

Perfil Imunoistoquímico das Proteínas p53 e Ki67 em Pacientes com Retocolite Ulcerativa Inespecífica

Imunohistochemical Profile of p53 and Ki67 from Patients with Unspecific Ulcerative Colitis

MARCOS CEZAR DE PAULA MACHADO¹; MARIO RIBEIRO DE MELO-JÚNIOR¹; NICODEMOS TELES DE PONTES-FILHO^{1,2}; CONSUELO ANTUNES BARRETO LINS³; FRANCISCO EDUARDO DE ALBUQUERQUE LIMA⁴; ADRIANA MARIA DA SILVA TELLES^{1,2}

¹. Setor de Patologia - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil; ². Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde – UFPE; ³. Hospital Oswaldo Cruz - Universidade de Pernambuco, UPE, Brazil; ⁴. Departamento de Cirurgia, Centro de Ciências da Saúde – UFPE.

MACHADO MCP; MELO-JÚNIOR MR; PONTES-FILHO NT; LINS CAB; LIMA FEA; TELLES AMS. Perfil Imunoistoquímico das Proteínas p53 e Ki67 em Pacientes com Retocolite Ulcerativa Inespecífica. *Rev bras Coloproct*, 2010;30(2): 183-190.

RESUMO: Objetivos: O presente estudo avaliou, através da imunoistoquímica e estudo histopatológico, as principais alterações na mucosa intestinal de pacientes acometidos pela retocolite ulcerativa crônica idiopática (RCUI) apenas tratada clinicamente (n=30) ou subseqüentemente tratada com Proctocolectomia total e construção de bolsa ileal (n=30). Métodos: Desta forma, foram selecionados fragmentos de tecido intestinal submetidos à imunomarcagem para as proteínas p53 e Ki67 e coloração por hematoxilina-eosina para análise histopatológica comparativa. Resultados: Os resultados obtidos indicam importantes diferenças no perfil inflamatório e presença de áreas de erosão/desgaste da mucosa colônica de ambos os grupos estudados. Quanto a imunoexpressão, observou-se uma maior reatividade de padrão nuclear principalmente nos tecidos inflamados dos pacientes com RCUI tratados clinicamente. Conclusões: Estes resultados sugerem que, de acordo com o perfil histopatológico e imunoistoquímico, a mucosa colônica de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico apresenta menos alterações que os pacientes tratados clinicamente. Assim, os dados sugerem que estes métodos podem auxiliar no diagnóstico e monitoramento de pacientes sob diferentes rotinas terapêuticas.

Descritores: Retocolite ulcerativa; imunoistoquímica; p53; Ki67; perfil inflamatório.

INTRODUÇÃO

Na sua conceituação mais ampla, as doenças inflamatórias intestinais correspondem a qualquer processo inflamatório envolvendo o trato gastrointestinal, seja ele agudo ou crônico, na sua maioria, são afecções de etiologia desconhecida e de grande importância em saúde pública, cujo tratamento envolve custos extremamente altos, incluindo aqueles relacionados à perda de produtividade^{1,2}.

A retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) constitui uma das doenças inflamatórias intestinais (DII)

mais frequentes da atualidade³. A doença pode iniciar em qualquer idade, sendo homens e mulheres igualmente afetados. O pico de incidência ocorre dos 20 aos 40 anos e um segundo pico nos idosos⁴.

A RCUI, tem despertado a atenção pelo aumento crescente da frequência, demonstrado em casuística com números significativamente maiores de doentes acometidos pela doença nos últimos anos⁵.

O curso clínico da RCUI, cujas manifestações principais são diarreia, dor abdominal e sangramento retal, é caracterizado por períodos de remissão e exacerbação⁶.

Trabalho realizado no Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), órgão suplementar da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Recife - Pernambuco - Brasil.

Recebido em 01/02/2010

Aceito para publicação em 17/03/2010

O diagnóstico da RCUI é principalmente baseado na colonoscopia e nos achados histopatológicos. A RCUI invariavelmente afeta o reto e estende-se proximalmente a uma distância variável. A inflamação é caracteristicamente confluenta, com o aparecimento de hemorragia e irritação da mucosa. Os sinais mais precoces tendem a ser perda sutil de padrões vasculares com hiperemia e edema da mucosa. Com inflamação mais ativa, a mucosa fica granular com presença de muco e hemorragia de contato. Em estado avançado encontra-se intensas ulcerações⁷. No diagnóstico da RCUI teremos duas características críticas influentes na prescrição terapêutica; a extensão e a severidade da doença.

