAN SULFATO. 4. CAMUNDONGOS/genética.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria primeiramente de agradecer aos grandes amores da minha vida, **meu marido Daniel e meu filho Lucas**, por estarem ao meu lado todo o tempo nesta fase de dedicação total aos meus estudos. Grandes mudanças foram feitas neste período, um novo país, um novo lar. Posso dizer que valeu a pena pois nos deixou mais unidos e, além do meu conhecimento científico adquirido, ganhamos experiência de vida. Por isso, muito obrigada por todo o esforço que fizeram para se adaptarem a esta grande, se assim podemos chamar, aventura. Obrigada Daniel também por toda sua ajuda na tese, sempre me dando idéias de como deixá-la melhor.

Ao meu orientador, o **Prof. Dr. Fernando Soares**, que tem total responsabilidade por todas estas mudanças. Embora minha especialização fosse em Gineco-Patologia, ele me fez fazer minha tese de mestrado em cólon. Por este específico motivo apareceu a chance de ir para os EUA e fazer minha tese de doutorado na mesma área. O Fernando é alguém por quem tenho grande admiração pois, além de ser um grande profissional, tanto como morfologista quanto como investigador, é uma pessoa de grande visão. Ele está sempre à frente das novidades e da modernidade na Patologia.

Aos meus colegas de trabalho no Hospital do Câncer também vai meu grande agradecimento por todo apoio que me deram no meu novo empreendimento.

Agradeço à **Sra. Ana Maria Kunari**, coordenadora da pós-graduação, por toda ajuda e por sempre ser tão solícita e eficiente em resolver nossas dificuldades e à **Sra. Suely Francisco** e todos os funcionários da biblioteca da Fundação Antônio Prudente pelo suporte bibliográfico.

No Fox Chase Cancer Center (Filadélfia, EUA), lugar onde desenvolvi minha pesquisa, gostaria de agradecer ao **Dr. Harry Cooper**, um grande Patologista, que me recebeu em seu laboratório de braços abertos e me proporcionou adquirir experiência em Patologia Gastrointestinal,

principalmente em tumores do cólon, sendo um grande especialista nesta área e um entusiasta em desvendar os processos que regem o desenvolvimento deste câncer. À **Dra. Margie Clapper**, em cujo laboratório fiz grande parte dos meus experimentos. Seu intenso conhecimento na área de colite e quimio-prevenção foi de grande ajuda para desenvolver meu trabalho. À futura **Dra. Monique Gary** por toda sua ajuda com o cuidado dos animais usados neste trabalho e também por sua amizade. À **Dra. Cinthia Spittle e a Sra. Rita Michelli** pela imensa ajuda nas técnicas moleculares que foram utilizadas na tese. À **Dra. Wen-Chi Chang** pelo trabalho em conjunto com os animais geneticamente alterados usados na tese. Um agradecimento muito especial para a **Dra. Sibeles Meireles** que, além de amiga, é uma grande companheira de trabalho. Obrigada por ler minha tese, pelos seus comentários sempre pertinentes e excelentes idéias. Ao **Sr. Gerard Caprio** por seus dons de professor, os quais abriram-me as portas para o mundo da bancada. À **Sra. Mauren Climaldi** por toda sua assistência e por ser esta pessoa tão bondosa.

Gostaria de agradecer **minha mãe Laura e meu pai Jorge** por me darem a chance de prosseguir com meu sonho de ser médica e de estarem sempre presentes quando preciso. Aos meus irmãos, minhas cunhadas, sobrinhos e aos meus tios e primos pela atenção e carinho.

Agradeço com grande carinho a **Sra. Elivânia Aparecida de Sousa**, uma amiga presente em vários momentos de nossas vidas e que sempre tanto me ajudou.

Um agradecimento profundo para **Cida Coudry** e todos os demais membros da **família Coudry**, por todo apoio e torcida em todos os nossos projetos de vida e principalmente neste último que tem sido difícil para nós, pois tivemos que nos privar da companhia de todos vocês.

Agadeço imensamente aos membros da **Fundação AHEPA** (The American Hellenic Educational Progressive Association) que me proporcionaram uma bolsa para desenvolver meus estudos.

Obrigada **Jesus e Nossa Senhora da Aparecida** pela proteção constante.

RESUMO

Coudry R. **Avaliação morfológica e molecular de lesões colônicas em modelo de colite experimental induzida por Dextran Sulfato de Sódio (DSS)**. São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A retocolite ulcerativa (RU) é uma doença inflamatória crônica que caracteristicamente afeta o reto e o intestino grosso e cuja etiologia ainda é desconhecida. Os pacientes portadores de RU apresentam um alto risco para o desenvolvimento de câncer colorretal (CCR). O desenvolvimento e a progressão do câncer associado à RU envolvem vários eventos genéticos que parecem ser diferentes dos observados nos cânceres esporádicos. Alterações nos genes Apc e K-ras são menos freqüentes em tumores associados à RU. O gene TP53 está freqüentemente alterado nos tumores esporádicos, mas quando relacionados aos tumores incidindo em pacientes com RU este tende a ser um evento precoce ao invés de tardio como ocorre naqueles tumores. O gene β -catenina não se mostra alterado nos tumores esporádicos ou relacionados à RU, mas a translocação de β -catenina para o núcleo das células neoplásicas é um evento comum nos dois tipos de tumores. O modelo utilizando camundongos para desenvolver colite, através do uso de DSS desenvolve displasia e câncer muito similares aos observados em humanos. O estudo da carcinogênese do cólon nestes camundongos pode ser de grande valia para o melhor entendimento das alterações que ocorrem em humanos e pode proporcionar o descobrimento de novos marcadores ou mesmo regimes quimiopreventivos para o câncer relacionado à RU. O objetivo deste estudo é elucidar os eventos moleculares das neoplasias relacionadas à RU no modelo experimental animal de colite induzida por DSS, traçando um paralelo com os estudos moleculares realizados em humanos. Para isto, foram utilizadas duas abordagens. A primeira, relacionada com a pesquisa de alterações moleculares nas neoplasias originadas no modelo de colite pelo uso de DSS e Azoximetano

(AOM) em camundongos saudáveis, onde foram avaliados os genes Trp53, k-ras, Apc e β -catenina. A segunda, relacionada com o uso de DSS em camundongos alterados geneticamente para o gene Trp53, considerado o evento inicial nos tumores associados à RU. Neste objetivo além da pesquisa da mutação do gene k-ras também foram avaliados os aspectos histológicos das lesões colônicas oriundas neste modelo. Nos camundongos saudáveis em uso de DSS/AOM, foram observadas mutações no gene β -catenina (códon 32 e 34) e a translocação desta proteína para o núcleo das células tumorais. Não foram observadas mutações no gene K-ras, Trp53 e a pesquisa de LOH do gene Apc não foi informativa. Nos camundongos geneticamente alterados para o gene Trp53 a pesquisa de mutação no gene k-ras foi negativa. Estes camundongos demonstraram a presença de displasia e câncer, também muito similares aos humanos, sendo que os animais homocigotos (p53^{-/-}) apresentaram uma maior incidência de lesões quando comparados aos animais heterocigotos (p53^{+/-}) e controles p53 (+/+). Além de displasia e câncer os camundongos p53^{-/-} e p53^{+/-} apresentaram lesões benignas denominadas colite cística profunda e lesões hiperplásicas, ambas associadas à RU em humanos. O acúmulo de dados decorrentes de estudos usando o modelo animal de colite induzida quimicamente deve fornecer informações valiosas para o melhor entendimento da carcinogênese do cólon em pacientes portadores da RU.

SUMMARY

Coudry R. [**Morphological and molecular evaluation of colonic lesions in a mouse model of experimental colitis induced by Dextran Sulfate Sodium (DSS)**]. São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Ulcerative Colitis (UC) is a diffuse inflammatory disease of the colorectum, which etiology is unknown. UC patients are at increased risk of developing colorectal cancer (CRC). Development and progression of UC-associated to CRC involves multiple genetic alterations that appear to be different from those of sporadic cancer. Alterations of APC gene and k-ras gene are less frequent than in sporadic colorectal neoplasia. Although, alterations of TP53 gene is a frequently observed in both UC associated tumors and sporadic tumors, this alteration is an early event in UC related tumors but it occurs late in sporadic tumors. Dextran Sulfate Sodium (DSS) mouse colitis model develop dysplasia and cancer similar to UC in human. Studies of colon carcinogenesis in this model can be very useful to elucidate mechanisms and provide development of markers or chemoprevention approaches in the human situation. The aim of this study is to establish the molecular events in a DSS mouse colitis model associated neoplasia in parallel with the molecular alterations seen in humans. Two different approaches had been used to achieve this goal. First, investigate molecular events in neoplastic lesions developed in a mouse model of colitis using DSS in combination with Azoxymethane (AOM) in healthy animals. In this approach, it was investigate genes, such as Trp53, k-ras, β -catenin and Apc. Second, evaluate genetic events in mice deficient in the Trp53 gene, considered an early event in RU-associated tumors. Besides k-ras evaluation, it was also evaluated the histological aspects of the colonic lesions in this model. β -catenin mutation (codons 32 and 34) and translocation β -catenin were observed in healthy animals using DSS/AOM. No mutation of k-ras and Apc were observed and

Apc LOH was not informative. DSS induced colitis in p53 deficient mice developed dysplasia and cancer. p53^{-/-} (homozygous) showed a higher incidence of tumors when compared with p53^{+/-} (heterozygous) and p53^{+/+} (wild-type) animals. No mutation of k-ras gene was observed. Besides dysplasia and cancer, p53^{-/-} and p53^{+/-} animals developed colite cystica profunda and hyperplastic lesions, both observed in patients with UC.

The further accumulation of data originated in studies with mouse models of colitis related-neoplasia chemically-induced should provide information for better understand UC- related colorectal neoplasia in humans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema simplificado da via de sinalização Wnt.	70
Figura 2	Carcinogênese colorretal nos tumores esporádicos e associados à RU.	71
Figura 3	Esquema de indução de colite nos animais SW e p53.	72
Figura 4	Representação do procedimento de LCM.	73
Figura 5	Estudo imunohistoquímico: proteínas p53 e β -catenina em modelo de colite induzida por DSS/AOM.	74
Figura 6	Seqüências representando mutação do gene β -catenina em modelo de colite induzida por DSS/AOM.	75
Figura 7	Processo inflamatório envolvendo a mucosa intestinal dos camundongos deficientes para o gene Trp53 tratados com DSS.	76
Figura 8	Classificação de displasia em camundongos deficientes para o gene Trp53 com o uso de DSS.	77
Figura 9	Câncer em camundongos deficientes para gene Trp53 tratados com DSS.	78
Figura 10	Câncer mucinoso nos animais deficientes para o gene Trp53 tratados com DSS.	79

- Figura 11** Colite cística profunda em camundongos deficientes para o gene Trp53 tratados com DSS. 80
- Figura 12** Hiperplasia da mucosa intestinal dos animais deficientes para o gene Trp53 tratados com DSS. 81
- Figura 13** Pseudoinvasão em animais deficientes para o gene Trp53 e controles tratados com DSS. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Incidência do câncer colorretal (CCR) por categoria de risco.	67
Tabela 2	Fatores associados com o risco do CCR em pacientes portadores da RU.	67
Tabela 3	Sequência dos iniciadores de amplificação para k-ras, β -catenina e Trp53.	68
Tabela 4	Mutação do gene β -catenina em lesões colônicas em modelo de colite induzida por DSS/AOM.	68
Tabela 5	Alterações nos exons 6 e7 do gene Trp53 em animal SW.	69
Tabela 6	Distribuição dos tumores colônicos em animais p53, tratados com DSS.	69
Tabela 7	Lesões não neoplásicas em animais p53, tratados com DSS.	69

LISTA DE ABREVIATURAS

BAX	do inglês "BCL2-associated X protein"
GADD45	do inglês "Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha"
GSK3β	do inglês "Phosphorylation Syntase Kinase 3 β "
IGF2R	do inglês "Insulina Growth Factor Receptor 2"
IL-2	do inglês "Interleucin 2"
IL-10	do inglês "Interleucin 10"
K-ras	do inglês "Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene, homolog"
Mdm2	do inglês "Transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein"
MLH1	do inglês "MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2"
MSH2	do inglês "MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1"
Tcf	do inglês "T-cell Trancription Factor"
TGFβRII	do inglês "Trasforming Growth Factor β -Receptor type II"

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Retocolite Ulcerativa	1
1.1.1	Patogênese molecular do câncer colorretal esporádico	5
1.1.1.1	Via de sinalização Wnt	6
1.1.1.2	Gene K-ras	8
1.1.1.3	Gene TP53	8
1.1.1.4	Instabilidade cromossômica	12
1.1.1.5	Instabilidade de microssatélites	12
1.1.2	Patologia molecular do câncer colorretal associado à RU	13
1.1.2.1	Via de sinalização Wnt	14
1.1.2.2	Gene TP53	15
1.1.2.3	Gene K-ras	16
1.1.2.4	MSI	16
1.1.2.5	CIN	17
1.1.2.6	O papel dos RONS na carcinogênese colorretal associado à RU	18
1.1.3	Tipos de lesões precursoras do carcinoma colorretal associado à RU	19
1.1.3.1	Macroscopia	19
1.1.3.2	Microscopia	21
1.1.3.3	Diferenças moleculares: DALMS vs displasias planas	23
1.1.4	Carcinomas na RU	24
1.1.5	Lesões colônicas não neoplásicas em pacientes com RU	25
1.1.5.1	Hiperplasia	25
1.1.5.2	Colite cística profunda	25
1.1.6	Modelos animais para o estudo da inflamação colônica relacionados ao CCR	26
1.1.6.1	Dextan Sulfato de Sódio (DSS) em animais saudáveis	27
1.1.6.2	DSS em animais modificados geneticamente	29
1.1.6.3	Animais com tendências para o desenvolvimento de inflamação	31

2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivos gerais	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	MATERIAL E MÉTODO	37
4.1	Animais e indução de colite	37
4.1.1	Experimento com animais Swiss Webster (SW)	37
4.1.2	Experimento com animais alterados para o gene Trp53	38
4.2	Avaliação histopatológica das lesões colônicas	39
4.3	Captura de células usando microdissecção a laser (LCM) e isolamento do DNA	41
4.4	Estudo imunohistoquímico das proteínas p53 e β -catenina	43
4.5	Avaliação de mutação no gene k-ras	44
4.6	Avaliação de mutação no gene β -catenina	46
4.7	Avaliação de mutação no gene Trp53	47
4.8	Avaliação de LOH no gene APC	47
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
6	RESULTADOS	51
6.1	Modelo de colite utilizando os animais SWs	51
6.1.1	Expressão das proteínas p53 e β -catenina	51
6.1.2	Mutação dos genes K-ras (exon 1), β -catenina (exon 3) e Trp53 (exons 5-8)	51
6.1.3	LOH do gene Apc	53
6.1.4	Comparação dos achados moleculares entre as displasias planas e DALMs	53
6.2	Modelo de colite utilizando animais alterados geneticamente para o gene p53	54
6.2.1	Achados histopatológicos	54

7	DISCUSSÃO	57
8	CONCLUSÃO	66
9	TABELAS E FIGURAS	67
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 RETOCOLITE ULCERATIVA

A retocolite ulcerativa (RU) é uma doença inflamatória crônica que caracteristicamente afeta o reto e o intestino grosso e cuja etiologia ainda é desconhecida. Pacientes portadores de RU apresentam um alto risco para o desenvolvimento de câncer gastrointestinal, particularmente do adenocarcinoma colorretal. O primeiro caso de câncer colorretal ocorrendo em um paciente com diagnóstico de RU foi descrito em 1925 por CROHN e ROSENBERG. De fato a RU se apresenta entre as três condições com maior risco de desenvolvimento de câncer colorretal, estando junto com a Adenomatose Poliposa Familiar (FAP) e o Câncer Colorretal Hereditário Sem-Polipose (HNPCC), sendo estas as duas mais importantes formas de câncer colônico hereditário (LYNCH e DE LA CHAPELLE 2003). A **Tabela 1** relaciona os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer colorretal.

O câncer em pacientes com colite tende a se desenvolver 10 anos mais cedo do que na população em geral (GRANQVIST 1981; PAPTODORIDIS et al. 1996). O risco do desenvolvimento do câncer em paciente com RU está principalmente relacionado com a duração e a extensão da doença. A maioria das neoplasias malignas se desenvolve oito anos após a presença da colite. A incidência acumulada é abaixo de 1% nos primeiros 8 a 10 anos, mas após isso se observa um aumento anual de 0.5%

a 1% (GYDE et al. 1982; LENNARD-JONES 1985). Comparado com casos controles, aproximadamente 5 a 10% dos pacientes com RU desenvolvem câncer colorretal depois de 20 anos e 15 a 20% após 30 anos do diagnóstico inicial (EKBOM et al. 1990b; HARPAZ e TALBOT 1996). Após 40 anos da presença da doença, 25-40% dos pacientes que não tiveram uma colectomia profilática vão desenvolver câncer colorretal (EKBOM et al. 1990a). Quanto maior a superfície envolvida pela colite maior o risco no desenvolvimento do câncer. Assim sendo, estudos utilizando enema opaco e/ou colonoscopia mostraram que o risco do desenvolvimento de um adenocarcinoma é 20 a 30 vezes maior em indivíduos apresentando pancolite com mais de 10 anos de duração da doença que o risco observado nos casos controles (EKBOM et al. 1990b; LANGHOLZ et al. 1992).

Um estudo recente demonstrou que a severidade da inflamação no decorrer do curso da doença também é um fator de risco para o desenvolvimento do câncer colorretal (RUTTER et al. 2004). Apesar desta nunca antes ter sido mostrada como um fator de risco, esta evidência pode ser sustentada por alguns fatores. Primeiro pelo fato da duração da doença ser um importante fator de risco nos pacientes com RU. Segundo, os estudos mostram que estes pacientes, quando em uso de antiinflamatórios, demonstram uma diminuição no risco do desenvolvimento do carcinoma colorretal (PINCZOWSKI et al. 1994; MOODY et al. 1996; EADEN et al. 2000). Terceiro, o risco do câncer colorretal é muito maior em pacientes com RU portadores da Colangite Esclerosante Primária (EKBOM et al. 1990b; BRETNALL et al. 1996). A Colangite Esclerosante Primária é uma

condição idiopática caracterizada pela inflamação crônica dos ductos biliares que predispõe não somente ao câncer colorretal assim como ao câncer dos ductos biliares. Este fator de risco pode não ter sido óbvio até o momento devido a indicação de colectomia precoce que ocorre na maioria dos pacientes que apresentam uma inflamação mais severa, pois estes não respondem adequadamente ao tratamento. Por este motivo não estão mais em risco de desenvolverem câncer colorretal.

Embora alguns autores tenham descrito que a variabilidade genética possa ser responsável pelo risco do desenvolvimento do câncer colorretal em pacientes com colite (RHODES 1996; ASKLING et al. 2001b), um novo estudo mostrou que parentes de primeiro grau de pacientes portadores da RU não demonstram um risco aumentado (ASKLING et al. 2001a).

Início precoce da doença também foi descrito como um fator de risco por alguns autores mas contestado por outros, desta forma não apresentando evidências suficientes para uma mudança na conduta de rastreamento destes pacientes (GREENSTEIN et al. 1979; PRIOR et al. 1982; LENNARD-JONES 1985; EKBOM et al. 1990b; EADEN et al. 2001).

O critério usado para se iniciar o rastreamento do câncer colorretal e a frequência do acompanhamento dos pacientes portadores da RU pode variar em diferentes centros. Segundo um consenso apresentado no *workshop* intitulado “Colon Cancer in IBD: Science and Surveillance” no estado da Florida (EUA) em 2000, este rastreamento deve se iniciar após 8 a 10 anos do início dos sintomas e o intervalo de seguimento deve ser de 1 a 2 anos (ITZKOWITZ e PRESENT 2005). Apesar dos dados mostrarem que

o rastreamento e o acompanhamento realizado até o momento são aspectos que protegem contra o desenvolvimento do carcinoma colorretal estes exames não são suficientes para a detecção de todos os cânceres que desenvolvem em pacientes com RU (CONNELL et al. 1994; SHANAHAN 1995). Por este motivo um melhor entendimento das bases moleculares do câncer colorretal associado à RU pode ser de grande valia para o desenvolvimento de um programa de rastreamento e acompanhamento mais efetivo. Um sumário dos fatores que aumentam e diminuem o risco de desenvolvimento do câncer colorretal em pacientes portadores da RU está relacionado na **Tabela 2**.

É de conhecimento dos clínicos e investigadores que o câncer colorretal associado à RU se inicia ao longo de uma via com múltiplos passos e cuja lesão precursora é denominada displasia (HARPAZ e TALBOT 1996). A displasia é caracterizada por alterações neoplásicas restritas ao epitélio colônico e confinada pela membrana basal que circunda as glândulas na qual a lesão se manifesta. A observação de que a displasia é freqüentemente observada adjacente ao carcinoma é um fator que sustenta a evolução da displasia para o carcinoma colorretal em pacientes com RU (WEBB et al. 1991; CONNELL et al. 1994). Além de ser considerada uma lesão precursora, a displasia também é vista como um marcador do câncer colorretal. Algumas publicações mostraram que esta lesão também pode ser observada simultaneamente em outras áreas do cólon em um paciente com câncer colorretal e, assim sendo, ela funcionaria como um sinal da presença deste (RANSOHOFF et al. 1985; CONNELL et al.

