



Coimbra | 2014

A DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL COMO DOENÇA HETEROGÉNEA: CONTRIBUTO PARA A ESTRATIFICAÇÃO DO PROGNÓSTICO E A OPTIMIZAÇÃO DO RASTREIO

Um estudo clínico, laboratorial, endoscópico e de interface com a engenharia biomédica

Uma abordagem multicêntrica e multidisciplinar

Paulo André Vinagreiro Freire

Tese de Doutoramento apresentada à

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Esta tese foi escrita de acordo com a antiga ortografia

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer
responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta tese

(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Artº 108, § único)

Trabalho realizado no Serviço de Gastrenterologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e no Centro de Gastrenterologia da Faculdade de Medicina de Coimbra

Projecto de Investigação subsidiado por Bolsas de Investigação atribuídas por:

- Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/SINTD/60055/2009)
- Fundação GlaxoSmithKline das Ciências da Saúde
- Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva
- Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Programa de Estímulo à Investigação, En 2011)
- Centro de Estudos Ibéricos

AOS MEUS

AOS MEUS MESTRES

PREFÁCIO

PREFÁCIO

O apelo pela investigação científica, sobretudo na sua vertente clínica, é algo que sinto como intrínseco desde os primeiros passos do Internato Complementar da Especialidade de Gastrenterologia. Não obstante, o desafio para abraçar a responsabilidade de materializar esse ímpeto na tese aqui produzida, devo-o ao Professor Doutor Maximino Correia Leitão. Ao Professor Doutor Carlos Sofia, Director do Serviço de Gastrenterologia do Centro e Hospitalar e Universitário de Coimbra, devo as condições para poder executar o projecto, não só em termos de composição logística e de organização da actividade assistencial, mas também pelo empenho e determinação pessoais com que abordou as vicissitudes que um trabalho desta natureza acaba sempre por acarretar.

O interesse pela inovação endoscópica, nomeadamente pela endomicroscopia, foi suscitado e encorajado pelo Professor Doutor Pedro Figueiredo, meu Orientador do Projecto de Doutoramento, cuja formação académica e a extensa actividade científica têm um indelével pendor endoscópico e inovador. Foi através da sua intervenção e empenho que me foi possível realizar um estágio na Unidade de Endoscopia Digestiva da Johannes Gutenberg University Mainz, dirigida pelo Professor Doutor Ralf Kiesslich, elemento basilar e central na consecução deste projecto.

Devo o gosto pela doença inflamatória intestinal ao meu orientador de formação durante o Internato Complementar de Gastrenterologia, o Dr. Paulo Andrade, e também, inevitavelmente, ao Dr. Francisco Portela, com quem tive o privilégio de trabalhar em proximidade durante a maior parte do internato, ele que é uma das maiores referências nesta área no nosso país.

A oportunidade de trabalhar num Serviço de excelência e de referência, nomeadamente o Serviço de Gastrenterologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, com uma intensa actividade clínica e assistencial, bem como a sua íntima interligação com o Centro de Gastrenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, foi crucial na origem e desenvolvimento do projecto que suporta esta tese.

A escolha do tema, nomeadamente a doença inflamatória intestinal e em particular a sua heterogeneidade, embora influenciada pelas circunstâncias anteriormente mencionadas, teve origem no reconhecimento prático de se tratar duma área em que muitas perguntas importantes permanecem ainda sem as cabais respostas. A doença inflamatória intestinal caracteriza-se pela inflamação crónica e intermitente do tracto digestivo, tem subjacente um componente auto-imune, sem contudo se conhecer a sua etiologia. Trata-se de uma doença com incidência crescente, facto não alheio às modificações do estilo de vida, cujo impacto na qualidade de vida dos doentes, o facto de eclodir frequentemente em idade jovem e de ter associado um risco não despidendo de neoplasia, a sublinham como um capítulo especialmente relevante e actual na área da Gastrenterologia. Acresce que se trata duma doença caracterizada por uma marcada

heterogeneidade que, mais do que reconhecer, importa qualificar e estratificar, para adequar, tanto quanto possível, a abordagem terapêutica e os procedimentos diagnósticos aos diferentes doentes que, tendo a mesma patologia, não têm, na verdade, a mesma doença.

Cada caminho tem uma história. Este caminho, esta história, foram construídos com outras pessoas, a quem, imperativamente, tenho de agradecer.

Ao Senhor Professor Diniz de Freitas, pela forma como me acolheu no Serviço e pela sua importante obra e brilhante carreira clínica e académica que continuam a inspirar e a marcar cada um de nós.

Ao Senhor Professor Doutor Maximino Correia Leitão, a quem devo, desde logo, o gosto pela Gastreterologia por ter sido seu aluno durante o curso de Medicina. Depois, já durante o Internato Complementar de Gastreterologia, devo-lhe o apoio incondicional, o estímulo permanente, a confiança que em mim depositou em múltiplas circunstâncias e o desafio para a carreira académica.