Neste sentido Rutter e colaboradores⁸ dão ênfase ao processo inflamatório estabelecido a longo prazo como sendo fator determinante da carcinogênese colorretal envolvida na RCUI. Contudo, existem indícios de que a carcinogênese oriunda da inflamação crônica poderia estar relacionada com um dano causado pela ativação prolongada das vias de sinalização responsáveis pela renovação celular continuada^{9, 10}. Apesar destes achados, um estudo retrospectivo¹¹ demonstrou que a severidade da inflamação é o fator que ofereceria um maior risco para o surgimento de uma neoplasia, com destaque, o tempo da doença e a extensão da mesma (pancolite).

A associação entre RCUI e câncer colorretal tem sido confirmada em vários estudos, segundo os quais o risco de câncer é variável e dependente de fatores como tempo de evolução da doença e extensão da mesma. As chances de ocorrer câncer na retocolite ulcerativa são maiores nos pacientes com mais de dez anos de doença e nos casos de pancolites^{12, 13}.

Protocolos experimentais para análise imunohistoquímica de diversas proteínas como a p53 e Ki67 em tecido parafinizado estão sendo testados para marcação de lesões displásicas na colite ulcerativa¹⁴. Embora não se saiba ainda qual a verdadeira influência da resposta inflamatória na expressão de proteínas relacionadas ao câncer intestinal, estudos como este se tornam importantes no entendimento dos vários aspectos relacionados as DII.

A partir disso, este trabalho objetivou avaliar as repercussões teciduais quanto aos aspectos histológicos e a imunoexpressão das proteínas Ki67 e p53 de pacientes diagnosticados com RCUI e tratados clinicamente ou através de cirurgia com a

proctocolectomia total com a construção de uma bolsa ileal.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos casos

Foram selecionados blocos de parafina contendo fragmentos de tecido intestinal anteriormente diagnosticados com retocolite ulcerativa idiopática (n=30) de pacientes em tratamento clínico com a administração de corticóides e imunomoduladores, bem como, amostras teciduais de pacientes já tratados cirurgicamente com proctocolectomia com anastomose íleo-anal com bolsa ileal (n=30). Para controle foram selecionados e analisados a contra parte normal da biópsia.

Todas as amostras foram oriundas de pacientes com idades entre 19 e 72 anos (média 38,5 anos), de ambos os sexos.

Foram utilizados como critérios de inclusão, a realização de exame colonoscópico entre os anos de 2000 e 2008, diagnóstico de RCUI acima de 7 anos baseados na sintomatologia, radiologia endoscopia, e exame histopatológico. Como fatores de exclusão foram desconsiderados os pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para câncer do cólon e portadores de doença de Crohn ou colite indeterminada.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE sob nº. 198/2008).

Análise imunoistoquímica

Para a técnica de imunohistoquímica, foi utilizado um anticorpo primário monoclonal de camundongo da marca DAKO Corporation p53 (Clone Pab240) e um anticorpo monoclonal primário antiproteína Ki-67 (Clone MIB-1) da marca DAKO Corporation.

Para cada anticorpo foi utilizado um controle positivo que apresentava marcação quase na totalidade das células lesionadas. Para o anticorpo p53, utilizou-se um caso de carcinoma coloretal e um fragmento de pele normal para o anti-Ki-67.

Para a recuperação antigênica foi empregada a incubação das preparações histológicas em tampão citrato (3,84g de ácido cítrico, 48ml de hidróxido de sódio 1M, completando para 2000ml de água destilada, pH 6), Com o objetivo de inibir as ligações inespecíficas colocou-se uma solução de leite nas preparações histológicas sob calor úmido (Vaporeto®), durante 20

minutos. A solução de leite foi preparada no dia, utilizando-se 30ml TRIS (hidroxi-metil-aminometano) + 0,30g de albumina bovina. Homogenizou-se esta solução com o auxílio de um agitador magnético e adicionou 0,30g de leite desnatado em pó Molico. Em seguida, filtrou-se essa solução em filtro milipore. Os anticorpos primários foram diluídos em uma solução comercial (Antibody diluent, with background reducing components, código: S3022, DAKO Cytomation – Carpinteria – USA) numa diluição de 1:50.