1994). Para melhor entender as bases moleculares que levam à formação do câncer nos pacientes com RU, tentou-se traçar uma idéia paralela ao que ocorre nos carcinomas esporádicos, neoplasia colônica que ocorre na população em geral, e investigar as mesmas etapas de progressão. O câncer colorretal esporádico é provavelmente a neoplasia mais bem conhecida no homem. Histologicamente, ele progride de maneira seqüencial tendo sido originalmente chamada por FEARON e VOLGESTEIN (1990) como a seqüência adenoma-carcinoma.

A patogênese molecular da RU relacionada com o câncer colorretal parece ser um processo complexo, mas é muito importante que se aprofunde nos conhecimentos da carcinogênese do cólon nesta doença para que melhores sistemas de detecção sejam incrementados e que se produzam regimentos quimioterápicos mais eficientes.

1.1.1 Patogênese Molecular do câncer colorretal esporádico

Acredita-se que o desenvolvimento do câncer colorretal siga vários passos, sendo estes representados por mutações ou alterações epigenéticas (metilação) que resultam na ativação de um oncogene ou inativação de um gene supressor de tumor e/ou devido a uma instabilidade genômica. Esta última é identificada no câncer colorretal como instabilidade cromossômica (CIN), referindo-se à perda ou ganho de regiões nos cromossomos e como instabilidade de microssatélites (MSI), que ocorre em consequência da inativação de genes relacionados ao sistema de reparo do DNA (GRADY 2004). Cada evento altera o comportamento de resposta

fisiológica da célula e provoca uma vantagem na proliferação destas. Com o acúmulo destes eventos, ocorrem alterações progressivas da proliferação normal para um comportamento neoplásico maligno, caracterizado pelo crescimento autônomo e sem restrição, invasão do tecido adjacente e metástase. Como já demonstrado por vários autores, observa-se uma correlação entre as alterações genéticas e os achados histopatológicos, sendo que o câncer colorretal esporádico segue a seqüência adenoma-carcinoma (MUTO et al. 1975; FEARON e VOGELSTEIN 1990; BODMER 1997).

1.1.1.1 Via de sinalização Wnt

Os genes pertencentes à via de sinalização Wnt que se encontram mais freqüentemente alterados no câncer colorretal esporádico são: o gene da polipose adenomatosa colônica (APC) e o gene β -catenina.

A mutação mais precoce do adenocarcinoma do cólon ocorre no gene supressor de tumor APC. Como se trata de um gene supressor de tumor, de acordo com a hipótese dos dois *hits* de Knudson, a mutação no primeiro alelo deve ser seguida pela inativação do outro alelo decorrente de uma nova mutação ou devido à perda do material cromossomal, denominado perda de heterozigose (LOH) (KNUDSON 1971). Este gene tem um papel importante na proliferação e diferenciação celular, está localizado no braço longo do cromossomo 5 e é encontrado mutado em 60 a 80% dos cânceres colorretais esporádicos (BODMER et al. 1987; POWELL et al. 1992). A mutação germinativa do gene APC é observada na FAP, uma doença

autossômica dominante caracterizada por centenas ou milhares de pólipos adenomatosos no cólon (GRODEN et al. 1991).

O produto do gene APC é uma proteína de 312 kD que consiste de 2843 amino-ácidos, multifuncional e que contem vários domínios que permitem sua interação com outras moléculas (POLAKIS 1997). Uma grande proporção das mutações ocorre entre os códons 1286 e 1513 que compreendem apenas 10% da seqüência codificadora do gene APC e é denominado agrupamento de mutações somáticas (mutation cluster region - MCR). As mutações que ocorrem em células somáticas são quase totalmente mutações truncadas que resultam em perda da função do domínio que segue a MCR. Uma das funções que está relacionada a um dos domínios perdidos devido à mutação é a regulação da degradação da proteína β -catenina. Nas células epiteliais normais do cólon, esta se encontra predominantemente ligada a E-caderina como parte do complexo de adesão entre as células, que está localizado na porção lateral da membrana epitelial. Os níveis citoplasmáticos da β -catenina são regulados pela ligação desta com um complexo de outras proteínas, como por exemplo, APC, GSK-3 β e Axina. Após a ligação a este complexo, a proteína é fosforilada e subseqüentemente degradada pelo proteossoma. Quando o gene APC se encontra inativado, desencadeado por um efeito da sinalização da proteína Wnt ou devido a uma mutação, a proteína β -catenina se transloca da porção lateral da membrana da célula para o núcleo, onde se liga com a proteína Tcf para desencadear a transcrição de vários genes implicados na proliferação celular (KORINEK et al. 1997).

O gene β -catenina se encontra mutado em apenas 10 a 15% dos cânceres colorretais esporádicos (MORIN et al. 1997; SPARKS et al. 1998). Um esquema representando a associação entre proteínas da via de sinalização Wnt é demonstrada na **Figura 1**.

1.1.1.2. Gene K-ras

Cerca de 50% dos tumores colorretais mostram mutação do oncogene K-ras. A família de proteínas Ras está envolvida na transdução de sinais e faz parte de um grande número de moléculas que coordenam a sinalização de eventos celulares que culmina com a proliferação celular. A maioria das mutações que ocorrem no gene k-ras são mutações com ganho de função e estão limitadas aos códons 12 e 13 (BOS 1988). É difícil de concluir precisamente qual o efeito da mutação de k-ras já que esta parece ser multifatorial. Já foi observada em vários estudos a presença da mutação de k-ras no epitélio normal da mucosa do cólon. A presença destas mutações em lesões displásicas só são vistas quando a mutação do gene APC está associada (WHETSELL et al. 1992; CHAUBERT et al. 1994; MINAMOTO et al. 1995). Isto implica que k-ras apenas oferece uma vantagem seletiva para as células que contêm mutação do gene APC.

1.1.1.3 Gene TP53

A perda da função do gene TP53 ocorre de forma tardia na seqüência adenoma-carcinoma e mais provavelmente é observada antes da evolução

para metástase. A mutação do gene parece demarcar a transição de adenoma, que é uma lesão benigna, para um tumor maligno, sendo observada em 70% dos carcinomas colorretais esporádicos (DONEHOWER e BRADLEY 1993).

Este gene está localizado no braço curto do cromossomo 17 e apresenta um grande número de funções com um papel fundamental nas vias de apoptose (EL-DEIRY et al. 1994). Por exemplo, quando ocorre um dano no DNA, a proteína p53 se torna estável e ativa genes como: p21 e GADD45 que causam a parada do ciclo celular em G1 permitindo o reparo do DNA antes que a célula se dirija para fase S. Se o dano for irreparável, p53 media a ativação de genes que resultam na morte da célula. A cada dia novos trabalhos mostram que a ativação do gene TP53 não é apenas decorrente do dano no DNA, mas a outros eventos também são responsáveis por promover a ativação deste. Entre eles podemos citar: genotoxicidade, hipoxia, hiperoxia, citoquinas, fatores de crescimento, estresse oxidativo, alterações metabólicas, contato entre as células, ativação de oncogenes e vários outros fatores (PRIVES e HALL 1999). A proteína Mdm2 controla os níveis de p53 na célula causando sua degradação através do sistema de ubiquitina-proteossoma (HAUPT et al. 1997). Vousden e colaboradores relataram que a mutação do gene TP53 ou a inativação de Mdm2, previnem a interação das duas proteínas resultando na estabilidade de p53 (KUBBUTAT et al. 1997).

Apesar do entendimento dos fatores implicados em sua ativação e repressão estarem se tornando mais conhecidos, o mecanismo pelo qual

TP53 funciona como um gene supressor de tumor ainda continua em plena discussão. Novos estudos demonstraram uma nova visão de qual possa ser o papel de TP53 na formação de tumores. Especificamente, estes novos dados levam a conclusão de que o papel de TP53 na oncogênese estaria mais associado a sua função em regular superexpressão de oncogenes do que seu simples papel na via de regulação de resposta ao dano no DNA (PRIVES e HALL 1999). A via responsável pela regulação de oncogenes como, por exemplo, c-myc e ras está relacionada com a estabilização de p53 pela proteína ARF um produto do gene p14^{ARF} que se liga a proteína Mdm2 e impede a degradação de p53 (POMERANTZ et al. 1998; ZHANG et al. (1998). A perda da função de p53 ou ARF promoveria uma grande vantagem na proliferação celular, pois resultaria na perda de inibidores da atividade dos oncogenes.

O gene TP53, apesar de ser considerado um gene supressor de tumor, não parece seguir o modelo de outros genes desta mesma categoria onde, para a inativação do mesmo, é necessária a presença de mutação em um alelo seguida pela perda do segundo alelo (KNUDSON 1971). Para corroborar este fato, DONEHOWER et al. (1992) descreveram a presença de tumores em camundongos heterozigotos para o gene Trp53 (VENKATACHALAM et al. 1998). Este achado demonstra que o nível da proteína na célula pode ser um fator importante para o desenvolvimento de uma neoplasia. ZHAO et al (2000) mostraram que diferentes níveis da proteína p53 eram seguidos por diferentes sinais de stress e sugeriram que estes níveis seriam responsáveis por diferentes ações em resposta a

ativação de determinados genes (ZHAO et al. 2000). Outro evento que sugere a diferença deste gene em relação aos demais genes supressores de tumor é que estes são inativados por mutações nonsense ou *frameshift* que levam à ausência da síntese de proteína (ou a produção de um produto truncado). Enquanto que, mais de 80% das alterações que ocorrem em TP53 são decorrentes de uma mutação missense que leva à síntese de uma proteína completa (full-length) (SOUSSI e BEROUD 2001). Porém a proteína perde a função de se ligar ao DNA e se acumula no núcleo das células tumorais. SOUSSI e LOZANO (2005) acreditam que este acúmulo possa ter como consequência o papel de um dominante negativo ou um ganho de função da proteína p53 mutante (SOUSSI e LOZANO 2005). Desta maneira, apesar de TP53 na sua forma selvagem ser realmente um gene supressor de tumor, em sua forma mutada se classificaria como um oncogene.

A detecção do acúmulo intracelular da proteína p53 através da técnica de imunohistoquímica em cânceres colorretais como resultado de uma mutação missense é amplamente aceita, sendo que 80 a 90% destes casos apresentam positividade para a proteína p53 (HARRIS e HOLLSTEIN 1993; HANSKI et al. 1996). Este acúmulo pode não ser evidenciado em aproximadamente 10% dos casos e pode ser decorrente da deleção do gene em ambos alelos ou quando ocorre uma mutação que não tem efeito na meia vida da proteína p53 (HARRIS e HOLLSTEIN 1993).

1.1.1.4 Instabilidade Cromossômica

Além das mutações em oncogenes e genes supressores de tumor, alterações cromossomais, na forma de aneuploidia e rearranjo estrutural, também parecem ser fatores importantes na carcinogênese colorretal (GIARETTI 1994; REMVIKOS et al. 1997). Estas alterações tem sido chamadas de instabilidade cromossômica (CIN). Ao contrário das neoplasias hematológicas, nas quais alterações cromossômicas específicas caracterizam uma determinada doença, os cânceres epiteliais são caracterizados por um grande número de alterações cromossômicas, nenhuma das quais parecendo ser específicas (DUTRILLAUX 1995). Tumores colorretais esporádicos são caracterizados por uma alta freqüência de LOH (mais comumente envolvendo os braços dos cromossomos 5q, 8p, 17p e 18q), amplificação de cromossomos e translocações (FEARON 1995). Segundo alguns autores, o gene APC parece contribuir para o processo de CIN (FODDE et al. 2001; SOUSSI e BEROUD 2001). Estes achados apóiam a premissa que CIN é um evento que ocorre após a iniciação do adenoma, mas antes da progressão para um tumor maligno.

1.1.1.5 Instabilidade de Microssatélites

Tumores que ocorrem via CIN/oncogenes e genes supressores de tumor são tipicamente microssatélites estáveis (MSS). Cerca de 15% dos cânceres colorretais esporádicos se iniciam através da via chamada de instabilidade de microssatélites (MSI). A MSI ocorre como consequência da inativação de genes que estão relacionados com o reparo do DNA e é

reconhecida por deleções ou inserções nas pequenas seqüências que aparecem repetidas vezes no genoma e que são chamadas microssatélites. Embora MLH1 e MSH2 sejam os genes mais afetados pela perda de função no câncer colorretal, outros genes também participam do reparo do DNA e podem dar origem a erros de replicação através do genoma. Estes erros afetam preferencialmente genes como: TGF β RII, IGF2R e BAX, os quais contêm microssatélites em sua região codificadora. Assim, a MSI cria um estado favorável para o acúmulo de mutações em genes vulneráveis que controlam atividades biológicas críticas das células e estas alterações podem levar ao desenvolvimento do câncer.

MSI é a marca registrada do HNPCC, pois é encontrada na maioria dos tumores de pacientes portadores desta síndrome. HNPCC é uma doença hereditária autossômica dominante, decorrente da mutação germinativa em genes de reparo do DNA (LYNCH e DE LA CHAPELLE 1999).

1.1.2 Patologia Molecular do câncer colorretal associado à RU

Semelhante ao câncer colorretal esporádico os carcinomas decorrentes da RU são consequência de uma série de eventos genéticos que se correlacionam com aspectos morfológicos. Acredita-se que a seqüência se inicie em um epitélio inflamado, progrida para estágios precursores chamados de displasia (baixo e alto grau) e culmine com o carcinoma (HARPAZ e TALBOT 1996). No intuito de se desenhar um perfil molecular similar ao já bem estudado câncer colorretal esporádico, os

investigadores deram ênfase na avaliação de genes, como por exemplo: TP53, APC, β -catenina e K-ras. Os achados em estudos buscando mutações nos genes citados acima mostram que apesar de tumores relacionados com a RU apresentarem mutação nos mesmos genes, estas se apresentam em proporções e estágios da carcinogênese que diferem daquelas observadas nos tumores esporádicos (BENHATTAR e SARAGA 1995).

1.1.2.1 Via de sinalização Wnt

O gene APC que está freqüentemente mutado nos tumores esporádicos e é considerado um evento inicial na tumorigênese destes, mostra um padrão totalmente diferente na carcinogênese dos tumores relacionados à RU. A perda da função do gene APC é muito menos freqüente nos tumores associados à RU e parece corresponder a um evento tardio. Foi demonstrado nos carcinomas associados à RU que a freqüência de mutação truncada neste gene é em torno de 30% enquanto que nos cânceres esporádicos varia de 60 a 80% (REDSTON et al. 1995; TARMIN et al. 1995). A presença de mutação na mucosa inflamada ou indefinida para displasia não é observada e apenas 14% das displasias apresentam este tipo de mutação (TARMIN et al. 1995; AUST et al. 2002).

Existem poucos estudos relacionando alterações de β -catenina na carcinogênese de tumores associados à RU. Foi observada uma incidência de 30% de LOH ocorrendo na região onde se localiza o gene β -catenina nos carcinomas relacionados à RU e a mesma incidência desta alteração foi

descrita nos carcinomas esporádicos (AUST et al. 2002). Entretanto, a mutação deste gene não foi encontrada em um estudo onde poucos casos de tumores que se desenvolvem em pacientes portadores da RU foram avaliados (SOUZA et al. 1997). AUST et al. (2001) e colaboradores mostraram que a translocação da proteína β -catenina para o núcleo ou citoplasma das células ocorre em 80% dos carcinomas relacionados à RU. Todavia, a mutação do gene β -catenina, no exon 3, não foi observada nestes tumores.

1.1.2.2 Gene TP53

A frequência da mutação do gene TP53 nos tumores colônicos observados na RU varia de 75 a 85%, e são similares aos índices encontrados nos cânceres esporádicos (BURMER et al. 1990; BRETNALL et al. 1994; HARPAZ et al. 1994). Ao contrário do que ocorre nos cânceres colorretais esporádicos, mutação no gene TP53 foi relatada ocorrendo nas lesões regenerativas e displásicas, assim como em carcinomas, mas sem correlação com superexpressão da proteína avaliada por imunohistoquímica (YOSHIDA et al. 2004). Acredita-se que quando a mutação do gene TP53 é um evento inicial, como é o caso em RU, ela possa contribuir para uma vantagem no processo de proliferação celular, enquanto que sua ocorrência em estágios mais tardios, como no câncer esporádico do cólon, ela contribuiria com a conversão de uma neoplasia benigna em um carcinoma (BRETNALL et al. 1994). A maioria das mutações estão localizadas no

exon 8, mas são também observadas nos exons 5 a 7 (HOLZMANN et al. 1998).

1.1.2.3 Gene K-ras

O gene k-ras, freqüentemente alterado no carcinoma colorretal esporádico, apresenta uma atuação bastante contraditória na carcinogênese relacionada à RU. Embora vários estudos tenham mostrado que a freqüência de mutação neste gene é baixa e pode variar de 0-15% (BURMER et al. 1990; MELTZER et al. 1990; CHAUBERT et al. 1994, KERN et al. 1994) observaram uma freqüência de 50% que é comparada à observada em tumores esporádicos. Um estudo mais recente mostrou que apenas 3% das mutações do gene K-ras ocorrem em lesões displásicas e regenerativas e que 40% destas ocorrem no câncer associado a RU (HOLZMANN et al. 1998). Similarmente ao que ocorre com o gene TP53 em tumores relacionados à RU e tumores esporádicos, este evento ocorre em fases diferentes da carcinogênese. O gene K-ras, que tem um papel no aumento do grau de atipia e tamanho dos adenomas durante a tumorigênese dos cânceres esporádicos, na RU parece ocorrer na evolução de uma lesão displásica para o carcinoma.

1.1.2.4 MSI

Tendo em vista que os tumores esporádicos que apresentam mutação no gene APC não demonstram grandes semelhanças aos tumores

associados à RU, se desenvolveu um interesse em se comparar estes últimos com tumores procedentes da via de carcinogênese relacionada com os genes de reparo. Além disso, alguns investigadores relataram a associação de certos polimorfismos em genes como MSH2 e MLH1, com pacientes portadores de RU (BRETNALL et al. 1995; POKORNY et al. 1997). A comparação entre os estudos realizados até o momento é complicada e isso se deve à vasta diferença entre as técnicas e os loci que foram escolhidos para se avaliar a presença de MSI. Apesar disso, a maioria dos estudos demonstraram que uma pequena porção dos cânceres está associada a MSI e esta frequência varia de 2% a 9% (SUZUKI et al. 1994; NOFFSINGER et al. 1999; WILLENBUCHER et al. 1999; FLEISHER et al. 2000). Nenhuma associação foi demonstrada entre pacientes com RU portadores de polimorfismos em genes de reparo do DNA e MSI nos tumores correspondentes (SUZUKI et al. 1994). Apesar da presença de MSI nas lesões displásicas e cânceres associados à RU não ser habitual, já foi demonstrado MSI na mucosa inflamada de pacientes portadores da doença (NOFFSINGER et al. 1999). Estes autores sugerem que este efeito seja decorrente de uma saturação do sistema de reparo do DNA que se encontra assoberbado pelos danos causados pela inflamação na mucosa, mais do que um evento que traga alguma vantagem na proliferação celular.

1.1.2.5 CIN

A seqüência de aquisição de aneuploidia cromossomal na carcinogênese do carcinoma colorretal associado à RU não é totalmente

esclarecida. A maioria dos estudos realizados até o momento demonstrou que a instabilidade genômica observada nos tumores relacionados à colite é a mesma que a observada nos tumores esporádicos (KERN et al. 1994; AUST et al. 2000; HABERMANN et al. 2003).

1.1.2.6 O papel dos RONS na carcinogênese colorretal associado à RU

Em adição as alterações responsáveis pela carcinogênese colorretal associada à RU, acima mencionados, vários genes associados à inflamação também parecem colaborar com o desenvolvimento dos tumores. Estudos demonstraram que os produtos dos genes ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico (NO) e sintase do óxido nítrico-2 (NOS-2) estão elevados na mucosa inflamada de pacientes com RU e persistem elevados nas neoplasias colônicas (HUSSAIN et al. 2000). A colite, que é desencadeada por um mecanismo ainda não esclarecido, gera espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) através das células inflamatórias. Os RONS têm o potencial de afetar um grande número de processos metabólicos, pois seus alvos incluem o DNA, RNA, proteínas e lipídios (HUSSAIN et al. 2000; MARNETT 2000). Foi demonstrado que peroxidase de hidrogênio (H_2O_2) inativa o sistema de reparo do DNA, provavelmente através de sua interação com o complexo de proteínas responsáveis por esta tarefa (CHANG et al. 2002). Este achado pode explicar o fenótipo de MSI observado na mucosa inflamada dos pacientes com RU (HOFSETH et al. 2003).

A **Figura 2** ilustra o processo simplificado de carcinogênese que rege a formação dos cânceres esporádicos e dos cânceres associados à RU.

1.1.3 Tipos de lesões precursoras do carcinoma colorretal associado à RU

Até o início dos anos 70, proctocolectomia profilática era a única opção de um paciente portador de RU de longa duração para evitar a morte por um câncer colorretal (EDWARDS e TRUELOVE 1964). Entretanto, com o reconhecimento de que lesões precursoras definidas como displasias, estão associadas com o desenvolvimento do câncer colorretal em pacientes portadores de RU, abriu-se um horizonte para um novo mecanismo de prevenção (MORSON e PANG 1967). Em 1966 no St. Mark's Hospital em Londres foi estabelecido o rastreamento endoscópico para a avaliação das lesões displásicas no cólon e reto de pacientes portadores da RU (LENNARD-JONES et al. 1974). Nos dias de hoje, o rastreamento endoscópico se inicia após 8 a 10 anos de duração da colite e o seguimento ocorre anualmente ou bi-anualmente com a realização de 2 a 4 biópsias em intervalos de 10cm de comprimento em busca de alterações displásicas, que serão descritas a seguir (CONNELL et al. 1994; BERNSTEIN 1999).