Ao Senhor Professor Doutor Carlos Sofia, agradeço o incentivo e o apoio incondicionais, o empenho franco e determinado em todas as fases do projecto, bem como a perspicácia e o espírito crítico e construtivo que foram decisivos na orientação e edificação deste trabalho.

Ao Senhor Professor Doutor Pedro Figueiredo, meu Orientador do Projecto de Doutoramento, por quem tenho uma profunda admiração e a quem devo o estímulo permanente e indispensável à consecução deste projecto. Às ímpares qualidades clínicas, científicas e humanas, alia uma firme e invulgar determinação, que me contagiou de forma absolutamente decisiva e categórica em múltiplas etapas deste percurso.

Ao Dr. Francisco Portela, com quem tive o privilégio de trabalhar em múltiplos contextos, a quem devo muitos conhecimentos e conselhos. O ensejo profissional e a prossecução do tempo originaram uma amizade que muito prezo. Devo-lhe ainda, mais especificamente, a referenciação da maioria dos doentes que foram incluídos neste estudo, bem como a compreensão e a atenção que dispensou ao projecto no contexto da organização da actividade da Unidade de Endoscopia Digestiva.

Ao Dr. Paulo Andrade, meu orientador de formação durante o Internato Complementar de Gastreterologia, e também, inevitavelmente, à Dra. Manuela Ferreira, gostaria de expressar a minha profunda admiração pelo carácter intelectual e humano e de realçar a minha sincera gratidão pela partilha de experiências, pela disponibilidade incondicional, pelo incentivo permanente e pela franca amizade a que espero ter sabido corresponder.

Ao Senhor Professor José Manuel Romãozinho, com quem tive a grata oportunidade de trabalhar em variados estudos e projectos, agradeço os múltiplos ensinamentos, o encorajamento em várias circunstâncias e o facto de ter modelado, de forma indelével, o meu espírito crítico e raciocínio científico.

Ao Senhor Professor Luis Tomé, reconheço a compreensão manifestada perante as dificuldades encontradas por quem se propõe levar a termo uma tarefa desta natureza, bem como lhe fico grato pelas sugestões e conselhos que nunca regateou.

Ao Centro de Gastrenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, nas pessoas da Professora Doutora Maria Manuel Donato e do Técnico Carlos Alberto, agradeço o suporte técnico, laboratorial e, tantas vezes, moral, que de forma gentil e abnegada dedicaram a este trabalho desde a primeira hora.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, em particular ao Dr. Mário Rui Silva e à Dra. Maria Augusta Cipriano, expresso o meu reconhecimento e gratidão pelo pronto, paciente e dedicado trabalho que devotaram à vertente anátomo-patológica do projecto, contributo verdadeiramente fulcral na concretização do mesmo.

Ao Dr. Hermano Gouveia, Director da Unidade de Endoscopia Digestiva aquando da implementação do trabalho, agradeço a agilidade e eficiência com que nos facultou a utilização dos recursos da respectiva Unidade.

À Dra. Helena Vasconcelos, Directora do Serviço de Gastrenterologia do Centro Hospitalar Leiria-Pombal, manifesto a minha gratidão pelo empenho pessoal e profícuo no recrutamento de doentes, atribuindo a este trabalho um importante carácter multicêntrico.

Ao Dr. Ricardo Cardoso, promissor Interno do Internato Complementar de Gastrenterologia, quero agradecer a prestimosa ajuda em diversas etapas da concretização do projecto e da construção desta tese, destacando, de forma especial, a prontidão e a excelência do apoio que me concedeu na análise estatística inerente a este trabalho.

Ao Dr. Nuno Almeida, distinto Especialista de Gastrenterologia e, também, Aluno de Doutoramento, agradeço a amizade, cumplicidade e entreajuda, que sublinharam, uma vez mais, que qualquer caminho se torna mais fácil quando não o percorremos sozinhos.

Aos Colegas do Serviço de Gastrenterologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra é devido o agradecimento pela colaboração que prestaram, de múltiplas formas e em variadas ocasiões, ao longo da realização deste trabalho.

Aos Colegas Anestésistas que prestam apoio à Unidade de Endoscopia digestiva, em especial ao Dr. Pedro Ribeiro, à Dra. Teresa Almeida e Sousa e à Dra. Conceição Martins, devo um agradecimento peculiar pelos adminículo, compreensão e paciência que nos concederam nos muitos exames endoscópicos em que contámos com a sua preciosa e indispensável colaboração.