Posteriormente, foram incubadas com o anticorpo primário (solução contendo anticorpo monoclonal anti-Ki67 ou anti-p53 na diluição 1:50, por 30 min, em temperatura ambiente de 25°C).

Logo após as preparações histológicas foram imersas em tampão de lavagem TBS (800ml de ácido clorídrico 1N, 116g de cloreto de sódio, 122g de TRIS, 10ml de tween 20, completando para 20ml de água destilada) em dois banhos de cinco minutos. Em seguida pingou-se o anticorpo secundário (LSAB).

As preparações histológicas receberam inicialmente o Link (anticorpo secundário de porco anticamundongo, cabra e coelho) por trinta minutos e depois o Estreptavidina por mais trinta minutos, na câmara umidificada em temperatura ambiente.

Para revelação das lâminas utilizou-se o substrato cromógeno diaminobenzidina (Liquid DAB + substrate, Chromogen System, código: K3468, DAKO – USA) preparado conforme instruções do fabricante e com tempos previamente estabelecido para cada anticorpo, onde o p53 (45 min) e o Ki-67 (3 min).

Lavagens em água destilada foram feitas para retirada do excesso do cromógeno e posteriormente os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavados em cinco banhos de água destilada, sendo que o terceiro banho continha hidróxido de amônia para conferir a coloração azulada da Hematoxilina.

Finalmente procedeu-se a desidratação dos cortes em dois banhos de álcool (um minuto cada) seguido por quatro banhos de xilol (um minuto cada). As lâminas foram montadas com Entelam (código: 107961, Merck – Alemanha) para fixação das lamínulas em resina e avaliadas no microscópio óptico (Olympus BH-2, Japão).

As imagens das preparações histológicas foram capturadas utilizando um sistema de vídeo-câmera acoplado a um microscópio óptico (Olympus BH-2), já utilizado com sucesso em análises diagnósticas (15). O

sistema interativo de análise de imagens utiliza o Software OPTIMAS® 6.1 e Câmera digital CCBBW 410 (Samsung).

Avaliação morfométrica computadorizada

A partir da captura das imagens das lâminas histológicas de RCUI, e após digitalização, padronizou-se a margem de variação (threshold range). Os perfis de marcação da imunohistoquímica dos cortes histológicos (magnificação 200x) foram captados pelo ajuste do contraste do nível de cinza (gray value).

Foram realizadas as contagens de células com padrão nuclear de marcação em marron. Todas as células captadas foram contadas por dois analistas isoladamente sendo avaliados cinco campos por lâmina (perfazendo um total de 150 campos analisados).

O parâmetro morfométrico adotado foi a área média total (im^2) composta pelo somatório das estruturas citoplasmáticas marcadas (perfil de marcação da imuno-histoquímica para o p53 e o Ki-67) por campo captado (área de 12.234 im^2) da preparação histológica.

Para minimizar distorções nos valores das medições devido à presença de células não-marcadas, aplicou-se um fator de correção (FC) de acordo com a equação $FC = s/S$, onde “s” é o valor da área superficial marcada e “S”, a área total medida. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o teste t de Student pareado, considerando-se um nível de significância, $p < 0,05$.

Para o estudo do padrão de marcação dos anticorpos foi aplicada uma escala semiquantitativa (DxI) levando-se em consideração a intensidade da coloração (I), foi calculada a área média de células por campo captado ($\text{área de } 12.234 \text{ im}^2$) em porcentagem (%) onde a marcação fraca = 15-20%, moderada = 25-55% e forte = 60-95%, e a distribuição (D) variando entre fraca (+), moderada (++) e intensa (+++), conforme metodologia utilizada (16, 17).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o teste t de Student, para um nível de significância ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Aspectos histopatológicos

Na avaliação histológica dos casos de RCUI estudados foi observada uma diferença no perfil de resposta inflamatória entre os pacientes portadores de

RCUI tratados cirurgicamente quando comparados aos pacientes tratados clinicamente.

Foi observado nos pacientes tratados clinicamente um maior infiltrado inflamatório predominantemente linfo-plasmocitário associado a áreas de desgaste da mucosa colônica (erosões/ulcerações), entremeadado por regiões com fibrose intersticial (Figura 1). No grupo tratado cirurgicamente a arquitetura glandular estava mais bem preservada e com ausência de infiltrações por células inflamatórias (Tabela 1).