1.3.1.1 Macroscopia

As lesões displásicas mostram vários aspectos macroscópicos incluindo: 1) uma mucosa plana quase completamente sem alterações e que difere da mucosa normal apenas pela discreta perda nas dobras desta mucosa; 2) uma aparência aveludada devido à transformação viliforme da mucosa e também uma variação entre placa e nódulos; e 3) um aspecto polipóide, lembrando um adenoma.

As lesões descritas no item dois (2) são denominadas DALM (displasia associada à lesão ou massa) e podem facilmente estar disfarçadas pelo envolvimento inflamatório da mucosa tornando sua identificação na colonoscopia muito complexa (BLACKSTONE et al. 1981).

As lesões planas são diagnosticadas microscopicamente quando ocorre a casualidade de serem representadas na amostragem realizada durante a colonoscopia (BUTT et al. 1983). Por este motivo sua detecção depende criticamente de uma representação adequada realizada pelos colonoscopistas. RUBIN et al. (1992) calcularam que se 33 biópsias fossem realizadas durante a colonoscopia, ocorreria uma detecção das displasias em 90% dos casos. Ao passo que se 64 biópsias fossem colhidas, a detecção chegaria a 95%. A cromoendoscopia com uso de endoscópios mais potentes (magnifying endoscopes) aumenta em 3 vezes a detecção de lesões planas, mas ainda não tem sido amplamente usada provavelmente pela falta de conhecimento da técnica ou porque esta se mostra associada a tempo extra e por isso baixa remuneração (PFAU e SIVAK 2001; KIESSLICH et al. 2003). Devido à alta frequência dos adenomas esporádicos, não é impossível que estes também possam estar associados à pacientes portadores da RU. Estudos recentes têm demonstrado que além das DALMs e displasias planas, estes pacientes mostram lesões displásicas com aspecto polipóide, não associadas à áreas de inflamação, incidindo em pacientes mais velhos (> 40 anos de idade) com aspectos semelhantes aos dos adenomas esporádicos e por esta razão sendo denominadas lesões *adenoma-like* (ENGELSGJERD et al. 1999; RUBIN et al. 1999). A

diferenciação histológica entre DALM e lesões *adenoma-like* não é possível, por isso a decisão recai totalmente sobre o endoscopista (SCHNEIDER e STOLTE 1993). Esta não é uma decisão fácil, pois a conduta tomada frente às duas lesões é totalmente diferente. Com o diagnóstico de uma DALM vai ser indicada uma colectomia, já frente a uma lesão *adenoma-like* a ressecção desta e o acompanhamento endoscópico é a conduta estabelecida (MEDLICOTT et al. 1997; TORRES et al. 1998).

1.1.3.2 Microscopia

O reconhecimento histológico das displasias pode ser complicado, principalmente em biópsias mostrando colite em atividade. Algumas vezes o diagnóstico diferencial entre displasia e alterações regenerativas pode ser de grande dificuldade ou mesmo impossível. Por esta razão o “Inflammatory Bowel Disease Dysplasia Morphology Study Group”, baseado na publicação de RIDDELL et al. (1983), estabeleceu uma classificação para avaliar displasias em biópsias de pacientes portadores da RU, que inclui: a) negativo para displasia, b) positivo para displasia, tratando-se de displasias de alto e baixo grau e c) alterações indefinidas para o diagnóstico de displasia. Embora seja recomendada uma subclassificação para a categoria indefinida para displasia (provavelmente negativo para displasia, provavelmente positivo e desconhecido), os patologistas tomam esta como opcional e na maioria das vezes não a utilizam. As anormalidades celulares (nucleares e citoplasmáticas) e arquiteturais que definem displasia na RU são similares às alterações observadas em um tecido colônico neoplásico

em geral. Entre as alterações celulares estão: aumento no raio núcleo-citoplasma, hiperchromatismo e pleomorfismo nuclear, nucléolos proeminentes, figuras de mitose anormais, perda da polaridade nuclear, basofilia citoplasmática e redução ou ausência das células caliciformes. As alterações arquiteturais geralmente são resultantes de um arranjo glandular similar aos adenomas. Em contraste com as criptas observadas em um epitélio normal ou mesmo regenerativo, que exibe um gradiente de maturação da base para a superfície, as criptas com alterações displásicas permanecem imaturas ao longo de todo eixo.

As lesões consideradas positivas para displasia, o que indica que esta pode estar associada ou progredir para um adenocarcinoma, são subdivididas em baixo e alto grau, principalmente devido à implicação destas em relação à conduta (BERNSTEIN et al. 1994). Displasia de baixo grau é caracterizada por aspectos similares aos observados em adenomas e é geralmente encontrada em lesões planas. As criptas envolvidas são revestidas por um epitélio alto com diferenciação incompleta mostrando núcleos alongados, pseudoestratificados e levemente hiperchromáticos. Alguma mucina pode ser produzida pelas células neoplásicas, mas a quantidade se mostra sempre reduzida. Células caliciformes distróficas podem estar presentes. A superfície de uma displasia de baixo grau pode ser vilosa ou plana. A arquitetura das criptas tende a estar preservada.

A displasia de alto grau inclui casos anteriormente classificados como displasia moderada e difere das displasias de baixo-grau por apresentarem um maior grau de atipia citológica. Nas displasias de alto grau os núcleos

perdem sua polaridade e tendem a apresentar nucléolos proeminentes. A estratificação nuclear não se mostra apenas restrita à porção basal, mas se estende além da porção média das criptas. Displasias de baixo e alto grau podem coexistir na mesma lesão e o diagnóstico definitivo é baseado no maior grau de alteração. Claro que é necessário bom senso, pois a presença de apenas uma ou duas criptas com alterações de alto grau não são suficientes para um aumento no grau da displasia.

O diagnóstico de lesão indefinida para neoplasia é feito quando as alterações citológicas parecem exceder o que se espera observar em uma mucosa com colite em atividade, mas ao mesmo tempo estas são insuficientes para o diagnóstico de displasia, especialmente em biópsias escassas.

1.1.3.3 Diferenças moleculares: DALMS vs displasias planas

A questão é se displasia plana e DALM são apenas aspectos morfológicos diferentes de uma mesma lesão ou na verdade são duas lesões totalmente distintas. Apesar de algumas similaridades moleculares entre estas lesões, como por exemplo, alterações genéticas nos cromossomos 9p e 5q, diferenças no envolvimento dos genes VHL e TP53 são observadas. Deleções de marcadores próximos ao gene VHL são vistas em 50% das DALMs, mas pouco freqüente nas displasias planas (12%). Neste mesmo trabalho foi demonstrado que estas alterações também são observadas em áreas não acometidas microscopicamente e adjacentes às lesões displásicas (FOGT et al. 1998). A LOH do gene TP53 foi observada

com maior frequência nas lesões planas (6 de 14 casos informativos) que nas DALMs (2 de 12 casos informativos). Este achado pode ser indício de que DALMs seguem uma via de carcinogênese na qual a deleção do alelo selvagem não é um evento precoce. Foi demonstrado um aumento na expressão da proteína p53 semelhante nas duas lesões (RUBIO e RODENSJO 1995).

1.1.4 Carcinomas na RU

A maioria dos carcinomas se origina nas áreas mostrando inflamação. O diagnóstico macroscópico de neoplasias malignas pequenas pode ser difícil, pois são caracterizadas apenas por uma pequena área nodular ou uma placa. Microscopicamente o diagnóstico de carcinoma também pode ser um desafio, devido à tendência destes cânceres em apresentar na sua porção superficial apenas alterações displásicas (FOGT et al. 1998). Alguns carcinomas na RU apresentam infiltração da lâmina própria sem a extensão deste através da *muscularis mucosae* como é visto nos tumores gástricos. Adenocarcinomas em pacientes portadores da RU mostram uma grande variedade de tipos histológicos, mas os tumores mucinosos e pouco diferenciados são mais frequentes neste pacientes que nos pacientes com carcinomas esporádicos. Um estudo demonstrou que 54% dos tumores apresentavam aspectos colóides e 27% mostravam células em anel de sinete (HARPAZ e TALBOT 1996).

1.1.5 Lesões colônicas não neoplásicas em pacientes com RU

1.1.5.1 Hiperplasia

Criptas com padrão serrilhado ou aspectos similares a pólipos hiperplásicos são observados em pacientes portadores da RU. Uma grande variedade de alterações é observada nestas lesões, desde de alterações indefinidas para displasia como até mesmo alterações displásicas, e esta quando presente se mostra confinada à porção basal da cripta.

1.1.5.2 Colite cística profunda

Trata-se de uma lesão benigna observada em pacientes portadores de RU. O primeiro caso de um paciente apresentando a lesão foi descrito em 1766 e consistia da presença de cistos localizados na submucosa do cólon em um paciente portador de diarreia crônica. GOODALL e SICLAIR (1957) descreveram a ocorrência de cistos em pacientes portadores de RU e chamaram a atenção dos médicos para esta lesão benigna antes pouco conhecida. Em uma série com 19 pacientes apresentando colite cística profunda, EPSTEIN et al. (1966) descreveram os aspectos histológicos envolvendo lesão cística localizada e difusa. As glândulas se estendem da mucosa até a submucosa e se tornam dilatadas ao atingir esta última. O epitélio revestindo os cistos é semelhante ao epitélio da mucosa normal do cólon, mas células colunares altas ou mesmo cuboidais são evidenciadas também. Alguns cistos não mostram nenhum epitélio revestindo-os e são como lagos de mucina permeando a submucosa. Atipia ou anaplasia não foi observada em nenhuma glândula ou cisto localizado na submucosa. O

principal aspecto relacionado à colite cística profunda é seu diagnóstico diferencial com adenocarcinoma mucinoso, principalmente quando uma biópsia pequena é examinada. SILVER e STOLAR (1969) descreveram alguns aspectos que são necessários para esta diferenciação, como por exemplo, lagos de mucina contendo pequenos aglomerados de células malignas, irregularidade no formato das glândulas e mais de uma camada de células revestindo as glândulas e cistos, que são características observadas no adenocarcinoma mucinoso.

1.1.6 Modelos animais para o estudo da inflamação colônica relacionados ao CCR

Os modelos animais de inflamação têm servido a investigadores para melhor entender o papel da inflamação no câncer colorretal em um modelo *in vivo* que pode recapitular muitos dos aspectos que ocorrem nos seres humanos. Três principais abordagens têm sido utilizadas: a) a indução de inflamação em animais saudáveis com agentes que irritam o cólon e a monitoração para o desenvolvimento de neoplasia; b) a indução de inflamação em animais alterados geneticamente sendo que a maioria destes apresentam tendência no desenvolvimento de tumores colônicos; e c) o estudo de animais que mostram uma predisposição genética para inflamação e seu seguimento para a avaliação de tumores no cólon.

1.1.6.1 Dextran Sulfato de Sódio (DSS) em animais sadios

DSS é um polissacarídeo sulfatado produzido sinteticamente e que tem o potencial de desenvolver colite em modelos animais quando administrados através da dieta ou misturados à água ingerida (MARCUS e WATT 1969; WATT e MARCUS 1971; OHKUSA 1985). OKAYASU et al. (1990) escreveram a presença de displasia e carcinoma em cobaias após o uso de DSS por um longo período (YAMADA et al. 1992). Este trabalho tinha o objetivo de verificar se a duração da colite num modelo animal mostrava o mesmo risco de desenvolvimento de neoplasia que a RU produz no humano. Colites aguda e crônica foram induzidas em camundongos BALB/C e CBA/J com o uso de DSS (5-10%) misturado à água para reproduzir os períodos de atividade e remissão característicos da RU (OKAYASU et al. 1990). Para isto, 4-5 ciclos de DSS foram dados aos animais, onde cada ciclo correspondia à ingestão de DSS adicionado à água durante sete dias, seguidos de água por 10 dias. Os autores demonstraram que aspectos clínicos e histopatológicos relacionados à colite induzida eram muito similares aos observados em humanos, como por exemplo: diarreia, sangue oculto nas fezes, perda de peso, melena, inflamação da mucosa intestinal com formação de abscessos nas criptas e erosão do epitélio superficial.

COOPER et al. (1993 e 2000), usando camundongos Swiss Webster, estudaram as alterações histológicas precoces de indução de colite e também avaliaram as lesões displásicas e carcinomas presentes neste modelo. Este modelo mostrou que a incidência de displasia e/ou câncer variou de 10% a 37%. Esta incidência varia de acordo com a duração da

colite, que é um aspecto análogo ao reportado em humanos (7,5 a 38%) (COLLINS et al. 1987; LOFBERG et al. 1990). É importante ressaltar que os camundongos que recebem DSS também reproduzem o achado de lesões planas e DALMS observados em humanos e além disso as displasias planas foram associadas à severidade da colite (COOPER et al. 2000).

Estudos demonstram que o dano causado por estresse oxidativo é o responsável pela indução de inflamação e tumor no modelo experimental de colite pelo uso de DSS (BLACKBURN et al. 1997). O uso de agentes antioxidantes diminui o índice de inflamação e o número de adenocarcinomas em camundongos tratados com DSS. Além disso, observa-se uma diminuição na expressão de iNOS e nitrotirosina nos macrófagos da mucosa colônica e dos tumores destes animais (SERIL et al. 2002).

Acredita-se que o carcinoma colorretal esporádico em humanos é causado pela exposição crônica a pequenas quantidades de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos e promotores (SUGIMURA et al. 2000). Azoximetano (AOM) é um carcinógeno específico do cólon de roedores cujo mecanismo de ação consiste na formação de adutos no DNA das células. Esta substância quando administrada por via intraperitoneal em várias doses, produz tumores na porção distal do cólon de linhagens de roedores que são mais suscetíveis. Estes tumores exibem aspectos histológicos semelhantes aos tumores esporádicos observados em humanos (SHAMSUDDIN e TRUMP 1981; DELKER et al. 1999). Desta forma, no intuito de se desenvolver um modelo animal mais eficiente de colite associada a

carcinogênese colorretal, uma única injeção intraperitoneal de AOM foi administrada em camundongos machos Crj: CD-1 seguida por ciclos de DSS (TANAKA et al. 2003). Neste estudo todos os animais desenvolveram tumores intestinais 20 semanas após o início do experimento e estes mostraram translocação patológica de β -catenina para o núcleo e um aumento na expressão de COX-2 e iNOS, mas não foi observada positividade nuclear para a proteína p53.

1.1.6.2 DSS em animais modificados geneticamente

O animal sem o gene (*knockout*) MSH2 é uma mistura de camundongos C57BL/6 e 129/Ola que desenvolvem, além de linfomas, uma alta frequência de tumores intestinais (REITMAIR et al. 1996). Após o uso de DSS esta incidência aumenta ainda mais, sendo que 28 de 30 animais apresentam displasia ou câncer seguido deste tratamento (KOHONEN-CORISH et al. 2002).

O primeiro modelo animal de tumorigênese do trato gastrintestinal foi gerado através de uma mutação nonsense induzida por ethylnitrosourea no gene *Apc*, que leva a morte dos animais homocigotos, mas em heterocigotos observa-se uma grande quantidade de tumores principalmente no intestino delgado (MOSER et al. 1990). Estes camundongos, conhecidos como *Apc*^{Min/+}, foram também estudados por nosso grupo no contexto de colite induzida por DSS (COOPER et al. 2001). A presença de neoplasia invasiva não é observada nos camundongos *Apc*^{Min/+} que não são tratados com DSS. Ao passo que, em animais recebendo dois ciclos de DSS foi observada a

incidência de 22% de cânceres e quando três ciclos eram administrados um aumento para 40% ocorria nestes animais. Além disso, os camundongos apresentando inflamação mais intensa tiveram um maior índice de lesões.

Até o momento apenas um estudo foi relatado usando camundongos sem o gene p53 em associação com DSS (FUJII et al. 2004). Os estudos demonstraram que estes animais apresentam uma aparência normal, mas desenvolvem uma variedade de neoplasias e tendem a morrer ao redor dos seis meses de idade (DONEYOWER et al. 1992). Os camundongos heterozigotos também apresentam uma alta taxa de tumores. Os tumores mais incidentes são linfomas e sarcomas, sendo que o primeiro ocorre em mais de 70% dos camundongos homozigotos (p53-/-). A neoplasia colônica foi reportada ocorrer espontaneamente em 2% dos camundongos heterozigotos (p53+/-), mas não é uma característica dos camundongos homozigotos (HARVEY et al. 1993a; PURDIE et al. 1994). Quando colite é induzida por DSS em camundongos p53 geneticamente alterados, animais p53-/- apresentam uma incidência de neoplasia colônica de 100%, animais p53-/+ de 46.2% e os animais *wild-type* (C57BL/6 x CBA - p53+/+) uma incidência de 13.3% (FUJII et al. 2004). A maioria das neoplasias observadas neste modelo são lesões planas tanto nos camundongos homozigotos quanto nos heterozigotos. Também foi observada neste modelo a presença de translocação da proteína β -catenina para o núcleo pela técnica de immuno-histoquímica e a ausência de mutação no gene K-ras no códon 12, por seqüenciamento direto.

1.1.6.3 Animais com tendência para o desenvolvimento de inflamação

Os camundongos sem o gene IL-2, cujo produto é uma citocina reguladora essencial para o sistema imune, apresentam perda completa na atividade desta proteína e cerca de 50% dos animais morrem em 9 semanas com esplenomegalia, linfadenopatias e anemia hemolítica severa (HIBI et al. 2002) . Apesar da limitação na sobrevivência, a presença de displasia, mas não a de câncer, é observada no intestino destes animais (SOHN et al. 2001). Camundongos sem os genes IL-2 e β_2 -Microglobulin desenvolvem pancolite similar aos camundongos deficientes apenas para o gene IL-2, mas estes animais apresentam doença menos severa e mostram uma sobrevivência maior (>6 meses) com uma incidência de tumor em torno de 32%. Estudos moleculares mostraram que todos os tumores apresentam mutação no gene *Apc*, 50% mostram mutação em *Trp53* e a grande maioria tem MSI.

Os camundongos sem o gene IL-10 demonstram uma incidência de 100% de colite aos três meses de idade com mortalidade de 30%. Kulleberg e colegas demonstraram que a inflamação no cólon de camundongos IL-10 nulo é dependente da presença de *Helicobacter hepaticus*, uma bactéria comum em animais alterados geneticamente, já que com a eliminação desta pelo uso de antibióticos os animais não produziam mais colite (KULLBERG et al. 1998). Outras alterações no cólon destes camundongos são caracterizadas por hiperplasia e lesões degenerativas do epitélio e aos seis meses de idade apresentam o desenvolvimento de tumores colônicos. Os adenocarcinomas presentes neste modelo não apresentam alterações nos

genes Apc, Trp53, K-ras e Msh2, desta forma o mecanismo molecular destes tumores continua desconhecido.

2 JUSTIFICATIVA

O uso de camundongos como modelo animal para o estudo do carcinoma do cólon tem se tornado uma ferramenta de grande valia, pois em muitos casos os aspectos histológicos, distribuição de lesões e progressão natural da doença são muito similares aos observados em humanos. A RU relacionada ao câncer colorretal também tem sido estudada nestes modelos. É sabido que a displasia nesta doença é considerada, até o momento, o único marcador do desenvolvimento do carcinoma colorretal em humanos. Apesar de vários estudos terem sido realizados em um modelo animal que recapitula os aspectos morfológicos da carcinogênese do câncer colorretal originado em pacientes portadores da RU, pouco tem sido esclarecido quanto a seus aspectos moleculares. O objetivo deste trabalho é elucidar os eventos moleculares da RU relacionada à displasia no modelo experimental animal de colite induzida por DSS, traçando um paralelo com os estudos moleculares em displasia e câncer que foram realizados em humanos. Estudos com esta finalidade são muito importantes para o uso destes modelos na descoberta de novos marcadores que ajudem na elaboração de sistemas de detecção mais eficientes e regimes quimiopreventivos eficazes.

Este trabalho consta de dois objetivos específicos, sendo que o primeiro está associado à pesquisa de alterações moleculares nas lesões displásicas relacionadas ao modelo de indução de colite pelo uso de DSS/AOM em um animal sadio. O segundo trata da avaliação das lesões

colônicas e alterações moleculares ocorrendo num modelo de indução de colite pelo uso de DSS em um animal alterado geneticamente.

O modelo de indução de colite e displasias pelo uso de DSS/AOM em animais SWs sadios já vem sendo utilizado por este grupo para a avaliação da resposta a quimiopreventivos. Apesar das alterações clínicas e morfológicas deste modelo já serem bem conhecidas, o entendimento das alterações moleculares é escasso e precisa ser discutido. Além disso, durante nossos estudos de avaliação de agentes quimiopreventivos neste modelo, foi observada uma resposta seletiva no efeito quimiopreventivo das drogas entre lesões displásicas planas e DALMs. O uso do antiinflamatório Celecoxib mostrou uma diminuição na multiplicidade das displasias em torno de 50%, mas apenas em relação às DALMs (COUDRY et al. 2004). Entretanto, o agente 5-ASA (5-ácido aminosalicílico) inibe a formação de colite associada à displasia em 44%, às custas das lesões planas (GARY et al. 2004). Esta observação deixa a dúvida se estas duas lesões são apenas variação morfológica da mesma lesão ou duas lesões completamente diferentes que por isso respondem diferentemente a agentes preventivos.