Aos Enfermeiros do Serviço de Gastrenterologia agradeço a forma disponível, altruísta e entusiasta com que apoiaram as várias tarefas deste trabalho. Uma palavra, necessariamente especial, de reconhecimento aos Enfermeiros da Unidade de Endoscopia Digestiva, pela disponibilidade e eficiência manifestadas durante a realização dos longos e fastidiosos exames endoscópicos.

Ao Secretariado Clínico e, muito em particular, ao Senhor Alberto Matias, agradeço o suporte incondicional em todas as circunstâncias.

A última palavra e, inevitavelmente, a mais importante, é para a minha família, muito em especial para a minha esposa Raquel e para os meus filhos André e Joana, que perceberam e me apoiaram nos dias cinzentos, inspiraram as minhas acções e têm feito da minha vida a mais compensadora das aventuras.

ÍNDICE

ÍNDICE	
PREFÁCIO	15
RESUMO	25
ABSTRACT	31
NOTA INTRODUTÓRIA	37
PARTE I. MUTAÇÕES DO GENE <i>NOD2/CARD15</i> E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL - PARA ALÉM DA SUSCEPTIBILIDADE	41
<i>Secção 1 - Revisão da Literatura</i>	43
Abreviaturas	45
Capítulo 1. Elementos Genéticos Gerais da Doença Inflamatória Intestinal	47
Capítulo 2. Gene <i>NOD2/CARD15</i> como Gene de Susceptibilidade	55
Capítulo 3. Correlações Genótipo-Fenótipo na Doença Inflamatória Intestinal: o Gene <i>NOD2/CARD15</i> e os Outros	59
Referências Bibliográficas	67
<i>Secção 2 - Contributo Pessoal</i>	87
Capítulo 4. <i>CARD15</i> Mutations and Perianal Fistulating Crohn's Disease: Correlation and Predictive Value of Antibiotic Response	89
Capítulo 5. <i>NOD2</i> Gene Mutations in Ulcerative Colitis: Useless or Misunderstood?	97
PARTE II. NEOPLASIA DO CÓLON NA COLITE ULCEROSA	107
<i>Secção 1 - Revisão da Literatura</i>	109
Abreviaturas	111
Capítulo 6. Características Gerais da Neoplasia do Cólon na Colite Ulcerosa	113
Capítulo 7. Rastreio da Neoplasia do Cólon na Colite Ulcerosa	131
Capítulo 8. Classificação e Tratamento da Neoplasia do Cólon na Colite Ulcerosa	163
Referências Bibliográficas	167
<i>Secção 2 – Contributo Pessoal</i>	191
Capítulo 9. Surveillance in Ulcerative Colitis: Is Chromoendoscopy-guided Endomicroscopy Always Better than Conventional Colonoscopy? A Randomized Trial	193
Capítulo 10. Description and Classification of Confocal Endomicroscopic Images for the Automatic Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease	201

PARTE III. FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES	209
<i>Secção 1 - Revisão da Literatura</i>	211
Abreviaturas	213
Capítulo 11. Focos de Criptas Aberrantes como Precusores e/ou Biomarcadores de Neoplasia do Cólon	215
Referências Bibliográficas	231
<i>Secção 2 – Contributo Pessoal</i>	239
Capítulo 12. Predictive Value of Rectal Aberrant Crypt Foci for Intraepithelial Neoplasia in Ulcerative Colitis – A Cross-Sectional Study	241
SUMÁRIO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	273

RESUMO

RESUMO

Introdução

A doença inflamatória intestinal é uma patologia heterogénea. A definição e caracterização dessa heterogeneidade é determinante na predição da evolução da doença e, conseqüentemente, poderá ser um importante auxiliar na definição das estratégias de diagnóstico, tratamento e seguimento.

Objectivos

A - Verificar se as mutações do gene *NOD2* estão associadas com o risco de desenvolver fístulas perianais (FPs) na doença de Crohn (DC) e se têm valor preditivo da resposta das FPs aos antibióticos.

B - Verificar se, na população portuguesa, as mutações do gene *NOD2* são um factor de risco para colite ulcerosa (CU) e averiguar se existe alguma correlação genótipo-fenótipo.

C - Comparar a endomicroscopia confocal guiada por cromoendoscopia (ECGC) com a colonoscopia convencional (CC) relativamente à detecção de neoplasia intra-epitelial (NIE) em doentes com CU de longa evolução sem colangite esclerosante primária (CEP) e/ou história de NIE.

D - Verificar se os focos de criptas aberrantes (FCA) são um factor de risco para NIE na CU de longa evolução e pesquisar correlações entre características clínico-epidemiológicas e a prevalência/número de FCA.

Métodos

A - Pesquisa de mutações *NOD2* em 203 doentes consecutivos com DC

B - Pesquisa de mutações *NOD2* em 200 doentes com CU e em 202 controlos.