Nas amostras analisadas pode-se observar em pacientes tratados cirurgicamente uma área de tecido apresentando um infiltrado linfoplasmocitário. Além disso, pode-se observar a ausência de fibrose com a presença de raros fibrócitos.

Em ambos os grupos (cirúrgico e clínico) não foram observadas áreas de ectasia vascular, hiperemia ou hemorragias, porém no grupo tratado clinicamente foi encontrado um maior número de agregados linfóides reativos.

Perfil imunoistoquímico das proteínas p53 e Ki67

No estudo imunohistoquímico foi constatada uma reatividade, principalmente de padrão nuclear de marcação, para ambas as proteínas p53 e Ki67 nas áreas com RCUI (Tabela 2).

A análise de imagem da imunorreatividade tecidual da proteína Ki-67 (Figura 2) demonstrou um aumento estatisticamente significativo na sua expressão no grupo de pacientes portadores de RCUI tratados clinicamente quando comparados àqueles pacientes tratados cirurgicamente.

Comparativamente, a expressão tecidual para a proteína p53 também evidenciou no grupo de pacientes tratados clinicamente (66,6%), onde a imunoreatividade foi mais intensa nos tecidos inflamados.

DISCUSSÃO

Atualmente, aconselha-se que o estudo histopatológico da mucosa retal deve sempre ser realizado e se constitui no método diagnóstico mais importante, embora não-patognomônico para o esclarecimento da etiologia da colite, este exame serve como parâmetro complementar para o curso terapêutico a ser empregado, além disso, a análise das amostras teciduais obtidas por endoscopia é essencial e crucial para determinação do tratamento^{18, 19}.

Nos pacientes em que a cirurgia não é o tratamento de escolha é fundamental a utilização de outros fatores prognósticos para melhor compreender a evolução da RCUI e definir melhor a terapia²⁰.

Em outros estudos, a partir de uma análise comparativa observa-se a existência de muito pouca con-

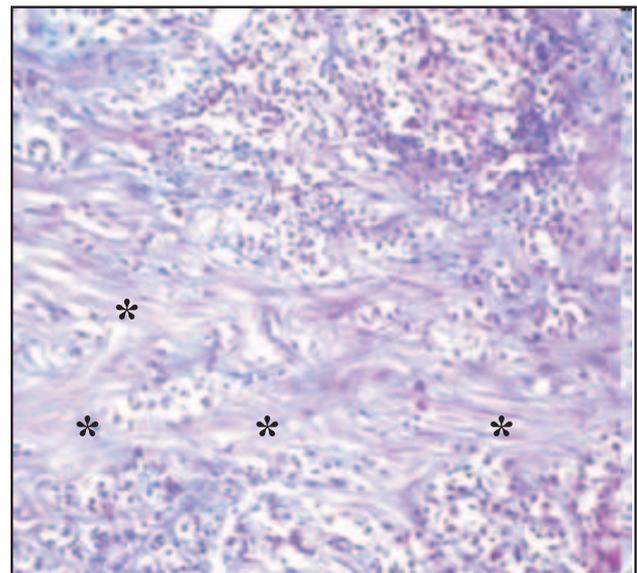


Figura 1 - Fibrose intersticial (*) em paciente com retocolite ulcerativa tratado clinicamente (Tricrômico de Masson. Magnificação: 400x).

Tabela 1 - Parâmetros histopatológicos em pacientes portadores de Retocolite ulcerativa tratados cirurgicamente (RCUI-Cir) ou clinicamente (RCUI-Clin).

Grupo	Parâmetros histopatológicos		
	Inflamação	Fibrose	Erosão / Ulceração
RCUI-Clin	++	+	+
RCUI-Cir	+	-	+