Na tentativa de simular os mesmos passos da carcinogênese que estão associados à RU, onde o gene TP53 é um evento inicial, a colite foi induzida pelo uso de DSS em camundongos alterados geneticamente para o gene Trp53. Até o momento apenas um estudo foi publicado mostrando a indução de tumores colônicos em animais p53 deficientes com o uso de DSS (FUJII et al. 2004). O *background* dos animais usados neste trabalho

constava de camundongos C57BL/6 x CBA. Porém, nosso estudo foi conduzido em camundongos C57BL/6. Sabe-se que linhagens diferentes de animais apresentam diferente suscetibilidade para a formação de tumores (NAMBIAR et al. 2003). Por este motivo foi realizada a caracterização das lesões colônicas no modelo usado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem o objetivo de avaliar alguns dos possíveis eventos moleculares incidentes nas lesões colônicas relacionadas ao modelo de indução de colite pelo DSS e avaliar fenotipicamente as lesões colônicas em animais alterados geneticamente para o gene Trp53.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A Objetivo específico 1: DSS/AOM em animais Swiss Webster

- 1 Avaliar o status de mutação nos genes Trp53, K-ras e β -catenina, LOH do gene APC e expressão das proteínas p53 e β -catenina,
- 2 Comparar as alterações genéticas observadas no objetivo anterior entre as lesões planas e DALMs.

B Objetivo específico 2: DSS em animais deficientes em p53

- 1 Caracterização de lesões colônicas,
- 2 Avaliar o status de mutação no gene K-ras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E INDUÇÃO DE COLITE

4.1.1 Experimento com animais Swiss Webster (SW)

O protocolo de uso dos animais foi aprovado pelo “Institutional Animal Care and Use Comitite” (IACUC) no Fox Chase Cancer Center (FCCC), Filadélfia, EUA. Fêmeas SW foram adquiridas da companhia Taconic Farms (Albany, NY) com seis semanas de idade e mantidas no biotério do FCCC em condições de umidade e luminosidades controladas para adaptação ao meio ambiente antes do início do experimento. Os camundongos receberam ração Purina e água *ad libitum*. Após uma semana (animais com sete semanas de idade), os camundongos foram pesados e foi administrada uma única injeção intraperitoneal de AOM dissolvido em solução salina na dose de 7,4 mg/kg. Após uma semana, foi iniciado o primeiro ciclo de DSS, que correspondia a sete dias de ingestão de água contendo DSS 4% seguidos por 14 dias de recuperação com ingestão de água pura, como descrito previamente (COOPER et al. 2000). A substância DSS denominada de alto peso molecular (30-40.000) foi adquirida da companhia ICN Biomedicals Inc; Costa Mesa, CA. Mais dois ciclos se seguiram e os camundongos foram sacrificados no final do terceiro ciclo com 18 semanas de vida. Animais em sofrimento, em qualquer parte do estudo, receberam eutanásia através de

asfixia por CO₂. Um esquema mostrando as etapas deste processo está apresentado na **Figura 3**.

4.1.2 Experimento com animais alterados para o gene Trp53

Os camundongos alterados geneticamente para o gene Trp53: p53 -/- (homozigotos), p53 +/- (heterozigotos) e p53+/+ (animais controles) foram adquiridos das colônias (C57BL/6) pertencentes à companhia Taconic Farms. Estes receberam os mesmos cuidados relatados acima dedicados aos camundongos SWs. A colite foi induzida nos camundongos com 10 semanas de vida usando quatro ciclos de tratamento com DSS nos animais p53 +/+ e três ciclos nos animais p53 -/- e p53 +/-, em. Os ciclos consistiram de quatro dias de ingestão de água contendo DSS 4% seguidos por 21 dias de água pura. Após o término dos ciclos de DSS, os camundongos alterados geneticamente para o gene Trp53 e os camundongos controles, foram mantidos com água pura por um período adicional de 120 dias. Os camundongos foram sacrificados com um total de 265 dias para os animais p53-/- e p53+/- e 290 dias para os animais p53+/+. Este protocolo foi obtido após estudos pilotos avaliando a toxicidade e a promoção de tumores pelo regime usado. Nestes estudos preliminares foi verificado que os animais p53 +/+ só produzem tumores quando expostos a mais de três ciclos de DSS e animais p53-/- e p53+/- não resistem ao uso de mais de três ciclos de DSS. Como controle do tratamento foram usados animais p53 -/-, p53 +/- e p53 +/+ sem o uso de DSS. Animais em sofrimento receberam eutanásia através

de asfixia por CO₂. Um esquema mostrando as etapas deste processo está apresentado na **Figura 3**.

4.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES COLÔNICAS

Após o sacrifício dos animais o abdômen dos camundongos foi aberto e o cólon, retirado. O cólon foi aberto em sua porção longitudinal e lavado em solução salina à 4°C. A seguir foi colocado em um papel histológico cortado em fitas estreitas e examinado para avaliação de lesões macroscópicas. Todas as lesões foram contadas e registradas em uma ficha de sacrifício designada para cada animal. Lesão maior que 4mm foi dividida ao meio, sendo que uma parte foi congelada em nitrogênio líquido, para criar um banco de lesões, e a outra parte foi fixada em etanol 70%, para avaliação histológica. O intestino restante depositado no papel histológico foi enrolado com o auxílio de um canudo e fixado em etanol 70%. Após 12 horas de fixação o cólon foi dividido em três porções: proximal, médio e distal. Foi cortado em fatias em intervalos de 2mm e encaminhado para o processamento histológico. Uma lâmina corada em Hematoxilina e Eosina (H&E) foi destinada ao exame histopatológico.

A avaliação histológica das displasias foi baseada na classificação desenvolvida pelo “Inflammatory Bowel Disease-Dysplasia Morphology Study Group” (RIDDELL et al. 1983). As lesões foram classificadas como: negativa, indefinida e positiva para neoplasias. As lesões classificadas como

positivas para displasia foram designadas planas ou polipóides. Aquelas lesões que não se encaixavam como planas ou polipóides, provavelmente devido a um artefato na inclusão do fragmento, foram chamadas de indeterminadas. Em adição, as displasias foram classificadas como baixo grau e alto grau. Displasia de baixo grau foi caracterizada pela presença de células com núcleos alongados, discretamente hiper cromáticos e com discreta estratificação nuclear, mas que ainda mantinham a polaridade em relação à membrana basal. Displasia de alto grau foi caracterizada por uma atipia nuclear e arquitetural muito mais pronunciadas: 1) complexa irregularidade das glândulas e mostrando um padrão cribriforme; 2) intensa hiper cromasia nuclear com perda da polaridade; e 3) presença de nucléolos evidentes e numerosas figuras de mitose.

Os adenocarcinomas também designados planos ou polipóides foram classificados segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) na publicação dos tumores do sistema digestivo (HAMILTON et al. 2000). Adenocarcinomas foram chamados de mucinosos quando estes eram compostos de mucina extracelular em mais que 50 % de sua totalidade.

Pseudoinvasão e presença de glândulas em meio à parede intestinal sem uma conotação maligna foram diagnosticadas quando os seguintes aspectos, característicos de neoplasia maligna, não estavam presentes: 1) desmoplasia que não estava associada a um processo inflamatório; 2) presença de glândulas com aspecto irregular e angulado; 3) células glandulares diferentes das células da mucosa superficial com atipia

excedendo uma displasia de baixo-grau e 4) ausência de membrana basal envolvendo as glândulas (BOIVIN et al. 2003).

Lesões hiperplásicas foram caracterizadas por uma expansão da porção proliferativa das criptas e maturação das células na porção superficial com aspecto serrilhado.

A avaliação histopatológica descrita nos parágrafos acima é relativa apenas aos animais p53. O tecido adquirido para o estudo das alterações moleculares nos animais SWs foi oriundo de um trabalho anterior cuja finalidade era a avaliação de agentes quimiopreventivos neste modelo (COUDRY et al. 2004). Neste estudo as lesões displásicas foram classificadas em planas e DALMs, pois o desenvolvimento espontâneo de adenomas, que pode ser observado nos animais deficientes para o gene p53, não é observado em camundongos SWs. As lesões displásicas não foram sub-classificadas em baixo e alto grau, pois em animais SWs após o uso de DSS as lesões displásicas apresentam aspectos de lesões de alto-grau. Foram selecionadas 28 lesões DALMs e 12 lesões planas para avaliação molecular.

4.3 CAPTURA DE CÉLULAS USANDO MICRODISSECÇÃO A LASER (LCM) E ISOLAMENTO DO DNA

O procedimento de LCM foi realizado no intuito de coletar uma população homogênea de células epiteliais displásicas. Desta maneira evita-se a presença de células contaminantes que podem mascarar a detecção de

alterações presentes apenas nas células displásicas. Para a realização da LCM, os tecidos colônicos embebidos em parafina, correspondentes a cada lesão, foram cortados numa espessura de 5 μ m e colocados numa lâmina comum (não carregada). As lâminas foram colocadas em uma caixa apropriada e mantidas a -80°C até o momento do início do procedimento. Antes do procedimento de LCM, as lâminas seguiram um processo de desparafinização e em seguida foram hidratadas com banhos consecutivos de 30 segundos em um gradiente decrescente de etanol (100%, 95%, 75%) e água. Foram coradas com *Staining Solution* (Arcturus Bioscience; Mountain View, CA) por 30 segundos e depois desidratadas com banhos seqüenciais em etanol 75% (30 seg), 95% (30 seg) e 100% (2 min) e Xileno por 5 minutos. As lâminas secaram ao ar livre por 5 minutos e a LCM foi realizada imediatamente. Foram coletadas cerca de 2.000 células usando um sistema automático de captura, o AutoPix Automated System (Arcturus, Mountain View, CA). A **Figura 4** representa o procedimento de LCM.

O DNA foi extraído e isolado das células capturadas com o uso do produto PicoPure DNA kit (Arcturus Bioscience, CA) de acordo com o protocolo do fornecedor. Blocos com fragmentos de pele de todos os camundongos SW/AOM/DSS e pertencentes a 6 camundongos (2 para cada animal p53^{-/-}, p53^{+/-} e p53^{+/+}) foram cortados com 5 μ m de espessura e DNA foi isolado, seguindo o mesmo protocolo descrito acima, com exceção da microdissecção a laser, para servirem de controle na análise de mutações.

4.4 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO DAS PROTEÍNAS P53 E β -CATENINA

Para a realização da técnica imunohistoquímica foram realizados cortes de 5 μ m de espessura em blocos de animais SWs contendo lesões displásicas e mucosa normal. Foram usados anticorpos contra as proteínas p53 e β -catenina e a detecção foi através do complexo avidina-biotina-peroxidase, como descrito previamente (COOPER et al. 2000). O anticorpo usado contra β -catenina (Sigma, St Louis, MO) foi um anticorpo policlonal de coelho contra o peptídeo amino-ácido 768-781. O anticorpo contra p53 (produto CM5, Novocastra Laboratorie, UK) é também policlonal de coelho e que reage com a proteína selvagem e mutada. O anticorpo contra β -catenina foi diluído em 1:4000 e 1:8000, e contra p53 em 1: 500 e 1:1000. Foi usada uma câmara úmida para *heat epitope retrieval* após imersão em tampão de citrato. Foi usado um sistema automático (Techmate 1000) para realização da técnica imunohistoquímica utilizando um protocolo padrão sugerido pelo fabricante. Ocorreu a substituição do anticorpo secundário proveniente da companhia Vector Labs pelo anticorpo secundário da Techmate. Um carcinoma escamoso de pele de camundongo, o qual é conhecido por expressar a forma mutada de p53, foi usado como controle positivo do anticorpo p53, gentilmente cedido pelo Dr. Andres J.P. Klein-Szanto (FCCC) (MITSUNAGA et al. 1995). Para a proteína p53, a extensão da positividade foi estabelecida em uma escala de 0 a 4; 0, representa menos de 5% das células positivas para a proteína; 1, mais que 5% e até 25%; 2, mais de 25%

e até 50%; 3, mais de 50% e até 75%; e 4, quando a positividade foi presente em mais de 75% das células. A intensidade da expressão foi medida de 0 a 3+, onde 0 representa a não expressão da proteína, 1+ pequena quantidade, 2+ moderada quantidade e 3+ grande quantidade. A medida final foi obtida multiplicando-se as duas variáveis (extensão e intensidade), com as medidas variando de 0 a 12. Quando o total variou de 0 a 4 este foi considerado como pouco expressivo, de 5 a 8 como uma expressão intermediária e de 9 a 12 como uma expressão intensa.

Para o controle de expressão da proteína β -catenina foram usadas mucosas colônicas normais e adenomas, ambos coletados do camundongo com mutação do gene Apc em células germinativas (Min). A expressão da membrana mesmo que fraca foi considerada como normal e a positividade da proteína no citoplasma e no núcleo foram consideradas anormais. Quando a positividade foi presente no núcleo ou citoplasma, a extensão desta foi medida de 1-3, sendo 1 menos de 5% das células positivas, 2 de 5 a 25% das células positivas e 3 mais que 25% das células positivas.

4.5 AVALIAÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE K-RAS

Uma região contendo 167 pares de bases (pb) do gene k-ras de camundongo (exon 1) que contém os condons 12 e 13 foi amplificada pela técnica de PCR. Os iniciadores específicos estão descritos **na Tabela 3** e foram gerados baseados na seqüência genômica obtida no Genbank (número de acesso S39586). O iniciador antisense, para cada par, foi

biotinilado na posição 5' com o objetivo de viabilizar o isolamento da fita simples de DNA a ser utilizada como molde na reação de seqüenciamento. Cada reação de PCR continha 50-500 ng de DNA genômico, 10 pmols de iniciadores senso e antisenso e 25 µl de Jumpstart Readymix RedTaq Polymerase (Sigma) em um volume total de 50 µl. Os ciclos foram realizados em uma máquina de PCR Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) da seguinte maneira: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 51°C por 30 s, 72°C por 45 s, e finalmente 5 min à 72°C. A amplificação da região específica foi verificada pela visualização do amplicon em um gel de agarose à 2% contendo brometo de etídeo. A purificação da fita simples de DNA a ser utilizada como molde na reação de sequenciamento foi realizada em uma placa de *96-wells* (Millipore, Bedford, MA). Vinte µl do produto biotinilado foram purificados utilizando esferas de agarose marcadas com estreptoavidina (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) e processados utilizando o kit PSQ 96 Sample Preparation Kit (Pyrosequencing AB, Westborough, MA). A reação de síntese por sequenciamento da fita complementar foi realizada automaticamente pelo instrumento PSQ 96MA (Biotage) em temperatura ambiente usando reagentes PyroGold (Biotage). O sinal emitido durante a incorporação de cada nucleotídeo foi detectado por uma câmera CCD e convertido em picos para formar um pirograma.

Para servir como controle da reação, tecido não tumoral (pele) dos camundongos AOM/DSS e p53 foi usado.

4.6 AVALIAÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE β -CATENINA

O exon 3 do gene β -catenina de camundungo (Cttnb1) foi amplificado pela técnica de PCR. Os iniciadores específicos estão descritos na **Tabela 3** e foram gerados baseados na seqüência genômica obtida no Genbank (número de acesso mCG22702). Cada reação de PCR continha 50-500 ng de DNA genômico, 10 pmols de iniciadores senso e antisenso e 25 μ l de Jumpstart Readymix RedTaq Polymerase (Sigma) em um volume total de 50 μ l. Os ciclos foram realizados em uma Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) da seguinte maneira: Um ciclo de 94° por 4 minutos e 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A amplificação da região específica foi verificada pela visualização do amplicon (408 pb) em um gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo. O produto de amplificação da PCR foi purificado usando Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Inc, Chatsworth, CA) e foi seqüenciado usando BigDye Terminator Cycle Sequencing Chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA), as instruções foram seguidas de acordo com o protocolo do fabricante. A reação correu num sequenciador de DNA automático (Prism 377; Applied Biosystems). O alinhamento da seqüência adquirida foi realizado com base em uma seqüência referência utilizando SeqWeb ver. 2.0. Para servir como controle da reação, tecido não tumoral (pele) dos camundongos AOM/DSS e p53 foi usado.

4.7 AVALIAÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE TRP53

Os exons 5, 6, 7 e 8 do gene Trp53 de camundongo foram amplificados pela técnica de PCR usando iniciadores específicos desenhados na região intrônica (**Tabela 3**). Estes iniciadores (senso e antisenso) para cada exon foram gerados baseados na seqüência genômica obtida no Genbank (número de acesso AF367373). A reação de PCR seguiram os mesmo procedimento descrito para o gene β -catenina. A amplificação das regiões específicas foi verificada pela visualização dos amplicons que continham 366pb (exons 5-6) e 576 pb (exons 7-8) em um gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo. As demais etapas (purificação, seqüenciamento e alinhamento da seqüência) também foram similares as descritas para o gene β -catenina.

Para servir como controle da reação tecido não tumoral dos camundongos AOM/DSS foi usado.

4.8 AVALIAÇÃO DE LOH NO GENE APC

O camundongo SW é uma linhagem não isogênica (*outbred*), por isso pode apresentar uma combinação de alelos muito variada, sendo, desta forma, muito semelhante à realização de estudos genéticos realizados em humanos, onde cada indivíduo possui um padrão (*imprint*) característico destes marcadores para cada alelo. Por este motivo, a LOH do gene Apc de camundongo foi determinada através da amplificação de seqüências

repetitivas (dinucleotídeas) pela técnica de PCR. As seqüências foram obtidas através do Mouse Genome Database do Jackson Laboratory em Bar Harbor (Maine, EUA) e de estudos previamente descritos realizando LOH no gene *Apc* (BLAKE et al. 2001; JANSSEN et al. 2002). Como o banco de informações de microssatélites do Mouse Genome Database do Jackson Laboratory em Bar Harbor (Maine, EUA) ou qualquer outra fonte de dados para estes marcadores não apresenta dados com avaliação das seqüências repetitivas nos camundongos SW, a opção foi usar marcadores que se mostram polimórficos para a maioria das linhagens dos camundongos. Foram usados também marcadores que tiveram seu polimorfismo avaliado em linhagem SWR, um camundongo albino muito similar ao camundongo SW. Os seguintes marcadores foram usados para o locus de *Apc* (cromossomo 18; 15cM): D18Mit64 (2cM), D18Mit111 (11cM), D18Mit132 (11cM), D18Mit17 (20cM), D18Mit58 (24cM), D18Mit34 (12cM), D18Mit147 (16cM) e D18Mit60 (16cM). Cada reação de PCR continha um volume total de 25µl. Os ciclos foram realizados em uma Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury, NY) da seguinte maneira: 94°C por 4 minutos, para uma desnaturação inicial, e 35 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 30s, and 72°C por 30s. O produto da PCR foi separado em um gel de poliacrilamida (9%). Uma amostra de tecidos controles de cada camundongo foram avaliados para verificar o polimorfismo de cada marcador. Quando o marcador se mostra polimórfico neste tecido, duas bandas são visualizadas no gel de poliacrilamida e este marcador pode ser usado no experimento, pois é considerado informativo. Em contraste,

quando o marcador apresenta apenas uma banda quando testado no tecido controle significa que ambos alelos apresentam a mesma seqüência para este marcador e este é considerado não informativo.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi usado o teste de Wilcoxon para comparar a diferença entre os grupos como, por exemplo, número de lesões e tipos de lesões. O teste de Fisher foi usado para avaliar a incidência de tumores e a comparação entre o status de mutação. Todos os testes foram realizados usando o software SAS (SAS Institute, Cary, NC).

6 RESULTADOS

Os resultados dos experimentos utilizando o modelo de colite em animais SWs e p53 vão ser descritos separadamente.

6.1 MODELO DE COLITE UTILIZANDO OS ANIMAIS SWS

6.1.1 Expressão das proteínas p53 e β -catenina

Foram avaliadas 28 lesões DALMs e 12 lesões planas. Todas as lesões foram negativas para a detecção da proteína p53 pelo estudo imunohistoquímico. O tecido controle mostrou positividade nuclear nas células escamosas neoplásicas.

A translocação da proteína β -catenina para o núcleo das células foi observada em 85% das lesões planas e 87% das DALMs. A mucosa normal demonstrou a expressão desta na membrana celular. A **Figura 5** ilustra estes resultados.

6.1.2 Mutação dos genes K-ras (exon 1), β -catenina (exon 3) e Trp53 (exons 5-8)

Foram examinadas 28 lesões DALMs, 12 lesões planas e 10 tecidos não tumorais controle (pele), para a pesquisa de mutação em k-ras, β -catenina e Trp53.

Não foram observadas evidências de mutação do gene k-ras em nenhuma das lesões displásicas ou no tecido controle.

O seqüenciamento do exon 3 do gene β -catenina demonstrou a presença de mutações em 85% (29/34) das lesões displásicas, nos códons 32, 33, 34, 37, 41 e 47. No códon 32, as mutações encontradas foram de GAT (Ácido Aspártico) para AAT (Aspargina) ou para GGT (Glicina). No códon 33, foi encontrada mutação de TCT (Serina) para TTT (Fenilalanina). No códon 34, foi observada mutação de GGA (Glicina) para GAA (Glutamina) ou para AGA (Arginina). No códon 37, foi encontrada mutação de TCT (Serina) para TTT (Fenilalanina). No códon 41, foi encontrada mutação de ACC (Treonina) para ATC (Ileína). No códon 47, foi encontrada mutação de AGT (Serina) para AGG (Arginina). O seqüenciamento não foi considerado ótimo para 6 lesões, sendo 1 displasia plana e 5 DALMs. O seqüenciamento foi repetido nas lesões que apresentaram mutação para confirmar o achado. Nenhum dos tecidos controles examinados apresentou mutação no gene β -catenina. **(Tabela 4; Figura 6).**

O seqüenciamento do gene Trp53 (exons 5-8) demonstrou a substituição de bases nas posições 320 (exon 6), 348 (exon 6) e 843 (exon 7) em todos os tecidos examinados. A substituição na posição 320 de C>T provocou a mudança do amino-acido pro>leucina e a substituição na posição 843 de A>G a mudança de Ile>Met. A substituição na posição 348 de T>C não provocou mudança no amino-ácido. Estas substituições foram observadas nos tumores, mas também no tecido controle (pele) denotando tratar-se apenas de uma variação genética que ocorre nesta linhagem em

relação a sequência referência usada que pertencente à espécie *Mus musculus* (**Tabela 5**).