C - Cento e sessenta e dois doentes foram, prospectivamente, randomizados numa proporção 1:1, realizando ECGC (grupo A) ou CC (grupo B). Excluíram-se 17 doentes. No grupo A (n = 72) as lesões detectadas após cromoendoscopia com azul de metileno foram avaliadas por endomicroscopia e posteriormente biopsiadas/polipectomizadas. No grupo B (n = 73) efectuaram-se biopsias nos 4 quadrantes a cada 10cm e biopsia/polipectomia das lesões identificadas.

D - Setenta e seis doentes foram, prospectivamente, rastreados através de ECGC. Pesquisaram-se FCA no recto distal.

Resultados

A - Dos 203 doentes, 60 (29,6%) possuíam pelo menos uma mutação *NOD2* e 55 (27,1%) tinham história de FP. Identificou-se história de FP em 13 (21,7%) dos doentes com mutação e em 42 (29,4%) dos doentes sem mutação ($p = 0,260$). A média de idades ao diagnóstico da primeira FP foi semelhante nos doentes com/sem mutação *NOD2* ($28,7 \pm 9,8$ anos vs. $29,7 \pm 10,1$ anos, $p = 0,758$). O mesmo se verificou relativamente à média de anos decorridos entre o início da doença e o diagnóstico da primeira FP ($4,6 \pm 5,1$ anos vs. $5,0 \pm 5,9$ anos, $p = 0,816$). A resposta das FPs à antibioterapia foi significativamente superior nos doentes sem mutação *NOD2* (7,7% vs. 40,5%, $p = 0,041$).

B - Detectou-se mutação do gene *NOD2* em 28 doentes (14,0%) e em 27 controlos (13,4%) ($p = 0,853$). Durante o primeiro ano de doença o tratamento com corticóides foi mais frequente nos doentes com mutação do que naqueles que não tinham mutação (54,2% vs. 29,6%, $p = 0,018$) e, entre estes doentes, a necessidade de administração endovenosa foi mais comum nos portadores do polimorfismo R702W (90,0% vs. 45,5%, $p = 0,014$). Nos doentes internados com colite grave, a refractariedade à corticoterapia endovenosa e a consequente necessidade de terapêutica de resgate foi significativamente mais frequente nos portadores de mutação (90,0% vs. 38,1%, $p = 0,004$). A taxa de colectomia foi significativamente maior nos doentes com mutação (17,9% vs. 4,1%, $p = 0,015$). Não se identificaram correlações com a necessidade de imunossuppressores/imunomoduladores.

C - Detectaram-se 13 NIE, todas de baixo grau, designadamente 7 no grupo A e 6 no grupo B ($p > 0,05$), distribuídas, respectivamente, por 6 e 4 doentes ($p > 0,05$). O número de biopsias efectuadas foi significativamente superior no grupo B ($4,7 \pm 4,9$ vs. $36,0 \pm 6,2$, $p < 0,001$) e a proporção de biopsias com NIE foi maior, de forma significativa, no grupo A (1/48 vs. 1/438, $p < 0,001$). O exame demorou em média 61,5 \pm 15,6 minutos no grupo A e 40,7 \pm 8,7 minutos no grupo B ($p < 0,001$). A detecção de NIE por endomicroscopia revelou: sensibilidade (S) = 85,7%, especificidade (E) = 97,9%, valor preditivo positivo (VPP) = 75,0% e valor preditivo negativo (VPN) = 98,9%.

D - Detectaram-se 8 NIE em 7 doentes (9,2%). A prevalência e o número de FCA foram 60,5% e $2,4 \pm 2,8$, respectivamente. O número de FCA associou-se, de forma independente, com o risco de NIE (odds ratio = 1,338; intervalo de confiança a 95%: 1,030-1,738). O número de FCA revelou boa calibração (área abaixo da *receiver operating characteristic curve* = 0,829) e boa capacidade discriminativa ($p = 0,205$, teste Hosmer-Lemeshow) na predição da existência de NIE. A prevalência de NIE nos doentes com ≥ 3 FCA revelou-se significativamente superior à dos doentes com < 3 FCA (22,6% vs. 0%, $p = 0,001$). Usando esse *cut-off*, o desempenho dos FCA na predição da existência de NIE foi o seguinte: S = 100%, E = 65,2%, VPP = 22,6% e VPN = 100%. A idade > 40 anos, a história familiar de cancro colo-rectal (CCR) e o índice de massa corporal (IMC) elevado associaram-se a um número de FCA significativamente maior.

Conclusões

A - Na DC, as mutações *NOD2* não têm influência significativa nem na incidência nem no momento da eclosão das FPs. Não obstante, os doentes com FPs portadores de mutação *NOD2* apresentam pior resposta à antibioterapia.

B - As mutações *NOD2* não aumentam o risco de CU mas associam-se a um curso mais agressivo da doença, incluindo maior necessidade de corticóides no primeiro ano, aumento da refractariedade a corticóides endovenosos e incremento da taxa de colectomia.