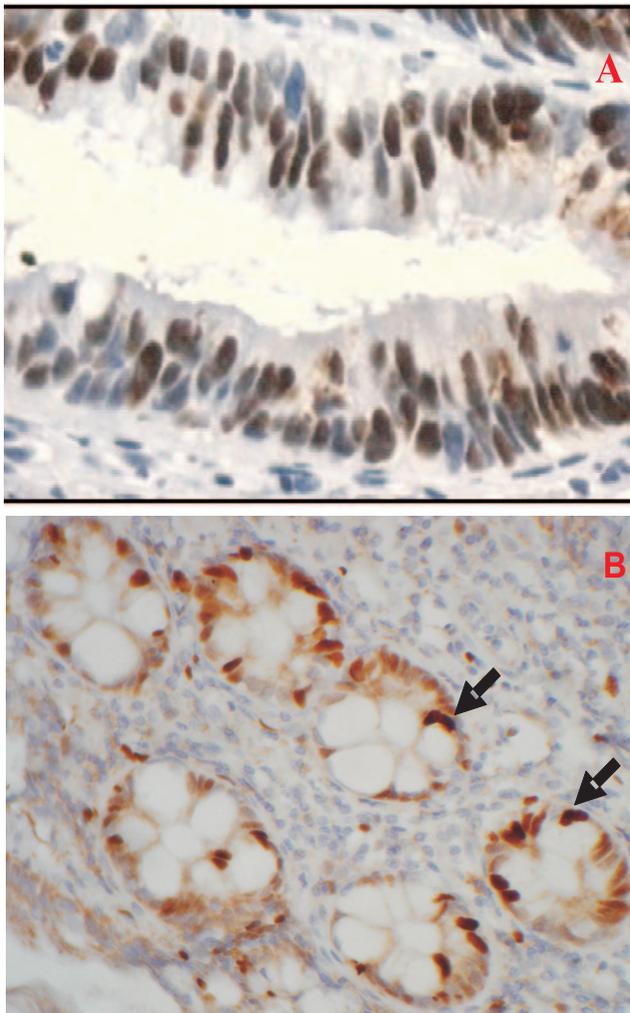


Figura 2 - Na imagem A observa-se a expressão tecidual difusa e incipiente da proteína p53 em mucosa intestinal de paciente com retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI). A imagem B exibe o padrão de marcação intenso e nuclear (setas) para proteína Ki-67 em pacientes com RCUI (Magnificação 400x).

cordância entre as interpretações histopatológicas o que justifica a necessidade de aprofundar os estudos sobre esse aspecto. Neste sentido, os achados histopatológicos deste estudo convergem com as conclusões de Eaden e colaboradores²¹.

Em relação às características histológicas da RCUI, a avaliação da arquitetura tecidual através de métodos rotineiros não são suficientes para evidenciar fatores importantes como a natureza do infiltrado inflamatório e estágio de displasia que as células colônicas estão apresentando. Os termos “idiopático”, “indeterminado”, “inespecífico”, às vezes mencionados, referem-se à ausência de características mais precisas que indicariam o tipo exato de inflamação, bem como a o nível da distorção da arquitetura tecidual do revestimento mucoso do cólon²².

Segundo nosso estudo, o quadro inflamatório demonstrou ser bastante característico em ambos os grupos estudados, o que evidencia ser isto um fator de averiguação e também fator de risco adicional para progressão neoplásica, gerando o câncer de cólon^{8,23}.

Poucas medidas na medicina diagnóstica tiveram tanto impacto em anos recentes quanto a introdução, nas práticas de laboratório clínico, dos imunoenaios para determinação de proteínas relacionadas a tumores, também classificadas como marcadores tumorais²⁴.

Os marcadores tumorais, em sua maioria, são proteínas ou frações de proteínas²⁵, incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios²⁶.

Embora a RCUI seja uma doença inflamatória de origem não-neoplásica, o câncer coloretal ainda é a principal causa de morte nos pacientes acometidos com essa DII²⁷. Vários marcadores de prognóstico atual-

Tabela 2 - Análise digital da imunomarcção das proteínas p53 e Ki67 em pacientes portadores de Retocolite ulcerativa inespecífica tratados cirurgicamente (RCUI-Cir) ou clinicamente (RCUI-Clin).

Grupo	Proteína			
	p53	% p53/total*	Ki67	% Ki67/total*
RCUI-Clin	+++	66,6 (20/30)	+++	73,3 (22/30)
RCUI-Cir	++	26,6 (12/30)	+	16,6 (5/30)
Cólon normal	+	4,8 (2/30)	-	0,0 (0/30)

Padrão de marcação: (-) ausente; (+) fraco; (++) moderado; (+++) intenso.

* Percentagem de casos positivos / Número total de amostras.

mente são testados, como o IL-6, ICAM, a-TNF, Dehydro-epiandrosterona (DHEA), ciclooxigenase-2^{28, 29}, além das proteínas p53 e Ki67^{27, 30, 31}.