6.1.3 LOH do gene Apc

Todos os marcadores utilizados para pesquisa de LOH no gene Apc testados no tecido não-tumoral dos animais SW não demonstrou nenhum polimorfismo. Assim sendo, nenhum deles foi informativo para esta pesquisa. Para testar se a ausência de polimorfismo nos marcadores era decorrente da técnica empregada ou se realmente estes marcadores não eram polimórficos para os animais SW, foi realizada a pesquisa do polimorfismo dos marcadores em tecidos oriundos de camundongo C57BL/6. Foram avaliados tecidos de 4 animais (C57BL/6) para todos os oito marcadores e todos resultaram polimórficos. Confirmando assim, que estes marcadores não são polimórficos para os animais SWs.

6.1.4 Comparação dos achados moleculares entre as displasias planas e DALMs

Não foram observadas diferenças entre o status de mutação dos genes avaliados (k-ras, p53 e β -catenina) ou entre a expressão das proteínas p53 e β -catenina entre as lesões planas e DALMs.

6.2 MODELO DE COLITE UTILIZANDO ANIMAIS ALTERADOS GENETICAMENTE PARA O GENE P53

6.2.1 Achados histopatológicos

Foram observadas, em graus diferentes, alterações típicas de colite como, por exemplo, infiltrado inflamatório crônico na mucosa e distorção das criptas em 80% dos animais p53 $-/-$, 65% dos animais p53 $+/-$ e 85% dos animais p53 $+/+$ tratados com DSS (**Figura 7**). Nestes animais com colite, independentemente da severidade do envolvimento inflamatório, áreas completamente normais da mucosa também eram observadas. Isso indica que a lesão inflamatória ocorre em um padrão descontínuo.

A incidência de displasia e/ou câncer nos animais tratados com DSS foi de 93% nos animais p53 $-/-$, 21% nos animais p53 $+/-$ e 40% nos animais p53 $+/+$. Nenhum tumor colônico foi observado nos animais que não receberam DSS. Em adição à alta incidência de tumores colônicos nos camundongos p53 $-/-$, estes também exibiram uma predominância de lesões planas quando comparadas às lesões polipóides (73,3% vs 13,3%, respectivamente). A distribuição das lesões observadas nos camundongos p53 $-/-$ tratados com DSS foi de 33,3% de cânceres planos, 13,3% de cânceres polipóides, 40% de displasias planas e 13,3% de lesões indefinidas. Não foram observadas displasias polipóides nestes animais, sendo que 83,3% e 16,7% das displasias planas observadas foram sub-classificadas como de baixo grau e alto grau, respectivamente. Em contraste, os camundongos p53 $+/-$ tratados com DSS mostraram um predomínio de

lesões polipóides em relação às lesões planas (75% e 15%, respectivamente). A distribuição das lesões colônicas em animais p53 +/-, foi de 15% de cânceres planos, 5% de cânceres polipóides, 5% de cânceres indeterminados, 70% de displasias polipóides e 5% de lesões indefinidas. Todas as displasias foram classificadas como polipóide, sendo que 21,4% e 78,6% delas foram sub-classificadas como baixo-grau e alto grau, respectivamente. Os animais p53 ++ tratados com DSS apresentaram 40% de lesões colônicas e todas classificadas como displasia polipóide, sendo que 100% foram sub-classificadas como de baixo grau. Quanto aos adenocarcinomas, 14% e 90% deles foram classificados como mucinosos, nos animais p53-/- e nos animais p53+/- tratados com DSS, respectivamente.

A **Tabela 6** sumariza a incidência de lesões neoplásicas em animais p53 tratados com DSS. Imagens ilustrando estas lesões estão apresentadas nas **Figuras 8, 9 e 10**.

Um achado interessante neste estudo foi à presença de lesões compostas por glândulas dilatadas e preenchidas por muco, localizadas na submucosa e camada muscular da parede intestinal, semelhante à colite cística profunda observada em humanos (**Figura 11**). Algumas glândulas eram revestidas por um epitélio similar ao epitélio da mucosa intestinal, entretanto outras apresentavam um epitélio de revestimento de aspecto colunar e que se transformava num aspecto cuboidal nas áreas mais dilatadas. Foi observada a presença de lagos de mucina que, mesmo após a realização de cortes seriados, continuavam desprovidos de um epitélio de revestimento. Estes lagos de mucina foram observados nas camadas

submucosa, muscular e serosa da parede intestinal. Não foi observada nenhuma evidência de atipia tanto na mucosa superficial acima da lesão quanto no epitélio que revestia estes cistos. Estas alterações foram observadas em 7% dos animais p53 $-/-$, sendo que todas as lesões não eram revestidas por epitélio. Já 3.4% dos animais p53 $+/-$ mostraram este tipo de lesões, 1.1% delas mostrando glândulas na parede intestinal e 2.2% sem epitélio de revestimento presente. Não foram observadas as mesmas lesões nos animais p53 $+/+$ tratados com DSS ou nos animais não tratados com DSS.

A hiperplasia focal da mucosa, com diferenciação serrilhada da porção superficial da lesão, também foi observada nos animais p53 $-/-$ e p53 $+/-$ tratados com DSS mostrando uma incidência de 28.6% e 2.2%, respectivamente (**Figura 12**). Este achado não foi observado nos animais p53 $+/+$ tratados com DSS ou em animais que não receberam DSS.

A pseudo-invasão foi detectada em 0% dos animais p53 $-/-$, 3,4% dos animais p53 $+/-$ e 20% dos animais p53 $+/+$ (**Figura 13**). Este achado é comum nos camundongos, provavelmente pela fina camada de *muscularis mucosae* que estes apresentam (BOIVIN et al. 2003). A importância de descrever esta alteração é no intuito de diferenciá-la de uma neoplasia invasiva.

A **Tabela 7** sumariza os achados de lesões não tumorais em animais p53 tratados com DSS.

7 DISCUSSÃO

Estudos prévios demonstraram que o modelo de colite induzida pelo DSS produz aspectos clínicos e histopatológicos muito similares aos observados em pacientes portadores de RU. Foi também descrito o risco do desenvolvimento de tumores colônicos em cobaias, ratos e camundongos decorrentes do uso de DSS, outro aspecto que denota a progressão da doença numa mesma direção daquela observada em humanos. No sentido de aprofundar os conhecimentos na carcinogênese intestinal que ocorre neste modelo, foram avaliados eventos moleculares nas neoplasias intestinais, traçando um paralelo com estudos moleculares em pacientes portadores de colite associados à displasia e câncer. Este trabalho avaliou o status de mutação ou LOH e expressão da proteína para os genes: Trp53, Apc, K-ras e β -catenina. Foram utilizados dois tipos de abordagem para o estudo dos eventos moleculares no modelo de indução de colite e neoplasia pelo uso de DSS. Uma delas é associada à pesquisa de alterações moleculares nas lesões displásicas relacionadas ao modelo de indução de colite pelo uso de DSS/AOM no camundongo SW, que é um animal sadio. Na segunda abordagem avaliaram-se lesões displásicas e câncer e a mutação no genes K-ras que ocorrem num modelo de indução de colite pelo uso de DSS em camundongos alterados geneticamente para o gene Trp53. O estudo do modelo DSS/AOM em SWs, demonstrou que quase a totalidade das lesões displásicas avaliadas (em torno de 85%) apresentaram

translocação da proteína β -catenina para o núcleo, mas não foi detectada a presença da proteína p53 no núcleo das células displásicas. Nestes tumores, apesar da presença de mutação no gene TP53, a positividade nuclear da proteína não é observada (YOSHIDA et al. 2004). TANAKA et al. (2003) também demonstraram os mesmos achados observados neste estudo, quanto à expressão de β -catenina e p53, em modelo de colite induzida por AOM/DSS, mas usando uma outra linhagem de camundongos (Crj: CD-1) (TANAKA et al. 2003). Nenhum outro estudo avaliou simultaneamente o status de mutação do gene k-ras, Trp53 e β -catenina e a LOH do gene Apc no modelo de indução de colite pelo uso de DSS/AOM. Neste estudo, mutações nos genes k-ras e Trp53 não foram observadas e a pesquisa de LOH para o gene Apc não foi informativa. Entretanto, mutação no gene β -catenina foi observada em 85% das lesões avaliadas. Este achado explica a translocação anormal da proteína β -catenina para o núcleo das células nas lesões displásicas estudadas. A proteína β -catenina está envolvida no sistema de adesão entre as células e é considerada uma molécula fundamental na via de sinalização Wnt (MILLER e MOON 1996; KORINEK et al. 1997). Devido a uma inativação do complexo de moléculas APC, GSK-3 β e Axina 1, a proteína β -catenina se transloca da porção lateral da membrana da célula para o núcleo, onde se liga com a proteína Tcf para desencadear a transcrição de vários genes implicados na proliferação e diferenciação das células. A translocação patológica da proteína β -catenina é quase sempre decorrente da mutação ou LOH do gene APC nos tumores esporádicos. Esta também pode ser causada pela mutação no gene β -catenina, apesar desta

ser um evento raro tanto nos tumores esporádicos e ausente nos tumores associados à RU (AUST et al. 2002). Entretanto, quando presente, a mutação de β -catenina nos tumores esporádicos ocorre nos códons 33, 41 e 45, os quais representam motivos onde ocorre a fosforilação por GSK-3 β (Sparks et al. 1998). Em nosso modelo animal (DSS/AOM), as displasias avaliadas demonstraram a presença da mutação no gene β -catenina nos códons 32, 33, 34, 37, 41 e 47. Entretanto, nos tumores de camundongos (ICR) com o uso de apenas AOM para indução da carcinogênese, a mutação do gene β -catenina foi observada nos códons 33, 34, 37 e 41, mas não foi demonstrada mutação nos códons 32 ou 47 (TAKAHASHI e WAKABAYASHI 2004). Em adição, os autores demonstraram alteração da proteína β -catenina em todas as lesões examinadas. A presença de mutação no gene β -catenina também foi estudada em ratos após o uso de diferentes agentes carcinogênicos. A mutação em tumores colônicos induzidos por AOM também se encontra distribuída em vários códons como observada em camundongos tratados com AOM (TAKAHASHI et al. 1998). Porém, com o uso de 1,2 dimetilhidrazina (DMH) a localização da mutação era dependente da dose de carcinógeno usada. Nos ratos que recebiam DMH por 2 a 5 semanas, a mutação do gene β -catenina foi detectada nos códons 32, 33 e 34 (BLUM et al. 2001). Entretanto, quando estes eram tratados com DHM por 20 semanas, as mutações passaram a ser observadas quase que exclusivamente no códon 41 (KOESTERS et al. 2001). A mutação de β -catenina, em nosso estudo, afeta os códons 33, 37 e 41 que codificam resíduos de serina ou treonina, os quais são muito importantes na

fosforilação da proteína β -catenina por GSK-3 β (ABERLE et al. 1997). Acredita-se que mutações que ocorrem nos códons adjacentes aos citados acima, tais como nos códons 32, 34 e 47, também devem afetar a fosforilação da proteína β -catenina e causar um acúmulo desta no citoplasma e sua liberação para agir como um fator de transcrição (TAKAHASHI e WAKABAYASHI 2004).

Neste estudo, não foi observada mutação no gene Trp53, uma característica dos tumores colorretais que se desenvolvem em pacientes com RU (YOSHIDA et al. 2004). Isto pode ser devido ao fato que o modelo animal de colite induzido por DSS/AOM produz uma instabilidade na proteína β -catenina, através da mutação deste gene, que parece ser suficiente para iniciar o desenvolvimento dos tumores. Esta hipótese pode ser corroborada pelo fato de que alteração na expressão da proteína β -catenina, devido à mutações no gene APC ou mesmo no gene β -catenina, é um achado prevalente em tumores colorretais esporádicos ou mesmo em outros tipos de tumores (ILYAS et al. 1997; POLAKIS 1997), demonstrando assim, o potencial oncogênico desta proteína. Todavia, AUST et al. (2001) demonstraram que alterações nos genes APC ou β -catenina não parecem ser um evento importante nos carcinomas relacionados à RU. Em contraste, os autores observaram que a translocação da proteína β -catenina para o núcleo ou citoplasma das células ocorre em 80% destes carcinomas. Uma possível explicação para a ocorrência desta alteração nos tumores de pacientes portadores de RU seria a presença de mutação no gene TP53. CAGATAY e OZTURK (2002) demonstraram que o acúmulo de β -catenina

no núcleo de células de carcinomas hepáticos pode ser decorrente da inativação do gene TP53. Estes achados demonstram que não importa a via de iniciação dos tumores, todos parecem seguir o mesmo padrão em relação à estabilidade da proteína β -catenina.

O oncogene K-ras que está relacionado a várias vias de sinalização e se encontra mutado na maioria das neoplasias esporádicas (40-50%), mas pouco freqüente nos tumores associados à RU (8-25%) (BOS et al. 1987; BELL et al. 1991). Um estudo analisando a mutação no gene k-ras (exon 1) em camundongos tratados com AOM, demonstrou que esta alteração está presente em um pequeno número de tumores colônicos (GUDA et al. 2004). Em contraste, ratos recebendo AOM ou apenas DSS, demonstram uma alta incidência de mutação no gene k-ras, em torno de 60 e 66%, respectivamente (JACOBY et al. 1991; ENDO et al. 2001). Neste estudo, não foi observada mutação do gene k-ras, no modelo de colite induzido por DSS/AOM, correspondendo com achados observados em tumores associados à RU.

A lesão precursora do câncer colorretal associado à RU é chamada de displasia, e é considerada, até o momento, o principal marcador de câncer neste pacientes. A displasia no modelo de indução de colite por DSS/AOM, como em pacientes com RU, é observada na forma plana ou polipóide (DALM). Foi demonstrado que as displasias planas e as DALMs mostram aspectos moleculares diferentes sendo que as lesões planas estão menos associadas com LOH do gene VHL e com um aumento da expressão da proteína p53 (FOGT et al. 1998; WONG et al. 2000). Este estudo não

demonstrou nenhuma diferença molecular entre os dois tipos de displasia. Estes achados não excluem a possibilidade de origens diferentes entre elas. Alterações que representam diferenças entre displasias planas e DALMs no modelo de colite induzido por DSS/AOM podem estar relacionadas a outros genes que ainda não foram investigados.

Os achados observados no modelo de colite induzida por DSS em animais deficientes em p53 demonstraram similaridades, diferenças e adições a um estudo publicado recentemente usando o mesmo modelo animal (FUJII et al. 2004). FUJII et al. (2004) relataram uma incidência de tumores em animais p53^{-/-} tratados com DSS muito similar à observada no presente estudo (100% vs 93%, respectivamente). Entretanto, este estudo observou uma inversão na incidência de tumores em animais p53^{+/-} e p53^{+/+} quando comparada com o estudo dos autores citados acima. Observamos uma incidência de apenas 21% nos animais p53^{+/-}, em contraste com a incidência de 46%. Porém, a incidência de tumores em animais p53^{+/+} foi maior no presente estudo que no estudo dos demais autores (40% vs 13,3%). Entretanto, apesar de uma menor incidência no total de tumores observado neste estudo, a incidência de neoplasias infiltrando a submucosa foi muito mais elevado que os índices de FUJII et al. (2004) (33% vs 0.3%, respectivamente). A variação no número de tumores entre os dois estudos pode ser explicado pelo *background* dos camundongos usados, pois já foi demonstrado que algumas linhagens de camundongos são mais sensíveis que outras na formação de tumores (NAMBIAR et al. 2003). Este estudo utilizou animais deficientes em p53 e

controles com um *background* de camundongos C57BL/6 enquanto FUJII et al. (2004) usaram um *background* misto de camundongos C57BL/6 x CBA.

O modelo de colite induzida por DSS em animais geneticamente alterados para o gene Trp53, além de demonstrar displasias e cânceres muito semelhantes com os observados em pacientes com RU, também demonstrou lesões benignas que são observadas nestes pacientes. Em nosso estudo, foram observadas lesões císticas e lagos de mucina localizados na submucosa da parede intestinal de camundongos deficientes em p53, que são muito semelhantes à lesão designada como colite cística profunda (GOODALL e SICLAIR 1957). Há apenas um relato na literatura, de 1969, descrevendo a presença de colite cística profunda em camundongos (BRYNJOLFSSON e LOMBARD 1969). Os autores demonstraram a presença de cistos de mucina associada ao prolapso retal observado em poucos animais, mas não descreve o uso de nenhuma substância para a indução de colite ou mesmo se estes animais apresentavam inflamação no cólon distante da área do prolapso. As imagens apresentadas no estudo são muito similares a carcinoma, pois apresentam um moderado grau de atipia e consta de várias glândulas, algumas delas apresentando um aspecto cribriforme. Até o momento, cerca de 30 casos no total foram descritos na literatura como presentes em humanos em associação com a RU. Apesar das lesões descritas em humanos ou nestas observadas no presente estudo não demonstrarem nenhum grau de atipia nas células que revestem as glândulas ou mesmo na mucosa superficial acima da lesão, ainda assim existe a dúvida se é uma lesão benigna ou um

carcinoma sem a presença de atipia. Para colaborar com a hipótese de malignidade, Ridell e colaboradores descreveram que muitos dos adenocarcinomas em pacientes com RU mostram áreas de invasão bem definida, mas o epitélio superficial apresenta pouca atipia, às vezes compatível com uma displasia de baixo-grau (RIDDELL et al. 1983).

Alem da colite cística profunda, também observamos a presença de lesão hiperplásica na mucosa intestinal dos animais p53^{-/-} e p53^{+/-} tratados com DSS, mas não dos animais p53^{+/+}. Estas lesões se encontravam distantes das displasias e cânceres e demonstravam um espessamento da mucosa intestinal de quase duas vezes mais a espessura usual e um aspecto serrilhado na porção superficial (RIDDELL et al. 1983). A incidência de hiperplasia foi maior nos animais p53^{-/-} (28.6%) que nos animais p53^{+/-} (2.2%). HARVEY et al. (1993b) demonstraram que fibroblastos de camundongos p53^{-/-} passavam por várias passagens por um longo período de tempo (por mais de 50 passagens) e nunca entravam em fase de envelhecimento ou não-proliferação, diferente dos fibroblastos de animais p53^{+/-} e p53^{+/+}. E teorizaram que a perda de p53 pode ser insuficiente para induzir a imortalização destas células, mas ocorre uma falha na indução destas ao processo de envelhecimento, sugerindo que a deficiência de p53 predispõe as células a adquirir alterações, as quais induzem a imortalização. Estes achados podem explicar a presença da hiperplasia nos camundongos deficientes em p53, onde a perda da função de p53 levaria ao não envelhecimento das células e persistência destas ao longo da mucosa, acarretando a aparência hiperplásica.

O modelo de DSS nos animais alterados geneticamente para o gene Tp53, também não demonstrou mutação do gene k-ras em nenhuma das lesões avaliadas, colaborando com os achados observados no modelo de indução de colite pelo uso de DSS/AOM em camundongos saudáveis. Estas observações suportam a hipótese de que mutação do gene k-ras não é um evento observado em camundongos com colite induzida por DSS.

Novos estudos no intuito de desvendar as alterações moleculares no modelo de colite induzida por DSS continuam sendo realizados por nosso grupo. Acreditamos que um melhor entendimento das bases moleculares na carcinogênese colorretal em modelos animais de colite, possa ajudar na descoberta de marcadores para as neoplasias associadas à RU e no desenvolvimento de regimes quimiopreventivos mais eficientes.

8 CONCLUSÃO

- ▶ O modelo animal de colite induzida por DSS/AOM mostra similaridades com respeito às displasias colorretais associadas à RU em humanos quando se tratando da translocação da proteína β -catenina.
- ▶ A mutação do gene β -catenina apesar de não ser um achado frequente na carcinogênese dos tumores colorretais associados à RU, esta tem um papel importante na carcinogênese dos tumores colônicos de camundongos com colite induzida por DSS/AOM.
- ▶ Parece evidente que a falta de regulação da proteína β -catenina é um evento primordial para o desenvolvimento dos tumores colorretais esporádicos, relacionados à RU e também dos tumores colônicos em camundongos com uso de DSS e AOM.
- ▶ O modelo animal de colite induzida por DSS em camundongos deficientes para o gene p53 mostra similaridades com respeito às características morfológicas das displasias e dos carcinomas colorretais quando comparadas com aos mesmos tumores em pacientes portadores de RU.
- ▶ O gene k-ras não tem um papel importante na carcinogênese dos tumores associados a colite em camundongos com o uso de DSS.

9 TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Incidência do câncer colorretal (CCR) por categoria de risco.

Risco médio (esporádico; sem fator de risco identificável)	75%
História de CCR na família	15 a 20%
CCR hereditário sem polipose (HNPCC)	3 a 8%
Polipose Adenomatosa Familiar (FAP)	1%
Retocolite Ulcerativa	1%

Tabela 2 - Fatores associados com o risco do CCR em pacientes portadores da RU.

FATORES QUE AUMENTAM O RISCO	FATORES DE PROTEÇÃO PARA O CCR
<ul style="list-style-type: none"> • Duração da doença • Extensão do envolvimento colônico • História familiar de CCR • Colangite Esclerosante Primária • Início precoce da doença (jovens ou crianças) • Severidade da inflamação 	<ul style="list-style-type: none"> • Colectomia profilática • Programas de rastreamento e seguimento • Uso de anti-inflamatórios

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores de amplificação para k-ras, β -catenina e Trp53.