C - Na CU de longa evolução sem CEP e/ou história de NIE, a ECGC não é significativamente superior à CC na detecção de NIE. A ECGC é mais demorada que a CC, mas diminuí o número de biopsias realizadas e aumenta significativamente a proporção de biopsias com NIE. A EMC tem boa acurácia na detecção de NIE.

D – Os doentes com CU de longa evolução que possuem ≥ 3 FCA têm um risco significativamente superior de apresentar NIE. A idade > 40 anos, a história familiar de CCR e o IMC elevado associam-se de forma positiva e significativa com o número de FCA.

ABSTRACT

ABSTRACT

Background

Inflammatory bowel disease is a heterogeneous disorder. The definition and characterization of this heterogeneity is crucial for the prediction of disease progression and, therefore, may be an important support in the definition of strategies for diagnosis, treatment and follow-up.

Aims

A – To assess whether *NOD2* mutations are associated with increased risk of developing perianal fistulas (PFs) in Crohn's disease (CD) and whether these mutations are predictors of the response of PFs to antibiotics.

B - To assess whether *NOD2* mutations are a risk factor for ulcerative colitis (UC) in Portugal and if there are any genotype-phenotype correlations.

C - To compare chromoendoscopy-guided endomicroscopy (CGE) with conventional colonoscopy (CC) for intraepithelial neoplasia (IN) detection in patients with longstanding UC without primary sclerosing cholangitis (PSC) and/or history of IN.

E - To assess whether aberrant crypt foci (ACF) are a risk factor for IN in longstanding UC and to investigate any correlation between the clinico-epidemiological characteristics and prevalence/number of ACF.

Methods

A - *NOD2* mutations were investigated in 203 consecutive CD patients.

B - *NOD2* mutations were searched in 200 patients with UC and in 202 healthy controls.

C - One hundred sixty-two patients were prospectively randomized to undergo CGE (group A) or CC (group B). Seventeen patients were excluded. In group A (n=72) circumscribed lesions highlighted by pan-chromoendoscopy were evaluated by endomicroscopy and targeted biopsy/polypectomy was performed. In group B (n=73) 4 random biopsies every 10 cm and targeted biopsy/polypectomy of detected lesions were performed.

D - Seventy-six patients were prospectively screened by CGE. ACF were sought in the lower rectum.

Results

A - Of the 203 patients, 60 (29.6%) showed at least one *NOD2* mutation and 55 (27.1%) had history of PF. History of PF was identified in 13 (21.7%) patients with mutations and in 42 (29.4%) patients without mutations ($p = 0.260$). Mean age at diagnosis of first PF was similar in patients with/without *NOD2* mutations (28.7 ± 9.8 vs. 29.7 ± 10.1 years, $p = 0.758$). Average time between disease onset and diagnosis of first PF was also similar in the two groups (4.6 ± 5.1 vs. 5.0 ± 5.9 years, $p = 0.816$). Response of PFs to antibiotics was significantly higher in patients without *NOD2* mutations (7.7% vs. 40.5%, $p = 0.041$).

B - *NOD2* mutations were present in 28 patients with UC (14.0 %) and in 27 controls (13.4 %) ($p = 0.853$). Mutation carriers were more likely to receive steroids during the first year of disease than non-carriers (54.2% vs. 29.6%, $p = 0.018$) and among these patients the need for intravenous administration was more frequent in those with the R702W polymorphism (90.0% vs. 45.5%, $p = 0.014$). In patients with severe colitis admitted for intravenous steroids, a greater proportion of mutation carriers was considered intravenous-steroid refractory and required salvage therapy (90.0% vs. 38.1%, $p = 0.004$). Patients with *NOD2* mutation were submitted to colectomy more frequently than non-carriers (17.9% vs. 4.1%, $p = 0.015$). No correlation with the need for immunosuppressants/immunomodulators was found.

C - Thirteen IN, all low grade, were detected: 7 IN in group A and 6 in group B ($p > 0.05$), distributed, respectively, by 6 and 4 patients ($p > 0.05$). Significantly, more biopsies were performed in group B (4.7 ± 4.9 vs. 36.0 ± 6.2 , $p < 0.001$), and the per-biopsy yield of IN was higher in group A (1/48 vs. 1/438, $p < 0.001$). Examination time was 61.5 ± 15.6 minutes in group A and 40.7 ± 8.7 minutes in group B ($p < 0.001$). The IN detection by endomicroscopy revealed: sensitivity (SE) = 85.7%, specificity (SP) = 97.9%, positive predictive value (PPV) = 75.0%, and negative predictive value (NPV) = 98.9%.