Dentre os marcadores de prognóstico avaliados no presente estudo, podemos destacar o perfil da resposta inflamatória e a imunoreatividade às proteínas Ki-67 e p53.

A p53 regula a expressão de genes envolvidos na apoptose, angiogênese, ciclo celular e manutenção do genoma. Mutações no gene p53 são encontradas em cerca de 50% dos cânceres colo retal, com a maioria das mutações que ocorrem em exons 5-8³².

Estudos indicam, ainda, que a superexpressão da proteína p53 em outros tumores (por exemplo, carcinomas de mama, cólon e bexiga) correlaciona-se com diminuição da diferenciação histológica, comportamento biológico mais agressivo e redução da sobrevida dos pacientes³³⁻³⁵.

Alteração no gene p53 pode ser detectada tanto pelo sequenciamento direto do gene quanto pela superexpressão imunoistoquímica da sua proteína. A superexpressão da proteína p53 pode ser um indicador de mutação desse gene³⁶.

Em pacientes com RCU a avaliação dos níveis de p53 tem sido considerado como teste complementar para displasia e fator prognóstico para o câncer intestinal^{27, 37}.

Freqüentemente a proteína Ki67 é utilizada como um marcador para a proliferação celular em cortes teciduais³⁸, sendo importante ressaltar que a sua positividade não é exclusiva nas neoplasias malignas, mas sim predominante em relação às benignas nos tecidos glandulares, sendo o melhor marcador de transformação maligna, como, por exemplo, do carcinoma versus adenoma pleomórfico³⁹. Em outros trabalhos demonstrou-se através da imunoistoquímica que a ausência de marcação em biópsias de pacientes com colite ulcerativa é um indicador do grau de displasia^{14, 33, 40}.

No presente estudo, a imunoreatividade para ambas as proteínas investigadas foi mais intensa nos tecidos inflamados, aspecto este que corrobora o resultado observado por Sato & Machinami⁴¹ ao reportarem que a reatividade das células em condições não-neoplásicas correlaciona-se com severidade da inflamação.

Nossos resultados confirmam estudo mais recente que afirma que, quando ocorrem mutações e alta expressão do gene p53 ocorre o surgimento de mais de

75% cânceres coloretais. Além disso, o aumento da frequência de alelos mutantes do p53 em tecidos intestinais pode conferir susceptibilidade para o desenvolvimento de neoplasias em um microambiente inflamatório⁴².

Protocolos experimentais para análise imunoistoquímica da proteína Ki-67 em tecido parafinado estão sendo testados para marcação de lesões displásicas na colite ulcerativa¹⁴. Embora não se saiba ainda qual a verdadeira influência da resposta inflamatória na expressão de proteínas relacionadas ao câncer intestinal, estudos como este se tornam importantes no entendimento dos vários aspectos relacionados as doenças inflamatórias intestinais.

Neste presente trabalho, a expressão das proteínas Ki-67 e p-53 foi observada no núcleo e/ou citoplasma nas células de todos os tipos de lesão examinados, este padrão de marcação encontrado neste estudo assemelha-se a outros trabalhos realizados em nossos laboratórios que avaliaram a expressão tecidual de outras proteínas, como a galectina 3 em câncer de próstata⁴³, e mais recentemente, em pacientes portadores de RCU⁴⁴.

Com o intuito de descrever parâmetros qualitativos e quantitativos mais confiáveis sobre alterações histopatológicas nosso grupo de pesquisas tem desenvolvido metodologias morfológicas diversas⁴⁵⁻⁴⁷.

Desta forma, o conhecimento do maior número de variáveis diretamente associadas ao prognóstico para evolução de tumores intestinais torna-se necessário para a melhor identificação de pacientes que poderão se beneficiar de ferramentas diagnósticas complementares, como o uso de marcadores biológicos como o caso de algumas, proteínas específicas que desempenham importantes funções no desenvolvimento de doenças neoplásicas e inflamatórias.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se constatar uma diferença no perfil da resposta inflamatória nas amostras de pacientes com RCUI tratados cirurgicamente e clinicamente, nestes últimos há presença mais acentuada de infiltrado linfo-plasmocitário, fibrose intersticial e agregados linfóides reativos.