SEQUÊNCIA			
Gene	Senso 5'	Antisenso 5''	Exon
K-ras	TTATTATTTTTATTGTA	GCACGCAGACTGTAGAG	1
β -catenina	GCCTTTCTAACAGTATT	GCCCTTCCTTCAACCCA	3
Trp 53	TACTCTCCTCCCCTCAAT	CGGGAGATGGGAGGCTGC	5
Trp 53	GGGGTTAGGACTGGCAGC	CTAAGACGCACAAACCAA	6
Trp 53	CTGTAGTGAGGTAGGGAG	GGAACAGAAACAGGCAGA	7
Trp 53	CTTACTGCCTTGTGCTGG	GAGGTGACTTTGGGGTGA	8

Tabela 4 - Mutação do gene β -catenina em lesões colônicas em modelo de colite induzida por DSS/AOM.

Mutação do gene β-catenina no exon 3		
Códon	Alteração	Substituição (amino-ácido)
32	GAT → AAT	Asp → Asn
32	GAT → GGT	Asp → Gly
33	TCT → TTT	Ser → Phe
34	GGA → GAA	Gly → Glu
37	TCT → TTT	Ser → Phe
41	ACC → ATC	Thr → Ile
47	AGT → AGG	Ser → Arg

Tabela 5 - Alterações nos exons 6 e7 do gene Trp53 em animal SW.

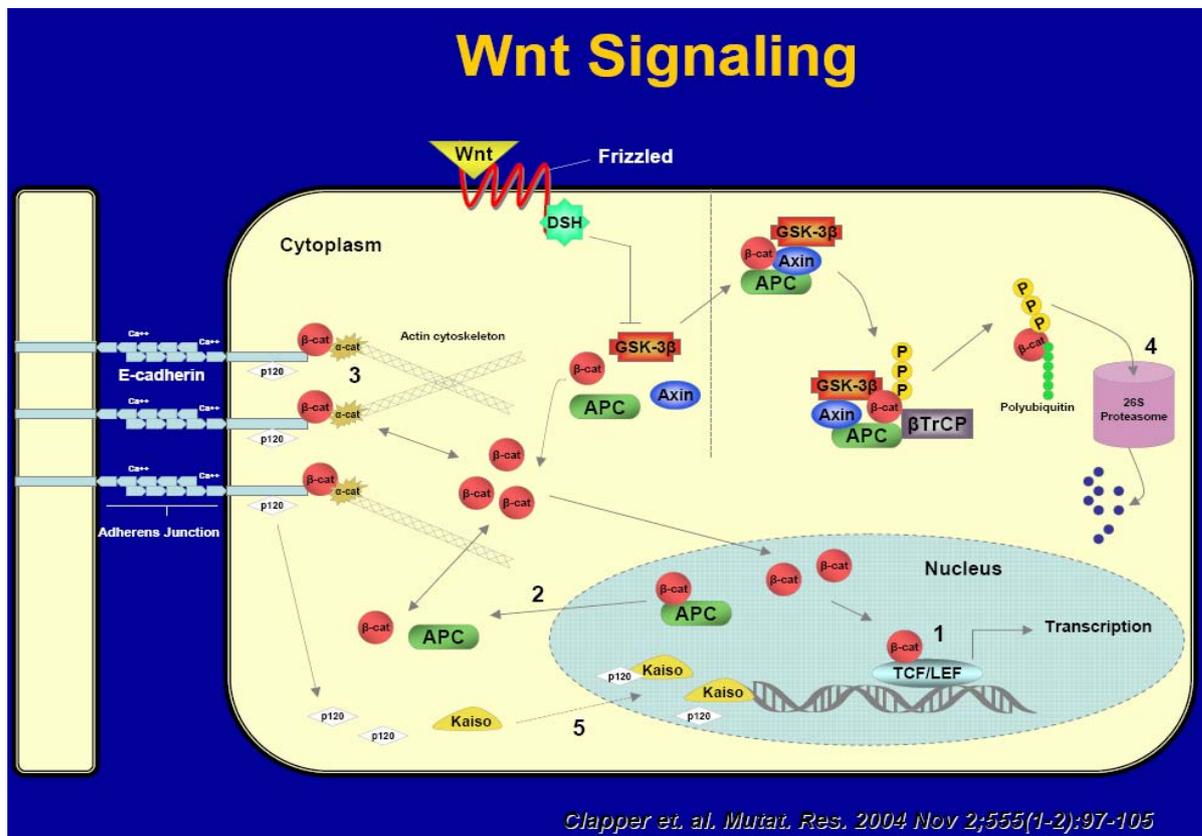
Exon	Posição	Substituição (amino-ácido)	códon
6	320 (C>T)	CCG>CTG (Pro > Leu)	81
6	348 (T>C)	AGT>AGC (Ser > Ser)	90
7	843 (A>G)	ATA>ATG (Ile > Met)	121

Tabela 6 - Distribuição dos tumores colônicos em animais p53, tratados com DSS.

Tipos de lesões	p53 ^{-/-}	p53 ^{+/-}	p53 ^{+/+}
Câncer plano	33.3% (5/15)	15% (3/20)	0%
Câncer polipóide	13.3% (2/15)	5% (1/20)	0%
Câncer Indeterminado	0%	5% (1/20)	0%
Displasia plana	40% (6/15)	0%	0%
Displasia polipóide	0%	70% (14/20)	100% (4/4)
Lesões indefinidas	13.3% (2/15)	5% (1/20)	0%

Tabela 7 - Lesões não neoplásicas em animais p53, tratados com DSS.

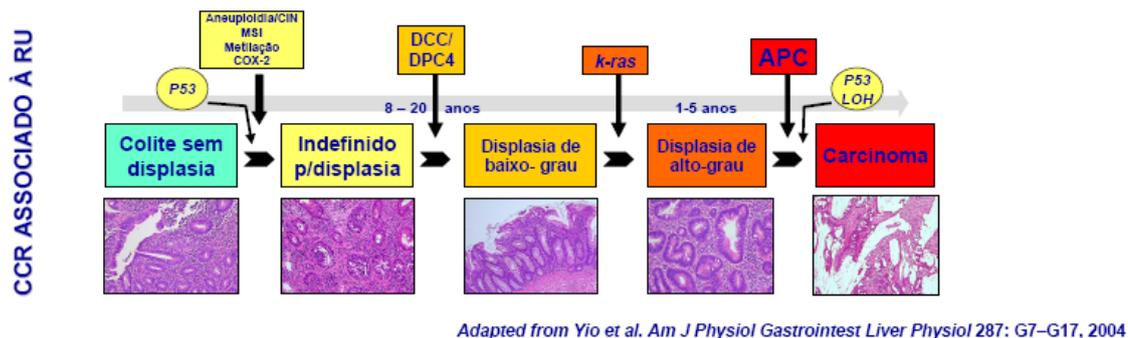
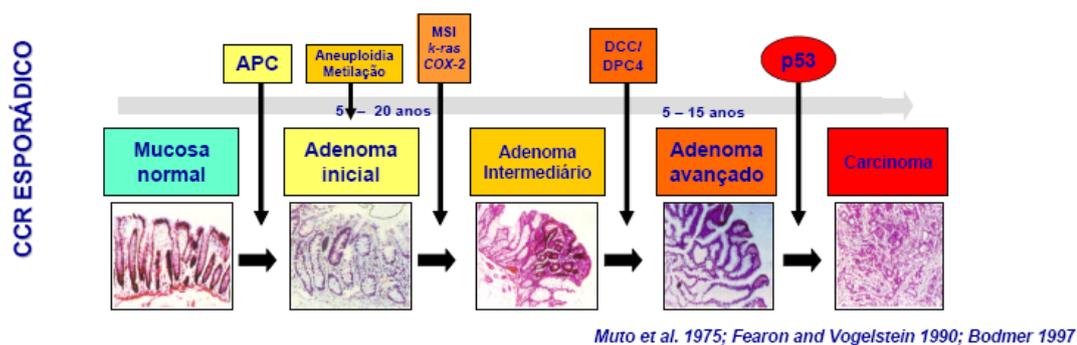
	p53 ^{-/-}	p53 ^{+/-}	p53 ^{+/+}
% Animal com lesões mucinosas	7% (1/14)	3.4% (3/89)	0%
i) com glândulas	0%	1.1% (1/89)	0%
ii) sem glândulas	7% (1/14)	2.2% (2/89)	0%
% Animais com pseudoinvasão	0%	3.4% (3/89)	20% (2/10)
% Animais com hiperplasia	28.6% (4/14)	2.2% (2/89)	0%



Legenda: As glicoproteínas Wnts são capazes de realizarem uma sinalização de forma parácrina e autócrina. Fisiologicamente, estas proteínas formam um complexo com a proteína transmembrana, denominada Frizzled, e liberam a molécula β -catenina do chamado complexo de destruição, o qual, na ausência de Wnts, promove a degradação desta via ubiquitinação-proteossoma. Subseqüentemente, β -catenina livre se dirige para o núcleo da célula e se associa com fatores que se ligam ao DNA para promover a transcrição de certos genes fundamentais na proliferação celular. Quando ocorre uma mutação no gene APC ou em qualquer gene membro do complexo de degradação da β -catenina, esta desencadeia a formação de uma proteína constitutivamente ativa.

Fonte: Adaptado de CLAPPER et al. (2004).

Figura 1 - Esquema simplificado da via de sinalização Wnt.



Legenda: As mesmas vias de sinalização parecem estar alteradas na carcinogênese dos tumores colorretais esporádicos e daqueles associados à RU. Entretanto, o momento de ocorrência e a frequência com que estas vias se manifestam parece ser o principal fator que diferencia estes dois tipos de tumores.

Fonte: Adaptado de ITZKOWITZ e YIO (2004).

Figura 2 - Carcinogênese colorretal nos tumores esporádicos e associados à RU.

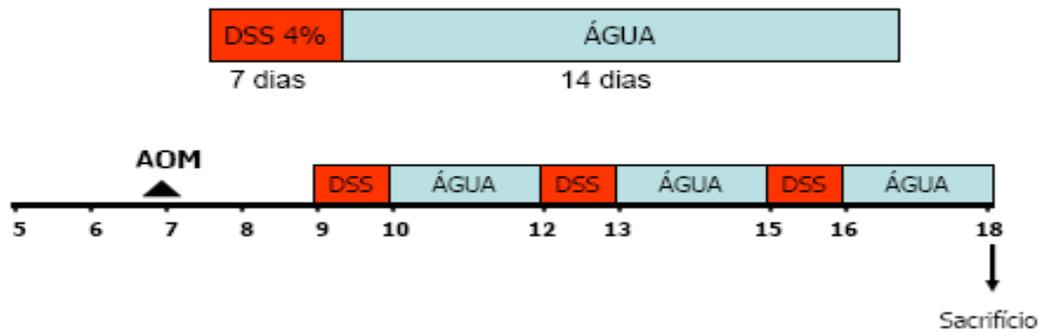
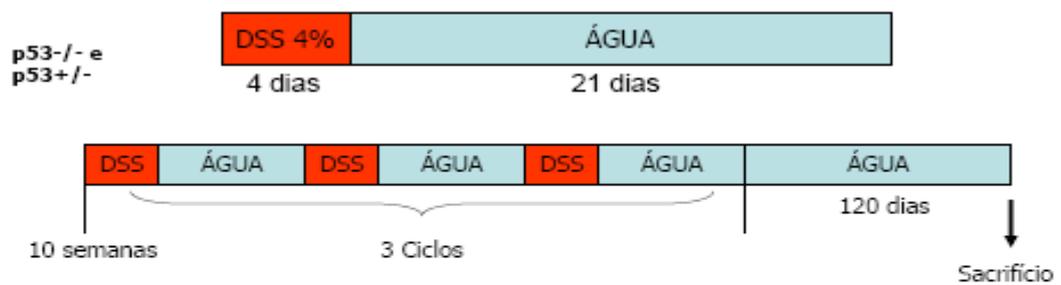
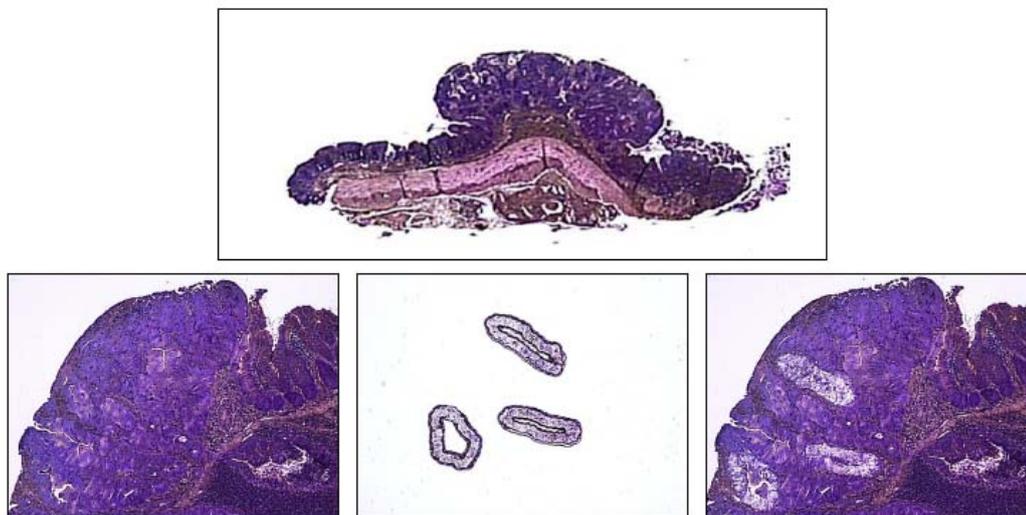
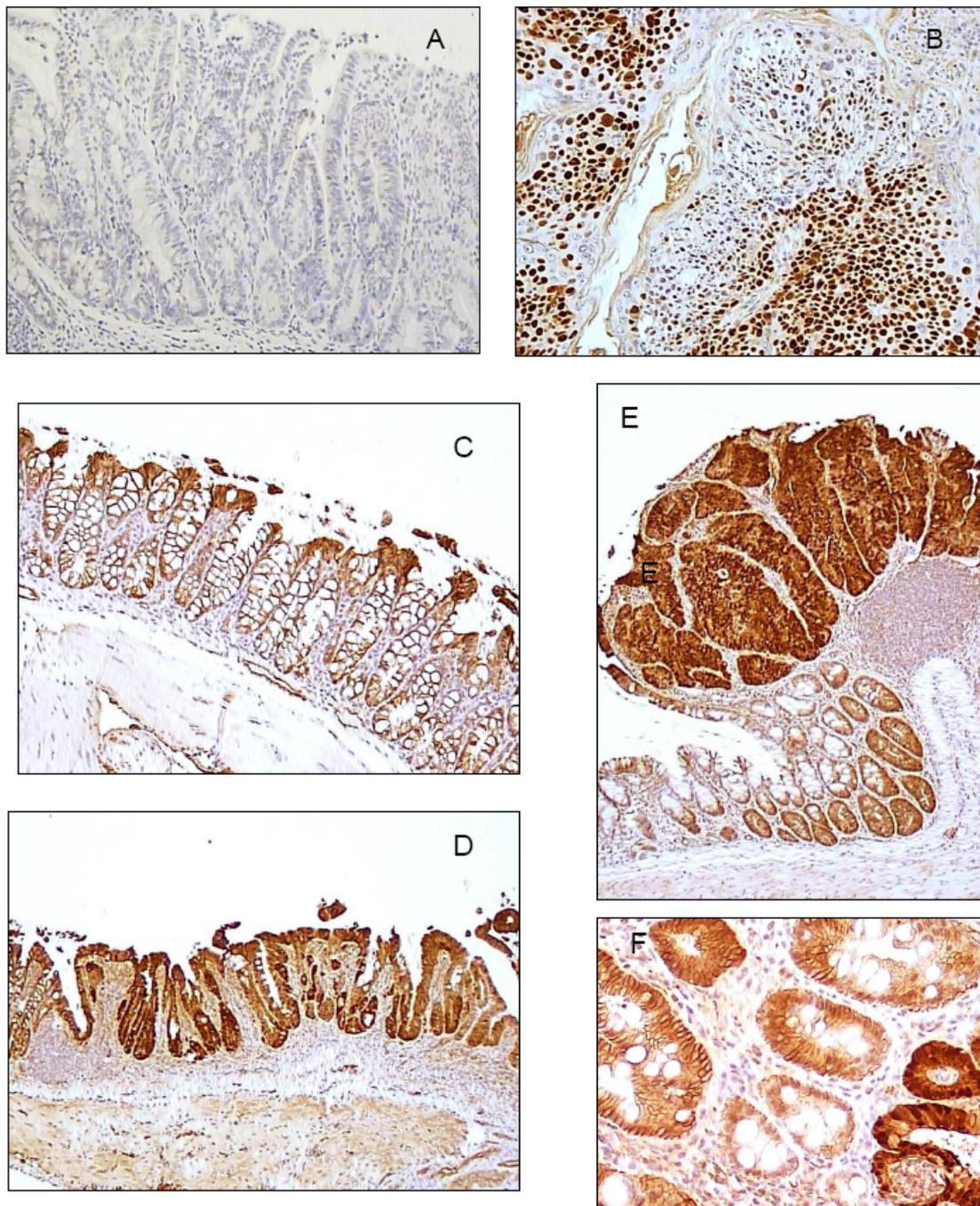
SWISS WEBSTERp53p53+/+

Figura 3 - Esquema de indução de colite nos animais SW e p53.



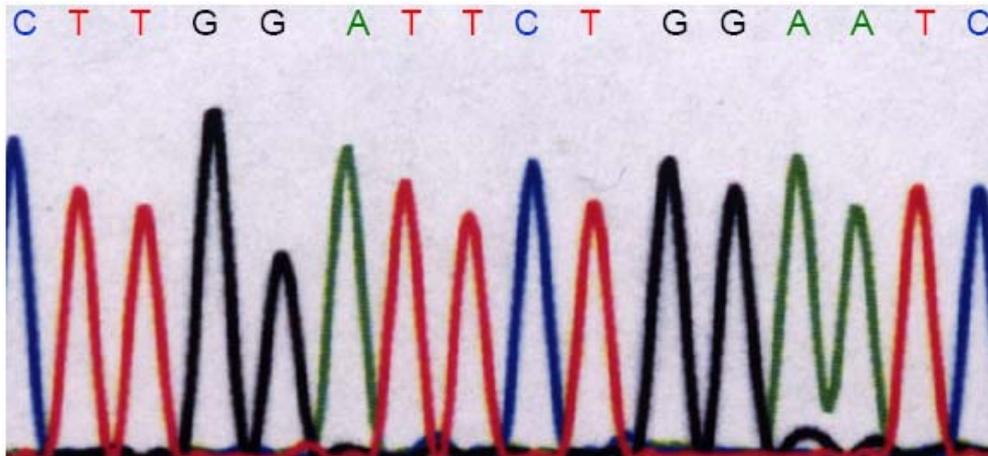
Legenda: LCM de uma lesão polipóide representada na foto superior. A foto abaixo à esquerda mostra a área antes de ser microdissecada. A foto abaixo em região central representa células displásicas dissecadas e aderidas ao filme da cápsula de dissecção. A foto abaixo à direita mostra o tecido após a dissecção com o espaço vazio na área dissecada.

Figura 4 - Representação do procedimento de LCM.



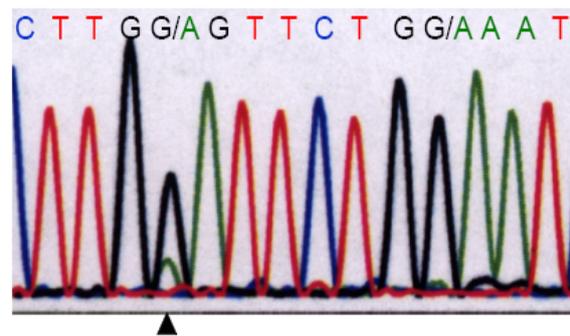
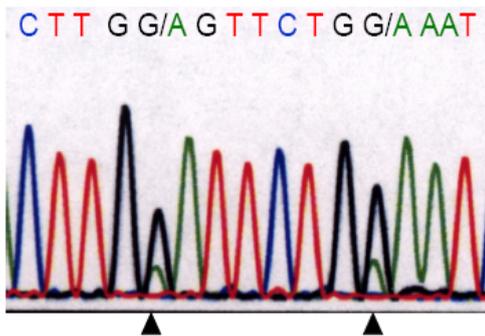
Legenda: **A)** Ausência de positividade para o anticorpo contra p53 em uma lesão displásica do cólon. **B)** Positividade nuclear em carcinoma escamoso de pele de camundongo, servindo como controle da reação. **C)** Localização de β -catenina na membrana celular em mucosa colônica preservada. **D)** Positividade nuclear e citoplasmática de β -catenina em displasia plana. **E)** Positividade nuclear e citoplasmática de β -catenina em DALM. **F)** Presença de aspecto heterogêneo da positividade de β -catenina nas células displásicas.

Figura 5 - Estudo imunohistoquímico: proteínas p53 e β -catenina em modelo de colite induzida por DSS/AOM.