D - Eight INs were detected in 7 (9.2%) patients. The ACF prevalence and mean number were 60.5% and 2.4 ± 2.8 , respectively. The number of ACF was independently associated with the risk of having IN (odds ratio = 1.338; 95% confidence interval 1.030-1.738). ACF number revealed a good calibration (area under the receiver operating characteristic curve = 0.829) and discriminative ability ($p = 0.205$, Hosmer–Lemeshow test) for the prediction of synchronous IN. Patients with ≥ 3 ACF had a significantly higher prevalence of IN than patients with < 3 ACF (22.6% vs. 0%, $p = 0.001$). Using this cut-off value, the performance of ACF in predicting the presence of IN was as follows: SE = 100%, SP = 65.2%, PPV = 22.6%, and NPV = 100%. Age > 40 years, family history of colorectal cancer (CRC), and increased body mass index (BMI) were associated with a significantly higher number of ACF.

Conclusions

A - In CD, *NOD2* mutations are not associated with risk of developing PFs nor with the time of their occurrence. Nevertheless, patients with PFs and *NOD2* mutations show worse response to antibiotics.

B - *NOD2* mutations do not increase the risk of UC but are associated with a more aggressive course including greater need of steroids in the first year after diagnosis, increased incidence of intravenous-steroid refractoriness and a higher colectomy rate.

C - CGE does not improve the detection of IN in the endoscopic screening of patients with longstanding UC without PSC and/or history of IN. CGE takes longer than CC, but it decreases the number of biopsies performed and significantly increases the per biopsy yield of IN. Endomicroscopy is an accurate tool for IN detection.

D - Longstanding UC patients with ≥ 3 ACF have a significantly higher likelihood of having IN. Age >40 years, family history of CRC, and increased BMI have significant positive associations with the number of ACF.

NOTA INTRODUTÓRIA

NOTA INTRODUTÓRIA

A doença inflamatória intestinal é uma patologia crónica e recidivante, com incidência crescente, de etiologia indeterminada mas com indubitável componente auto-imune, que envolve a inflamação do tracto digestivo. É representada, essencialmente, pela doença de Crohn e pela colite ulcerosa, cuja principal característica distintiva diz respeito ao local de atingimento pela doença: qualquer área do tubo digestivo (desde a boca ao ânus) no caso da doença de Crohn e apenas o cólon e recto (na totalidade ou em parte) no caso da colite ulcerosa. Em cerca de 10% dos casos de doença inflamatória intestinal, especificamente em situações em que o envolvimento pela doença se limita ao cólon, os dados clínicos, analíticos, imagiológicos, endoscópicos e histológicos não permitem uma distinção segura entre doença de Crohn e colite ulcerosa, pelo que se atribui à doença a designação de colite não classificada. O termo colite indeterminada fica reservado para aqueles casos em que as dúvidas diagnósticas permanecem mesmo após o estudo anátomo-patológico da peça de colectomia. Na verdade, a separação entre doença de Crohn e colite ulcerosa, apesar dos inegáveis méritos clínicos, é essencialmente um exercício académico, porque a doença inflamatória intestinal incluirá, na realidade, um amplo espectro de manifestações, com a doença de Crohn e a colite ulcerosa típicas nos extremos opostos deste espectro, separadas por um vasto conjunto de formas de apresentação que se podem assemelhar mais a uma ou a outra ou, na porção intermédia do espectro, partilhar equitativamente características de ambas.

A doença inflamatória intestinal assume-se, assim, como uma patologia heterogénea. O seu carácter variegado ultrapassa a forma de apresentação e reflecte-se, igualmente, na evolução da doença, nas potenciais complicações, nas necessidades terapêuticas e nas respostas aos diferentes tratamentos. A percepção dessa heterogeneidade e a compreensão da sua importância bem como das suas virtuais implicações e aplicações inculcou o interesse da comunidade científica nos últimos anos. A investigação em curso intenta categorizar os doentes em diferentes grupos de risco para determinados eventos, ou seja, prever a evolução da doença e, desse modo, utilizar, em conformidade, diferentes estratégias de prevenção, tratamento ou seguimento. O objectivo é, em última análise, a apropinuação da almejada medicina personalizada, numa conduta diagnóstica e/ou terapêutica em que o protagonismo deixa de estar restrito à doença e passa a ser repartido com o doente que dela padece. Este tipo de abordagem afigura-se como primordial numa estratégia que vise modificar o curso da doença sem expor os doentes a riscos desnecessários, ao mesmo tempo que granjeia um perfil de custo benefício aceitável, através duma melhor alocação de procedimentos e de tratamentos de custo não despendendo.

Esta tese pretende ser um contributo para a categorização e translação prática da heterogeneidade da doença inflamatória intestinal em vários contextos, designadamente na predição da evolução da doença, na definição das necessidades terapêuticas e das respostas a diferentes tratamentos e, ainda, no refinamento da estratégia de rastreio de neoplasia do cólon.