Também foi observada diferença significativa na reatividade tecidual da proteína p53 entre as amostras estudadas quando comparados os pacientes tratados clinicamente com aqueles submetidos a cirurgia,

visto que os tratados cirurgicamente não apresentavam áreas inflamadas tão frequentes e intensas, por outro lado, ocorreu aumento significativo no número

médio de células com reatividade para a proteína Ki-67 nas amostras teciduais de pacientes tratados clinicamente.

ABSTRACT: Objectives: The present study evaluated, through immunohistochemistry and histopathologic analysis, the main alterations in intestinal mucous from patients with unspecified ulcerative colitis (IUC) clinically (n=30) or surgically treated (n=30) with ileal J-pouch and permanent ileostomy. **Methods:** Thus, tissue slices from intestinal mucous were submitted to immunostains for p53 and Ki67 proteins, and Haematoxylin-eosin staining for comparative histopathological evaluation. **Results:** The results indicated important differences in inflammatory profile and erosion/necrosis sites on the both investigated groups. Related to immunoexpression was observed a higher reactivity with nuclear pattern, mainly in inflammatory tissues from IUC patients clinically treated. **Conclusions:** Those results showed that, according to histopathological and immunohistochemical parameters, the colonic mucous from IUC patients submitted to surgical treatment exhibited less alterations than IUC patients clinically treated. The data suggest that those methods could be helpful to diagnosis and assist the accompaniment of patients under different therapeutic routines.

Key words: Ulcerative colitis; immunohistochemistry; p53; Ki63; inflammatory profile.

REFERENCIAS

1. Rothenberg SS - Laparoscopic segmental intestinal resection. *Semin Pediatr Surg* 2002; 11(4): p. 211-216.
2. Campos FG et al. - Impact of parenteral n-3 fatty acids on experimental acute colitis. *Br J Nutr* 2002; 87(1): p.S83-S88.
3. Lanna CCD, Ferrari MLA, Carvalho MAP, Cunha AS - Manifestações Articulares em Pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa. *Rev Bras Reumatol* 2006; 46(1): p.45-51.
4. Cottone M. et al. - Clinical course of ulcerative colitis. *Digest Liver Dis* 2008; 40(2): S247-S252.
5. Marakhouski Y, Hargun J, Marakhouski K - Epidemiology, clinical presentation and outcome in ulcerative colitis: observation from urban population during 10 years period. *J Crohn's Col* 2007; 1(1): p.17.
6. Damião AOMC, Sipahi AM. Doença Inflamatória Intestinal. *Gastroenterologia*. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda p.1105-1149. 2004.
7. Turina M. et al. - Chronic Pouchitis After Ileal Pouch-Anal Anastomosis for Ulcerative Colitis: Effect on quality of life. *J Gastrointest Surg* 2006; 10(4): p.1-5.
8. Rutter M. et al. - Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterol* 2004; 126: p.451-459.
9. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. - Tissue Repair and Stem Cell Renewal in Carcinogenesis. *Nature* 2004; 432: p.324-330.
10. McDonald SAC. et al. - Mechanisms of Disease: from Stem Cells to Colorectal Cancer. *Nature Clinical Practice. Gastroenterol Hepatol* 2006; 3(5): p.267-274.
11. Jess T. et al. - Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: A population-based study from Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterol* 2006; 130: p.1039-1045.
12. Roessner A. et al. - Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathol Res Pract* 2008; 204: p.511-524.
13. Rubin DT. et al. - Are dysplasia and colorectal cancer endoscopically visible in patients with ulcerative colitis? *Gastroint Endosc* 2007; 65(7): p.998-1004.
14. Wong NACS. et al. - Immunohistochemical assessment of Ki67 and p53 expression assists the diagnosis and grading of ulcerative colitis-related dysplasia. *Histopathol* 2000; 37: p.108-114.
15. Oberholzer M, Östreicher M, Christen H. - Brühlmann, M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol* 1996; 105: p.333-355.
16. Özer E. et al. - Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neurogenesis and brain myelination in the mice brain. *Clin Neuropathol* 2000; 19(1): p.21-25.
17. Melo-Junior MR. et al. - Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to helicobacter pylori. *Braz J Microbiol* 2008; 39: p.238-240.
18. Diaz NJ, Patrício FS, Fagundes-Neto U. - Colite alérgica: características clínicas e morfológicas da mucosa retal em lactentes com enterorragia. *Arq Gastroenterol* 2002; 39(4): p.260-267.
19. Abdel-Hady M, Bunn SK. - Inflammatory bowel disease. *Current Pediat* 2004; 14(7): p.598-604.
20. Felin CR. et al. - Expressão das proteínas p53 e Cox-2 em adenocarcinoma intestinal e mucosa adjacente. *Rev Bras Coloproctol* 2008; 28(1): p.19-25.
21. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. - The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48: p.526-535.
22. Gramlich T, Petras RE. - Pathology of inflammatory bowel disease. *Semin Pediat Surg* 2007; 16: p.154-163.