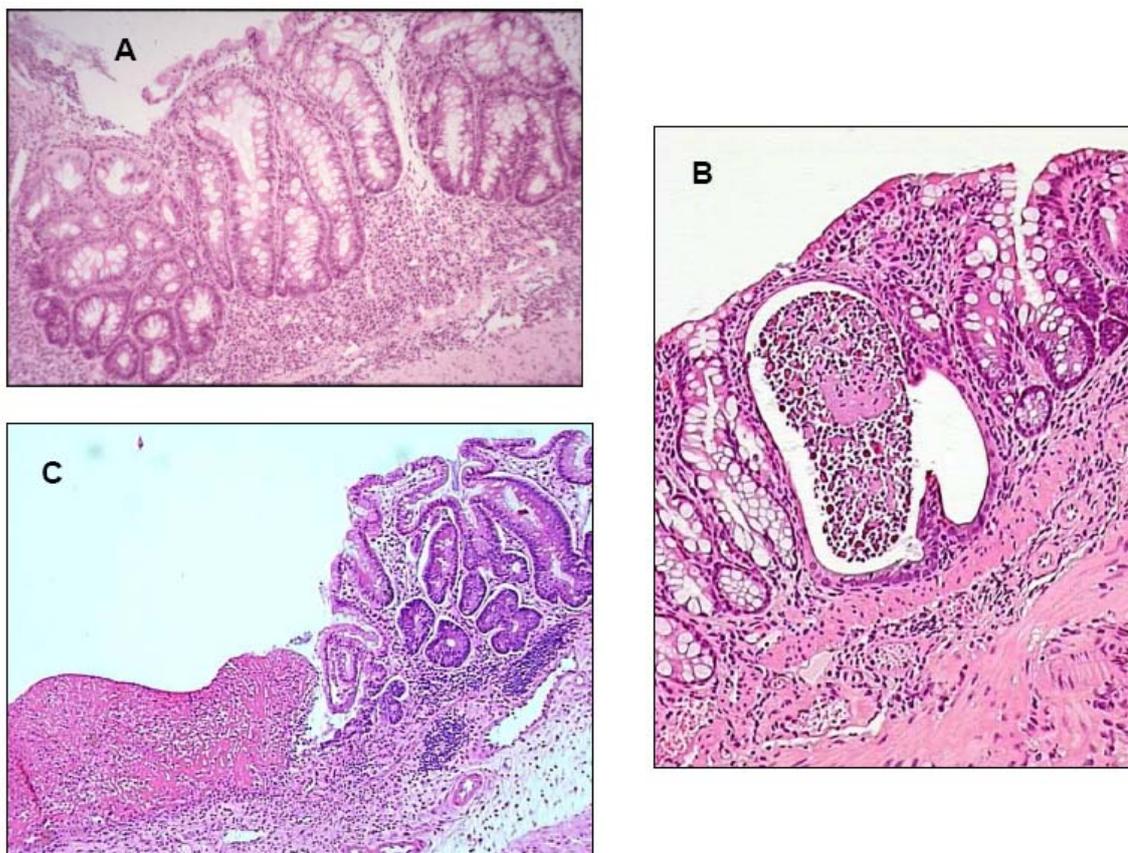
Codons 32 e 34

Codon 32



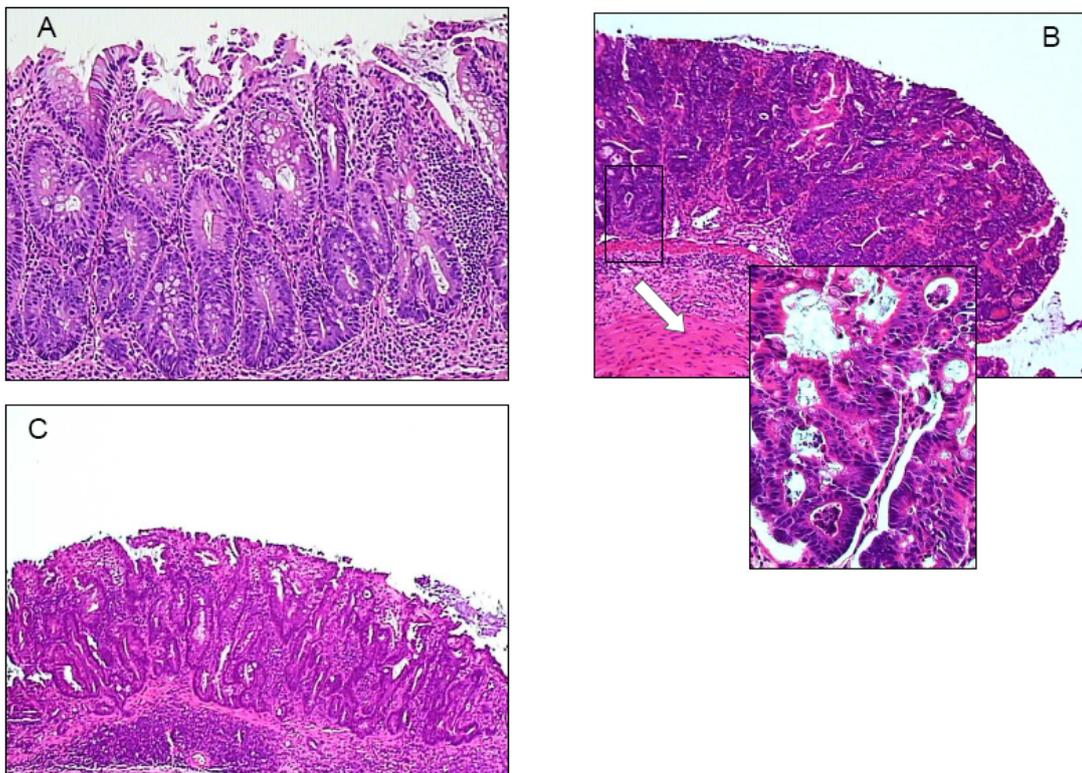
Legenda: A seqüência demonstrada no quadro superior representa códon 32 e 34 avaliadas em tecido controle e que não apresenta mutação. Os quadros abaixo demonstram mutações nos códon 32 e 34 (à esquerda) e mutação no códon 32 (à direita) identificado pelas setas.

Figura 6 - Seqüências representando mutação do gene β -catenina em modelo de colite induzida por DSS/AOM.



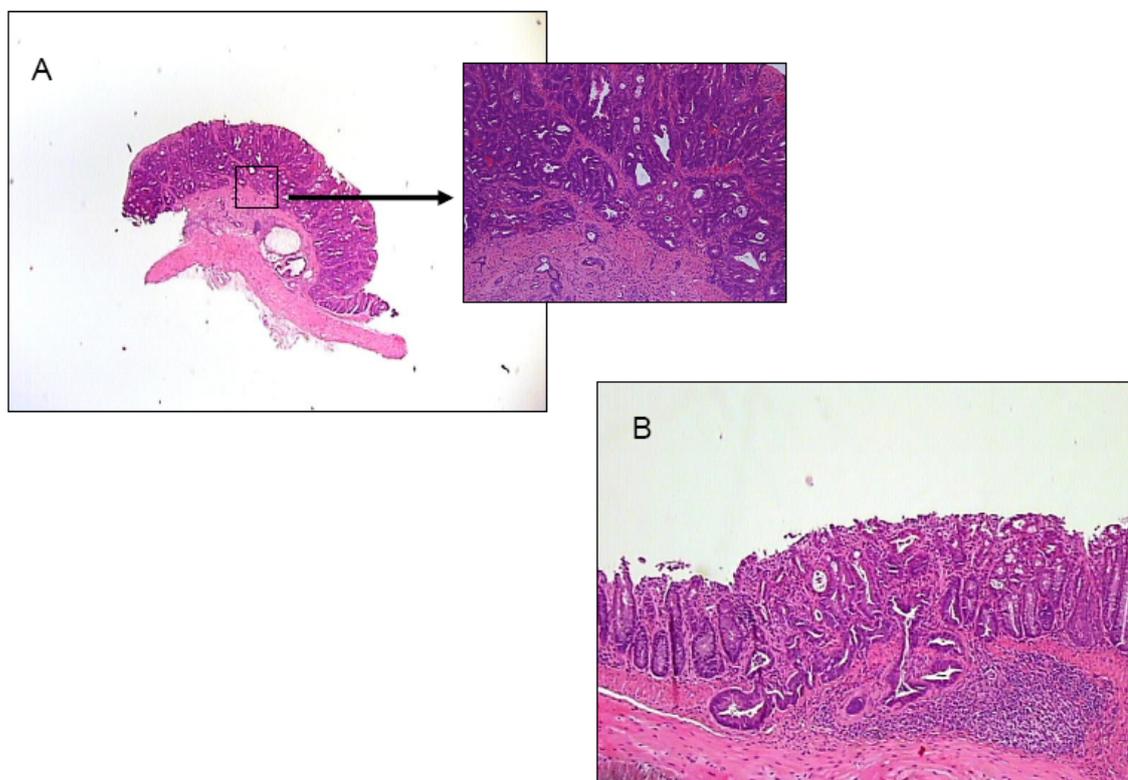
Legenda: **A)** Presença de um infiltrado inflamatório crônico e distorção das criptas na mucosa intestinal. **B)** Processo inflamatório crônico da mucosa intestinal com a presença de criptite. **C)** Presença de ulceração aftosa, compatível com atividade da doença.

Figura 7 - Processo inflamatório envolvendo a mucosa intestinal dos camundongos deficientes para o gene *Trp53* tratados com DSS.



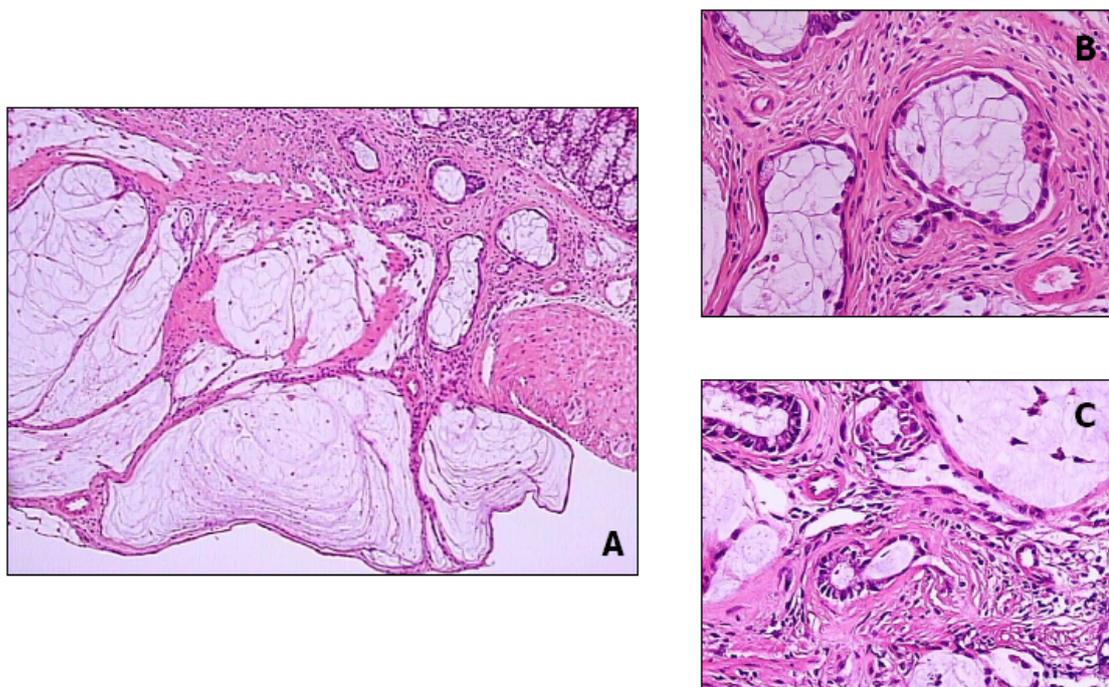
Legenda: **A)** Lesão diagnosticada como indefinida, pois apesar de alterações como hiperchromasia nuclear a superfície da lesão ainda mantém um aspecto normal. **B)** Presença de displasia plana e **C)** Lesão displásica polipóide. No quadro, observa o aspecto cribriforme das glândulas.

Figura 8 - Classificação de displasia em camundongos deficientes para o gene Trp53 com o uso de DSS.



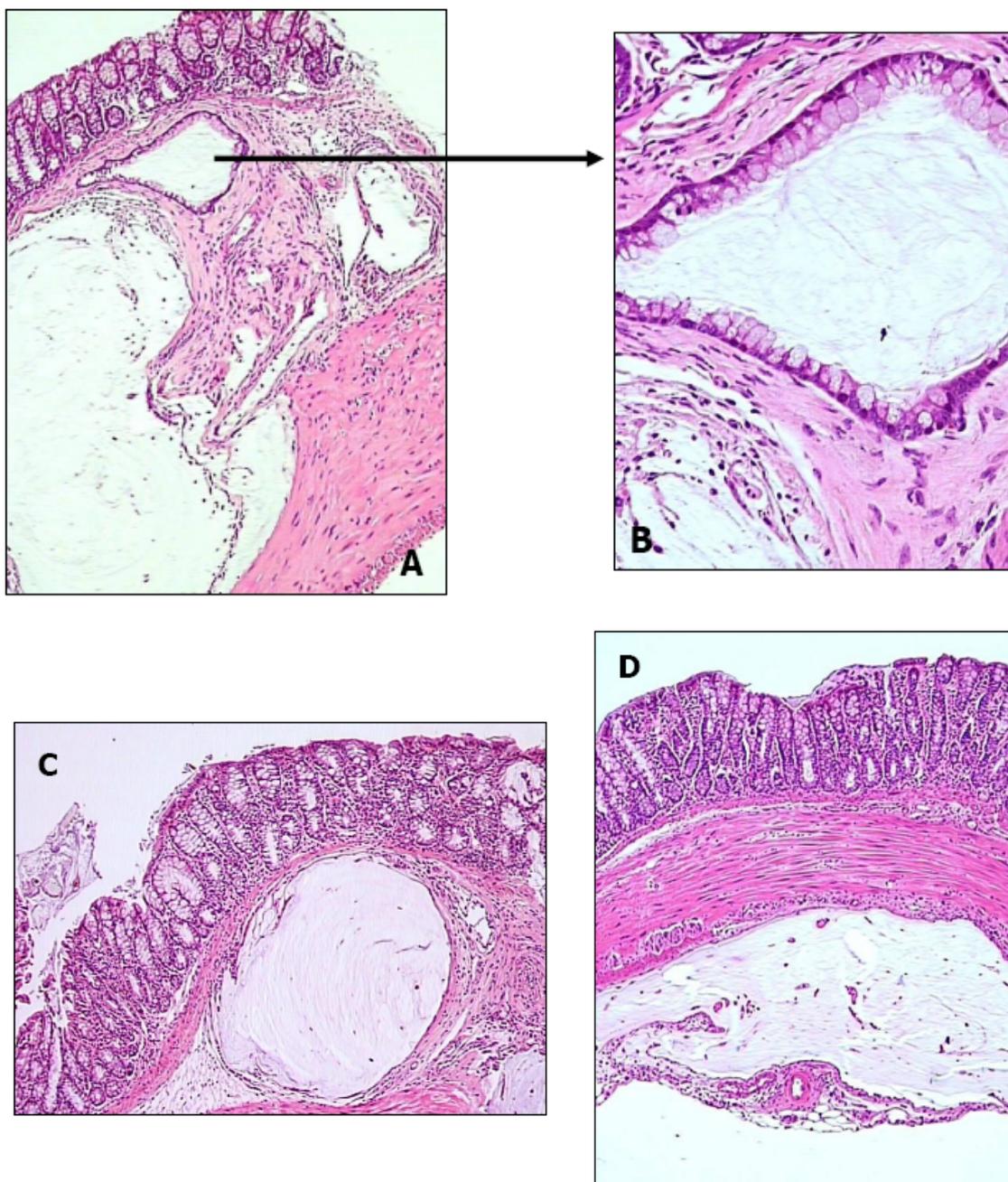
Legenda: **A)** Câncer com aspecto polipóide. No quadro, observa-se o aspecto infiltrativo da lesão através da submucosa. **B)** Câncer com aspecto plano.

Figura 9 - Câncer em camundongos deficientes para gene Trp53 tratados com DSS.



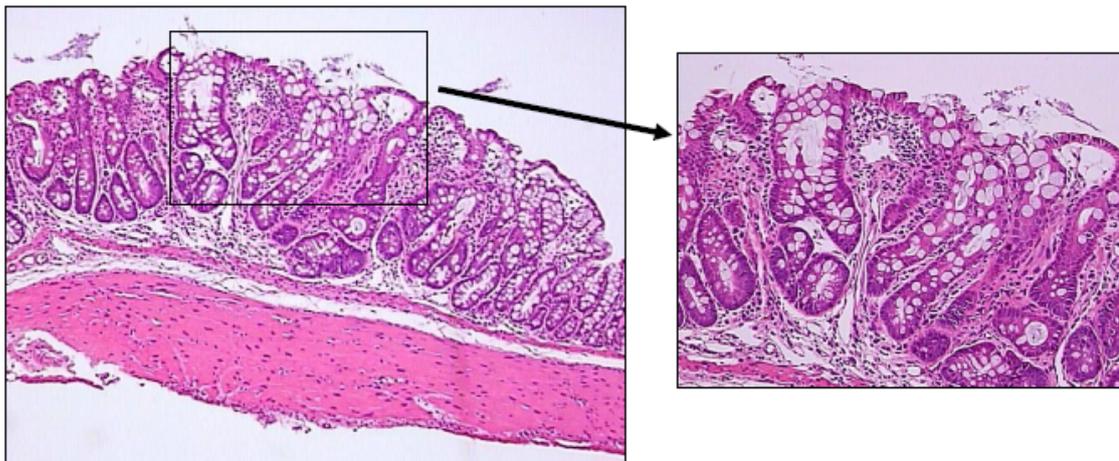
Legenda: **A)** Câncer mucinoso em pequeno aumento. **B)** Note a presença de um brotamento de células oriundo de uma glândula maior. **C)** Presença de intensa desmoplasia ao redor de glândulas com formato irregular.

Figura 10 - Câncer mucinoso nos animais deficientes para o gene Trp53 tratados com DSS.



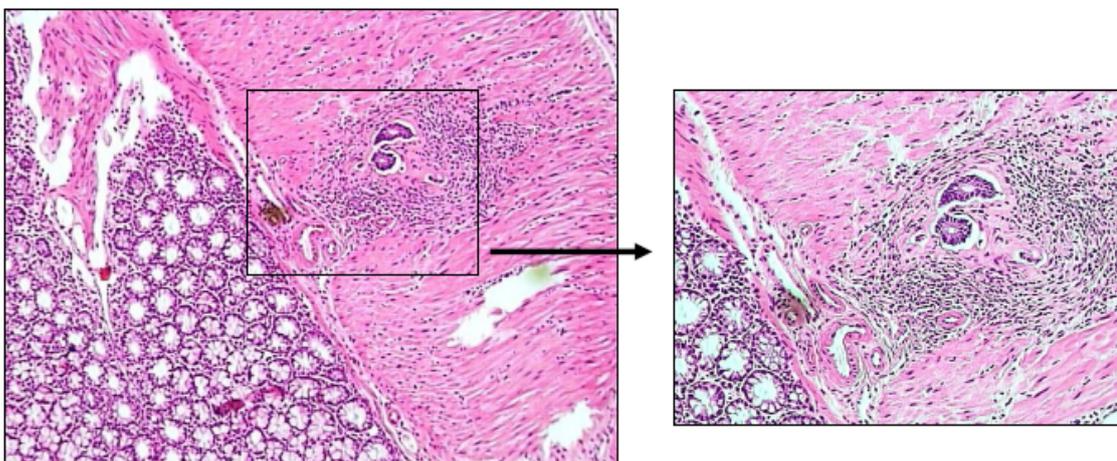
Legenda: **A)** Presença de glândulas dilatadas e lagos de mucina permeando a submucosa. **B)** Esta foto é um detalhe da foto anterior onde se observa um epitélio similar ao observado na mucosa normal com várias células caliciformes e apresentando núcleos arredondados e sem atipia. **C)** e **D)** Presença de lagos de mucina desprovidos de epitélio de revestimento na submucosa e serosa da parede intestinal, respectivamente.

Figura 11 - Colite cística profunda em camundongos deficientes para o gene Trp53 tratados com DSS.



Legenda: Mucosa mostrando espessamento. No detalhe observa-se na porção superficial um aspecto serrilhado um achado típico dos pólipos hiperplásticos que ocorrem em humanos.

Figura 12 - Hiperplasia da mucosa intestinal dos animais deficientes para o gene Trp53 tratados com DSS.



Legenda: Presença de pequenas glândulas na parede intestinal. No detalhe observa-se um infiltrado inflamatório crônico ao redor das glândulas e não se observa desmoplasia.

Figura 13 - Pseudoinvasão em animais deficientes para o gene Trp53 e controles tratados com DSS.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. **Embo J** 1997; 16:3797-804.

Askling JPW, Dickman PW, Karlen P, et al. Colorectal cancer rates among first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. **Lancet** 2001a; 357:262-6.

Askling JPW, Dickman PW, Karlen P, et al. Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology** 2001b; 120:1356-62.

Aust DERF, Willenbacher RF, Terdiman JP, et al. Chromosomal alterations in ulcerative colitis-related and sporadic colorectal cancers by comparative genomic hybridization. **Hum Pathol** 2000; 31:109-14.

Aust DEJP, Terdiman JP, Willenbacher RF, et al. Altered distribution of beta-catenin and its binding proteins E-cadherin and APC in ulcerative colitis-related colorectal cancers. **Mod Pathol** 2001; 14:29-39.

Aust DEJP, Terdiman JP, Willenbacher RF, et al. The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. **Cancer** 2002; 94:1421-7.

Bell SMSA, Kelly SA, Hoyle JA, et al. c-Ki-ras gene mutations in dysplasia and carcinomas complicating ulcerative colitis. **Br J Cancer** 1991; 64:174-8.

Benhattar J, Saraga E. Molecular genetics of dysplasia in ulcerative colitis. **Eur J Cancer** 1995; 31A:1171-3.

Bernstein CNF, Shanahan F, Weinstein WM. Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? **Lancet** 1994; 343:71-4.