Em termos de estrutura, esta tese é composta por três partes, cada uma delas integrando duas secções – a primeira de revisão da literatura e a segunda de contributo pessoal. Cada secção de revisão da literatura inicia-se com uma lista das abreviaturas utilizadas, ordenadas por ordem alfabética, mas, ainda assim, a correspondência a cada uma dessas abreviaturas é especificada no texto aquando da sua primeira utilização. As secções, tanto de revisão da literatura como de contributo pessoal, são compostas por capítulos numerados de forma consecutiva ao longo da tese. Relativamente às referências bibliográficas, por forma a facilitar a sua consulta e dada a natureza e componentes das diferentes partes da tese, são colocadas no final de cada secção de revisão da literatura, enquanto nas secções de contributo pessoal se encontram integradas nos artigos que compõe os diferentes capítulos.

A primeira parte da tese explora a genética, mais especificamente as mutações do gene *NOD2/CARD15*, como potencial elemento preditor na doença inflamatória intestinal, tanto na doença de Crohn como na colite ulcerosa. A segunda parte debruça-se sobre o rastreio de neoplasia do cólon na doença inflamatória intestinal, designadamente na colite ulcerosa, explorando e comparando diferentes métodos de vigilância. Nesta parte e no contexto da utilização da endomicroscopia confocal, desenvolveu-se, em conjunto com uma equipa de engenharia, um trabalho exploratório do potencial da aplicação de sistemas computacionais à análise das imagens obtidas. Na terceira parte abordam-se os focos de criptas aberrantes como possíveis biomarcadores de neoplasia do cólon, uma área promissora mas pouco explorada no âmbito da doença inflamatória intestinal.

A tese termina com um item denominado – sumário, conclusões e perspectivas futuras – onde se aglutina o corolário do trabalho desenvolvido ao longo da consecução deste projecto e se aludem as áreas que requerem desenvolvimento.

PARTE I

MUTAÇÕES DO GENE *NOD2/CARD15* E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL – PARA ALÉM DA SUSCEPTIBILIDADE

SECÇÃO 1

REVISÃO DA LITERATURA

ABREVIATURAS POR ORDEM ALFABÉTICA

CARD15 - *Caspase Activating Recruitment Domain 15*

CCR – Cancro colo-rectal

CU – Colite ulcerosa

DC - Doença de Crohn

DII – Doença inflamatória intestinal

GWAS - *Genome-wide association studies*

IIBDGC - *International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium*

IC – Intervalo de confiança

IL - Interleucina

NOD2 - *Nucleotide oligomerization domain 2*

OR – *Odds ratio*

SNP - Polimorfismo nucleótido singular

CAPÍTULO 1. ELEMENTOS GENÉTICOS GERAIS DA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII)

A DII, incluindo a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerosa (CU), é uma afecção crónica recidivante do tracto gastrointestinal, cuja etiologia se mantém elusiva. Trata-se duma patologia de frequência crescente, com uma prevalência e uma incidência anual que podem atingir, na Europa, respectivamente, 505 por 100000 habitantes e 24,3 por 100000 pessoas/ano no caso da CU e 322 por 100000 habitantes e 12,7 por 100000 pessoas/ano no caso da DC [1]. Em Portugal, no ano de 2007, a prevalência estimada de CU era 71 por 100000 habitantes e a de DC de 73 por 100000 habitantes [2]. O risco de desenvolver DII ao longo da vida ultrapassa 1% nos países industrializados [3]. A sua patogénese parece envolver uma resposta inflamatória/imune desregulada dirigida contra a flora intestinal microbiana em doentes geneticamente predispostos [4-8]. A etiopatogenia da doença incluirá, assim, uma complexa interacção entre factores genéticos, imunológicos, infecciosos e ambientais [4-8].

1.1. ESTUDOS ANIMAIS SUGESTIVOS DA PARTICIPAÇÃO DA GENÉTICA NA SUSCEPTIBILIDADE PARA DII

A capacidade de silenciar ou modificar genes selectivamente [por exemplo da *interleucina (IL) – 2*] em animais contribuiu para a identificação de loci genéticos que poderiam estar envolvidos na patogénese da DII [9,10]. Esses trabalhos conduziram a várias observações importantes:

- A colite é um fenótipo relativamente inespecífico que pode resultar de alterações numa panóplia de genes. Modificações em genes da imunidade inata, da imunidade adaptativa e da função epitelial podem determinar inflamação intestinal [9,10].
- Uma única alteração genética pode associar-se a apresentações clínicas diferentes, dependendo da linhagem de ratos usada, sugerindo que o fenótipo resulta da interacção entre múltiplos loci genéticos [9,10].
- O não desenvolvimento de colite em ratos susceptibilizados geneticamente mas mantidos em ambientes excluídos de bactérias, demonstrou que embora os genes determinem susceptibilidade para a doença, o seu desenvolvimento depende da presença desses microorganismos [9,10].