23. 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–G17.
24. Pradal M, Menezes AM, Di Dio R. - Marcadores tumorais. *LAES & HAES* 2004; 30: p.146-182.
25. Almeida JRC. - Farmacêuticos em oncologia: Uma nova realidade. São Paulo: Atheneu: 61-72, 2004.
26. Mattos LL. et al. - Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. *Arq Med ABC* 2005; 30(1): p.19-25.
27. Lashner BA, Bauer WM, Rybicki LA, Goldblum JR. - Abnormal p53 immunohistochemistry is associated with an increased colorectal cancer–related mortality in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(6): p20.
28. Ferreira CG, Rocha JC. - *Oncologia Molecular*. 1st ed. São Paulo: Atheneu. p.171-81, 2004.
29. Louro ID. et al. *Genética Molecular do Câncer*. 2 nd ed. São Paulo: MSG. p.63-90, 2002.
30. Silva-Filho AL. et al. - Association between p53 and Ki-67 expression and clinicopathologic features in patients with carcinoma of the cervix. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2005; 27(5): p.243-247.
31. Acay RR. et al. - Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. *Oral Oncol* 2006; 42: p.475–480.
32. Mills AA. - p53: links to the past, bridge to the future. *Genes Dev* 2005; 19: p.2091–2099.
33. Lazzaro B, Cleveland D. - p53 and Ki-67 antigen expression in small oral biopsy specimens of salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89: p.613-617.
34. Chen S-L. - p53 is a regulator of the metastasis suppressor gene Nm23-H1. *Mol Carcinog* 2003; 36(4): p.204-214.
35. Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. - p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacol Sci* 2004; 25: p.177-181.
36. Gasco M, Crook T. - The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2003; 39: p.221-230.
37. Paun Ni IB. et al. - Quantitative analysis of the expression of p53 gene in colorectal carcinoma by using real-time PCR. *Trop Biomed* 2006; 23(1): p.53–59.
38. Aoyagi S, Akiyama M, Shimizu H. - High expression of Ki-67 and cyclin D1 in invasive extramammary Paget's disease. *J Dermatol Sci* 2008; 50(3): p.177-184.
39. Barbosa TV. et al. - Prognostic significance of Ki-67 in great cell undifferentiated carcinoma of the major salivary glands: study of 11 cases. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2003; 69(5): p.629-634.
40. Zivkovic V. et al. - Histopathological and imunohistochemical features of dysplasia-associated lesions or masses in ulcerative colitis. *Arch Oncol* 2004; 12.
41. Sato A, Machinaml R. - p53 immunohistochemistry of ulcerative colitis-associated with dysplasia and carcinoma. *Pathol Internat* 1999; 49(10): p.858-868.
42. Hussain SP. et al. - Increased p53 Mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: A cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* 2000; 60: p.3333–3337.
43. Araújo-Filho JLS. et al. - Galectina-3 em tumores de próstata: imuno-histoquímica e análise digital de imagens. *J Bras Patol Med Lab* 2006; 42(6): p.469-475.
44. Araújo GLS. et al. - Análise histológica e histoquímica de fatores prognósticos em pacientes com retocolite ulcerativa. *Rev Bras Colo-Proctol* 2009; 29(1): p.7-14.
45. Figueirêdo-Silva J. et al. - Esquistossomose mansônica experimental: Estudo morfométrico e experimental das células calciformes intestinais. *An Fac Med Univ Fed PE* 1999; 44: p.21-25.
46. Melo-Júnior MR. et al. - Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. *J Bras Patol Med Lab* 2004; 40(2): p.123-125.
47. Lima-Neto RG. et al. - Avaliação dos micronúcleos de células inflamatórias em pacientes com esporotricose e cromomicose. *Rev Cienc Med Biol* 2008; 7(2): p.175-181.

Endereço para correspondência:

MARIO RIBEIRO DE MELO-JUNIOR

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE

Av. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitário

CEP 50670-910

E-mail: mariormj@gmail.com