Bernstein CN. Cancer surveillance in inflammatory bowel disease. **Curr Gastroenterol Rep** 1999; 1:496-504.

Blackburn A, Doe WF, Buffinton GD. Colonic antioxidant status in dextran sulfate-induced colitis in mice. **Inflamm Bowel Dis** 1997; 3:198-203.

Blackstone MORH, Riddell RH, Rogers BH, Levin B. Dysplasia-associated lesion or mass (DALM) detected by colonoscopy in long-standing ulcerative colitis: an indication for colectomy. **Gastroenterology** 1981; 80:366-74.

Blake JAJT, Eppig JT, Richardson JE, Bult CJ, Kadin JA. The Mouse Genome Database (MGD): integration nexus for the laboratory mouse. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:91-4.

Blum CAM, Xu M, Orner GA, et al. beta-Catenin mutation in rat colon tumors initiated by 12-dimethylhydrazine and 2-amino-3-methylimidazo[45-f]quinoline and the effect of post-initiation treatment with chlorophyllin and indole-3-carbinol. **Carcinogenesis** 2001; 22:315-20.

Bodmer WFCJ, Bailey CJ, Bodmer J, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. **Nature** 1987; 328:614-6.

Bodmer W. The somatic evolution of cancer. The Harveian Oration of 1996. **J R Coll Physicians Lond** 1997; 31:82-9.

Boivin GPK, Washington K, Yang K, et al. Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations. **Gastroenterology** 2003; 124:762-77.

Bos JLER, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. **Nature** 1987; 327:293-7.

Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. **Mutat Res** 1988; 195:255-71.

Brentnall TADA, Crispin DA, Rabinovitch PS, et al. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. **Gastroenterology** 1994; 107:369-78.

Brentnall TACE, Rubin CE, Crispin DA, et al. A germline substitution in the human MSH2 gene is associated with high-grade dysplasia and cancer in ulcerative colitis. **Gastroenterology** 1995; 109:151-5.

Brentnall TARC, Haggitt RC, Rabinovitch PS, et al. Risk and natural history of colonic neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. **Gastroenterology** 1996; 110:331-8.

Brynjolfsson G, Lombard LS. Colitis cystica in mice. **Cancer** 1969; 23:225-9.

Burmer GCDS, Levine DS, Kulander BG, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. c-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. **Gastroenterology** 1990; 99:416-20.

Butt JHF, Konishi F, Morson BC, Lennard-Jones JE, Ritchie JK. Macroscopic lesions in dysplasia and carcinoma complicating ulcerative colitis. **Dig Dis Sci** 1983; 28:18-26.

Cagatay T, Ozturk M. P53 mutation as a source of aberrant beta-catenin accumulation in cancer cells. **Oncogene** 2002; 21:7971-80.

Chang CLG, Marra G, Chauhan DP, et al. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. **Am J Physiol Cell Physiol** 2002; 283:C148-54.

Chaubert PJ, Benhattar J, Saraga E, Costa J. K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis. **Am J Pathol** 1994; 144:767-75.

Clapper MLJ, Coudry J, Chang WC. beta-catenin-mediated signaling: a molecular target for early chemopreventive intervention. **Mutat Res** 2004; 555:97-105.

Collins RH, Jr. Feldman M, Fordtran JS. Colon cancer dysplasia and surveillance in patients with ulcerative colitis: a critical review. **N Engl J Med** 1987; 316:1654-8.

Connell WRJE, Lennard-Jones JE, Williams CB, Talbot IC, Price AB, Wilkinson KH. Factors affecting the outcome of endoscopic surveillance for cancer in ulcerative colitis. **Gastroenterology** 1994; 107:934-44.

Connell WRIC, Talbot IC, Harpaz N, et al. Clinicopathological characteristics of colorectal carcinoma complicating ulcerative colitis. **Gut** 1994; 35:1419-23.

Cooper HSSN, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. **Lab Invest** 1993; 69:238-49.

Cooper HSS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H, Flanigan A. Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model: relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. **Carcinogenesis** 2000; 21:757-68.

Cooper HSL, Everley IC, Harpaz N, et al. The role of mutant Apc in the development of dysplasia and cancer in the mouse model of dextran sulfate sodium-induced colitis. **Gastroenterology** 2001; 121:1407-16.

Coudry RA, Cooper HS, Gary M, Lubet RA, Chang W-CL, Clapper ML. Correlation of inhibition of colitis-associated dysplasia by celecoxib with degree of inflammation in the mouse model of DSS-induced colitis [abstract]. **Proc Am Assoc Cancer Res** 2004; 45:A2368.

Crohn BB, Rosenberg H. The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). **Am J Med Sci** 1925; 170:220-8.

Delker DAQS, Wang QS, Papanikolaou A, Whiteley HE, Rosenberg DW. Quantitative assessment of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in inbred mice. **Exp Mol Pathol** 1999; 65:141-9.

Donehower LAM, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature** 1992; 356:215-21.

Donehower LA, Bradley A. The tumor suppressor p53. **Biochim Biophys Acta** 1993; 1155:181-205.

Dutrillaux B. Pathways of chromosome alteration in human epithelial cancers. **Adv Cancer Res** 1995; 67:59-82.

Eaden JK, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. **Aliment Pharmacol Ther** 2000; 14:145-53.

Eaden JAKR, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. **Gut** 2001; 48:526-35.

Edwards FC, Truelove SC. The Course and Prognosis of Ulcerative Colitis. lli. Complications. **Gut** 1964; 32:1-22.

Ekbom AC, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. **Lancet** 1990a; 336:357-9.

Ekbom AC, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. **N Engl J Med** 1990b; 323:1228-33.

el-Deiry WSJW, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res** 1994; 54:1169-74.

Endo TK, Ookawa K, Tanaka M, Nakaji S, Tsuchida S, Sugawara K. Differences in carcinogenesis by the length of carcinogen exposure period in rat colon. **Dig Dis Sci** 2001; 46:109-17.

Engelsjerd M, Farraye FA, Odze RD. Polypectomy may be adequate treatment for adenoma-like dysplastic lesions in chronic ulcerative colitis. **Gastroenterology** 1999; 117:1288-94; discussion 1488-91.

Epstein SE, Ascari WQ, Ablow RC, Seaman WB, Lattes R. Colitis cystica profunda. **Am J Clin Pathol** 1966; 45:186-201.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.

Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. **Ann N Y Acad Sci** 1995; 768:101-10.

Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, et al. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with

hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene hMLH1. **Cancer Res** 2000; 60:4864-8.

Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. **Nat Cell Biol** 2001; 3:433-8.

Fogt F, Vortmeyer AO, Stolte M, et al. Loss of heterozygosity of the von Hippel Lindau gene locus in polypoid dysplasia but not flat dysplasia in ulcerative colitis or sporadic adenomas. **Hum Pathol** 1998; 29:961-4.

Fujii S, Fujimori T, Kawamata H, et al. Development of colonic neoplasia in p53 deficient mice with experimental colitis induced by dextran sulphate sodium. **Gut** 2004; 53:710-6.

Gary MA, Coudry RA, Cooper HS, et al. 5 aminosalicylic acid inhibits colitis-associated dysplasia in the mouse model of AOM/DSS-induced colitis. In: Third Annual Conference on Frontiers in Cancer Prevention Research, American Association for Cancer Research. USA; 2004; p.16-20.

Giaretti W. A model of DNA aneuploidization and evolution in colorectal cancer. **Lab Invest** 1994; 71:904-10.

Goodall H, Sinclair ISR. Colitis cystica profunda. **J Pathol Bacteriol** 1957; 73:33-42.

Grady WM. Genomic instability and colon cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2004; 23:11-27.

Granqvist S. Distribution of polyps in the large bowel in relation to age: a colonoscopic study. **Scand J Gastroenterol** 1981; 16:1025-31.

Greenstein AJ, Sachar DB, Smith H, et al. Cancer in universal and left-sided ulcerative colitis: factors determining risk. **Gastroenterology** 1979; 77:290-4.

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. **Cell** 1991; 66:589-600.

Guda K, Upender MB, Belinsky G, et al. Carcinogen-induced colon tumors in mice are chromosomally stable and are characterized by low-level microsatellite instability. **Oncogene** 2004; 23:3813-21.

Gyde S, Prior P, Dew MJ, Saunders V, Waterhouse JA, Allan RN. Mortality in ulcerative colitis. **Gastroenterology** 1982; 83:36-43.

Habermann JK, Upender MB, Roblick UJ, et al. Pronounced chromosomal instability and multiple gene amplifications characterize ulcerative colitis-associated colorectal carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 147:9-17.

Hamilton S, Vogelstein B, Kudo S, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton S, Aaltonen LA, editors. **Pathology and genetics of tumors of the digestive system**. Lyon: IARC; 2000. p.105-19. (World Health Organization Classification of tumours-IARC)

Hanski C, Tiecke F, Hummel M, et al. Low frequency of p53 gene mutation and protein expression in mucinous colorectal carcinomas. **Cancer Lett** 1996; 103:163-70.

Harpaz N, Peck AL, Yin J, et al. p53 protein expression in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasia and carcinoma. **Hum Pathol** 1994; 25:1069-74.

Harpaz N, Talbot IC. Colorectal cancer in idiopathic inflammatory bowel disease. **Semin Diagn Pathol** 1996; 13:339-57.

Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. **N Engl J Med** 1993; 329:1318-27.

Harvey M, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A, Donehower LA. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. **Nat Genet** 1993a; 5:225-9.

Harvey M, Sands AT, Weiss RS, et al. In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. **Oncogene** 1993b; 8:2457-67.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. **Nature** 1997; 387:296-9.

Hibi T, Ogata H, Sakuraba A. Animal models of inflammatory bowel disease. **J Gastroenterol** 2002; 37:409-17.

Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, et al. The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. **J Clin Invest** 2003; 112:1887-94.

Holzmann K, Klump B, Borchard F, et al. Comparative analysis of histology DNA content p53 and Ki-ras mutations in colectomy specimens with long-standing ulcerative colitis. **Int J Cancer** 1998; 76:1-6.

Hussain SP, Amstad P, Raja K, et al. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. **Cancer Res** 2000; 60:3333-7.

Ilyas M, Tomlinson IP, Rowan A, Pignatelli M, Bodmer WF. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:10330-4.

Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2004; 287:G7-17.

Itzkowitz SH, Present DH. Crohn's and Colitis Foundation of America Colon Cancer in IBD Study Group. Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis** 2005; 11:314-21.

Jacoby RF, Llor X, Teng BB, Davidson NO, Brasitus TA. Mutations in the K-ras oncogene induced by 12-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. **J Clin Invest** 1991; 87:624-30.

Janssen KP, el-Marjou F, Pinto D, et al. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. **Gastroenterology** 2002; 123:492-504.

Kern SE, Redston M, Seymour AB, et al. Molecular genetic profiles of colitis-associated neoplasms. **Gastroenterology** 1994; 107:420-8.

Kiesslich R, Fritsch J, Holtmann M, et al. Methylene blue-aided chromoendoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. **Gastroenterology** 2003; 124:880-8.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1971; 68:820-3.

Koesters R, Hans MA, Benner A, et al. Predominant mutation of codon 41 of the beta-catenin proto-oncogene in rat colon tumors induced by 12-

dimethylhydrazine using a complete carcinogenic protocol. **Carcinogenesis** 2001; 22:1885-90.

Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, te Riele H, Buffinton GD, Dahlstrom JE. Susceptibility of Msh2-deficient mice to inflammation-associated colorectal tumors. **Cancer Res** 2002; 62:2092-7.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. **Science** 1997; 275:1784-7.

Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. **Nature** 1997; 387:299-303.

Kullberg MC, Ward JM, Gorelick PL, et al. Helicobacter hepaticus triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. **Infect Immun** 1998; 66:5157-66.

Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology** 1992; 103:1444-51.

Lennard-Jones JE, Misiewicz JJ, Parrish JA, Ritchie JK, Swarbrick ET, Williams CB. Prospective study of outpatients with extensive colitis. **Lancet** 1974; 1:1065-7.

Lennard-Jones JE. Cancer risk in ulcerative colitis: surveillance or surgery. **Br J Surg** 1985; 72 Suppl:S84-6.

Lofberg R, Brostrom O, Karlen P, Tribukait B, Ost A. Colonoscopic surveillance in long-standing total ulcerative colitis-a 15-year follow-up study. **Gastroenterology** 1990; 99:1021-31.

Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. **J Med Genet** 1999; 36:801-18.

Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:919-32.

Marcus R, Watt J. Seaweeds and ulcerative colitis in laboratory animals. **Lancet** 1969; 2:489-90.

Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis** 2000; 21:361-70.

Medlicott SA, Jewell LD, Price L, Fedorak RN, Sherbaniuk RW, Urbanski SJ. Conservative management of small adenomata in ulcerative colitis. **Am J Gastroenterol** 1997; 92:2094-8.

Meltzer SJ, Mane SM, Wood PK, et al. Activation of c-Ki-ras in human gastrointestinal dysplasias determined by direct sequencing of polymerase chain reaction products. **Cancer Res** 1990; 50:3627-30.

Miller JR, Moon RT. Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. **Genes Dev** 1996; 10:2527-39.

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(6 Suppl):1520-6.

Mitsunaga SI, Zhang SY, Ruggeri BA, et al. Positive immunohistochemical staining of p53 and cyclin D in advanced mouse skin tumors but not in precancerous lesions produced by benzo[a]pyrene. **Carcinogenesis** 1995; 16:1629-35.

Moody GA, Jayanthi V, Probert CS, Mac Kay H, Mayberry JF. Long-term therapy with sulphasalazine protects against colorectal cancer in ulcerative colitis: a retrospective study of colorectal cancer risk and compliance with treatment in Leicestershire. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 1996; 8:1179-83.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. **Science** 1997; 275:1787-90.

Morson BC, Pang LS. Rectal biopsy as an aid to cancer control in ulcerative colitis. **Gut** 1967; 8:423-34.

Moser AR, Pitot HC, Dove WF. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. **Science** 1990; 247:322-4.

Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. **Cancer** 1975; 36:2251-70.

Nambiar PR, Girnun G, Lillo NA, Guda K, Whiteley HE, Rosenberg DW. Preliminary analysis of azoxymethane induced colon tumors in inbred mice commonly used as transgenic/knockout progenitors. **Int J Oncol** 2003; 22:145-50.

Noffsinger AE, Belli JM, Fogt F, Fischer J, Goldman H, Fenoglio-Preiser CM. A germline hMSH2 alteration is unrelated to colonic microsatellite instability in patients with ulcerative colitis. **Hum Pathol** 1999; 30:8-12.

Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora. **Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi** 1985; 82:1327-36.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology** 1990; 98:694-702.

Papatheodoridis GV, Triantafyllou K, Tzouvala M, Paspatis G, Xourgias V, Karamanolis DG. Characteristics of rectosigmoid adenomas as predictors of synchronous advanced proximal colon neoplasms. **Am J Gastroenterol** 1996; 9:1809-13.

Pfau PR, Sivak MV Jr. Endoscopic diagnostics. **Gastroenterology** 2001; 120:763-81.

Pinczowski D, Ekblom A, Baron J, Yuen J, Adami HO. Risk factors for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a case-control study. **Gastroenterology** 1994; 107:117-20.

Pokorny RM, Hofmeister A, Galandiuk S, Dietz AB, Cohen ND, Neiberger HL. Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with the DNA repair gene MLH1. **Ann Surg** 1997; 225:718-23; discussion 723-5.

Polakis P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. **Biochim Biophys Acta** 1997; 1332:F127-47.

Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product p19Arf interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. **Cell** 1998; 92:713-23.

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. **Nature** 1992; 359:235-7.

Prior P, Gyde SN, Macartney JC, Thompson H, Waterhouse JA, Allan RN. Cancer morbidity in ulcerative colitis. **Gut** 1982; 23:490-7.

Prives C, Hall PA. The p53 pathway. **J Pathol** 1999; 187:112-26.

Purdie CA, Harrison DJ, Peter A, et al. Tumour incidence spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. **Oncogene** 1994; 9:603-9.

Ransohoff DF, Riddell RH, Levin B. Ulcerative colitis and colonic cancer. Problems in assessing the diagnostic usefulness of mucosal dysplasia. **Dis Colon Rectum** 1985; 28:383-8.

Redston MS, Papadopoulos N, Caldas C, Kinzler KW, Kern SE. Common occurrence of APC and K-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias. **Gastroenterology** 1995; 108:383-92.

Reitmair AH, Redston M, Cai JC, et al. Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice. **Cancer Res** 1996; 56:3842-9.

Remvikos Y, Muleris M, Salmon RJ, Dutrillaux B. Colorectal carcinogenesis: from chromosomal evolution pathways to molecular pathogenesis. **Cancer Genet Cytogenet** 1997; 93:63-73.

Rhodes JM. Unifying hypothesis for inflammatory bowel disease and associated colon cancer: sticking the pieces together with sugar. **Lancet** 1996; 347:40-4.

Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. **Hum Pathol** 1983; 14:931-68.

Rubin CE, Haggitt RC, Burmer GC, et al. DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis. **Gastroenterology** 1992; 103:1611-20.

Rubin PH, Friedman S, Harpaz N, et al. Colonoscopic polypectomy in chronic colitis: conservative management after endoscopic resection of dysplastic polyps. **Gastroenterology** 1999; 117:1295-300.

Rubio CA, Rodensjo M. p53 overexpression in flat serrated adenomas and flat tubular adenomas of the colorectal mucosa. **J Cancer Res Clin Oncol** 1995; 121:571-6.

Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. **Gastroenterology** 2004; 126:451-9.

Schneider A, Stolte M. Differential diagnosis of adenomas and dysplastic lesions in patients with ulcerative colitis. **Z Gastroenterol** 1993; 31:653-6.

Seril DN, Liao J, Ho KL, Yang CS, Yang GY. Inhibition of chronic ulcerative colitis-associated colorectal adenocarcinoma development in a murine model by N-acetylcysteine. **Carcinogenesis** 2002; 23:993-1001.

Shamsuddin AK, Trump BF. Colon epithelium. II. In vivo studies of colon carcinogenesis. Light microscopic histochemical and ultrastructural studies of histogenesis of azoxymethane-induced colon carcinomas in Fischer 344 rats. **J Natl Cancer Inst** 1981; 66:389-401.

Shanahan F. Discontent with dysplasia surveillance in ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis** 1995; 1:80-3.

Silver H, Stolar J. Distinguishing features of well differentiated mucinous adenocarcinoma of the rectum and colitis cystica profunda. **Am J Clin Pathol** 1969; 51:493-500.

Sohn KJ, Shah SA, Reid S, et al. Molecular genetics of ulcerative colitis-associated colon cancer in the interleukin 2- and beta(2)-microglobulin-deficient mouse. **Cancer Res** 2001; 61:6912-7.

Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. **Nat Rev Cancer** 2001; 1:233-40.

Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2005; 331:834-42.

Souza RF, Yin J, Smolinski KN, et al. Frequent mutation of the E2F-4 cell cycle gene in primary human gastrointestinal tumors. **Cancer Res** 1997; 57:2350-3.

Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. **Cancer Res** 1998; 58:1130-4.

Sugimura T, Nagao M, Wakabayashi K. How we should deal with unavoidable exposure of man to environmental mutagens: cooked food mutagen discovery facts and lessons for cancer prevention. **Mutat Res** 2000; 447:15-25.

Suzuki H, Harpaz N, Tarmin L, et al. Microsatellite instability in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasias and cancers. **Cancer Res** 1994; 54:4841-4.

Takahashi M, Fukuda K, Sugimura T, Wakabayashi K. Beta-catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. **Cancer Res** 1998; 58:42-6.

Takahashi M, Wakabayashi K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. **Cancer Sci** 2004; 95:475-80.

Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. **Cancer Sci** 2003; 94:965-73.

Tarmin L, Yin J, Harpaz N, et al. Adenomatous polyposis coli gene mutations in ulcerative colitis-associated dysplasias and cancers versus sporadic colon neoplasms. **Cancer Res** 1995; 55:2035-8.

Torres C, Antonioli D, Odze RD. Polypoid dysplasia and adenomas in inflammatory bowel disease: a clinical pathologic and follow-up study of 89 polyps from 59 patients. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:275-84.

Venkatachalam S, Shi YP, Jones SN, et al. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. **Embo J** 1998; 17:4657-67.

Watt J, Marcus R. Carrageenan-induced ulceration of the large intestine in the guinea pig. **Gut** 1971; 12:164-71.

Webb B, Petras RE, Bozdech JM, Oakley JR. Carcinoma and dysplasia in ucosal ulceratice colitis: a clinicopathologic study of 44 patients. **Am J Clin Pathol** 1991; 96:403-7.

Whetsell L, Maw G, Nadon N, Ringer DP, Schaefer FV. Polymerase chain reaction microanalysis of tumors from stained histological slides. **Oncogene** 1992; 7:2355-61.

Willenbucher RF, Aust DE, Chang CG, et al. Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. **Am J Pathol** 1999; 154:1825-30.

Wong NA, Mayer NJ, MacKell S, Gilmour HM, Harrison DJ. Immunohistochemical assessment of Ki67 and p53 expression assists the diagnosis and grading of ulcerative colitis-related dysplasia. **Histopathology** 2000; 37:108-14.

Yamada M, Ohkusa T, Okayasu I. Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. **Gut** 1992; 33:1521-7.

Yoshida T, Matsumoto N, Mikami T, Okayasu I. Upregulation of p16(INK4A) and Bax in p53 wild/p53-overexpressing crypts in ulcerative colitis-associated tumours. **Br J Cancer** 2004; 91:1081-8.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. **Cell** 1998; 92:725-34.

Zhao R, Gish K, Murphy M, et al. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. **Genes Dev** 2000; 14:981-93.