1.2. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS SUGESTIVOS DA PARTICIPAÇÃO DA GENÉTICA NA SUSCEPTIBILIDADE PARA DII

As primeiras suspeitas duma base genética para a DII resultaram da constatação da existência de agregação familiar de casos, nomeadamente de que 2-14% dos doentes com DC tinham história familiar da doença [11]. Por outro lado, os familiares de primeiro grau de doentes com DII têm uma probabilidade de desenvolver a doença 3-20 superior à da população geral [12-17]. Num dos trabalhos verificou-se que quando ambos os pais têm DII (DC ou CU) o risco dos filhos desenvolverem a doença antes dos 28 anos pode atingir os 33% [12]. A probabilidade do irmão de um doente desenvolver a doença é, em termos de risco relativo e em comparação com a população geral, de 8-15 para a CU e de 25-42 para a DC [18]. Acresce que existe, também, um risco cruzado, ou seja, os familiares de doentes com DC têm risco aumentado de CU (risco 4 vezes superior ao da população geral) e, analogamente, os familiares de doentes com CU têm aumento do risco de desenvolver DC (risco 2 vezes superior ao da população geral) [19].

Os estudos envolvendo gémeos, nomeadamente a concordância de existência de doença entre eles, representam, inegavelmente, o mais forte argumento epidemiológico a favor da participação da genética na etiopatogenia da DII [20-24]. Um desses trabalhos, por exemplo, incluiu 80 gémeos com DII e detectou concordância de doença em gémeos monozigóticos da ordem dos 50% no caso da DC e dos 19% nas situações de CU [23].

Os dados dos dois parágrafos anteriores, para além de sustentarem o papel da genética na susceptibilidade para DII, salientam também que esse papel é mais significativo na DC do que na CU.

Outro argumento a favor da intervenção da genética na origem da DII resulta da existência de antecipação genética, isto é, o desenvolvimento de doença mais grave e mais precoce em descendentes de doentes com DII [17,25,26]. A título de exemplo, num estudo envolvendo 57 crianças com DC nascidas de pais com a mesma doença, 48 delas desenvolveram os sintomas mais cedo do que os progenitores, com uma antecipação, em média, de 16 anos [25].

Por último, a influência genética é também reflectida pela concordância de fenótipos, nomeadamente em termos de localização (ileal vs. cólica) e de comportamento da doença [27-32]. Este facto foi bem ilustrado num estudo envolvendo 72 famílias com pelo menos 2 familiares de primeiro grau com DC [28]. Nesse trabalho, a concordância relativamente à localização e comportamento da doença foi, respectivamente, de 56% e 49% nas famílias com 2 membros doentes e de 83% e 76% nas famílias com 3 ou mais elementos portadores da doença [28].

1.3. HISTÓRIA DOS ESTUDOS GENÉTICOS

Os estudos de ligação genética (*linkage*) baseiam-se no princípio de que se o locus do marcador (sequência conhecida de DNA) estiver na mesma região cromossômica do locus do gene associado à doença, então, a probabilidade de se segregarem em conjunto na meiose é elevada [33]. Este tipo de estudos é dirigido à avaliação de uma ou várias famílias atingidas por uma determinada doença [33]. Quando se consegue associar um marcador de DNA à transmissão da doença, significa que o gene incriminado terá uma localização próxima da do marcador [33].

O primeiro estudo de ligação genética efectuado na DC data de 1996 e identificou um locus de susceptibilidade para a doença no cromossoma 16, resultado que viria a ser confirmado em vários trabalhos subsequentes [34-41]. Em 2001, Hugot e col. e Ogura e col., simultânea e independentemente, descobriram que essa susceptibilidade estava associada a um gene localizado em 16q12 e atribuíram-lhe o nome de *nucleotide oligomerization domain 2 (NOD2)*, rebaptizado, um ano mais tarde, *Caspase Activating Recruitment Domain 15 (CARD15)* [42,43].

A entusiasmante descoberta do *NOD2/CARD15* estimulou a realização adicional de vários estudos de ligação genética, cujos resultados se revelaram, em termos globais, desapontadores, sendo diminuto o número de loci replicados de forma consistente [44]. Na verdade os estudos de ligação genética revelam especial interesse e sucesso nas doenças associadas a loci/genes de elevada penetrância, ou seja, em situações de transmissão Mendeliana. Os resultados obtidos na DC, ou melhor, a debilidade e escassez das agremiações detectadas, sugerem que se trata duma doença associada a hereditariedade complexa.

Outro tipo de avaliação genética é representado pelos estudos de genes candidatos [33]. Os genes a estudar são seleccionados se a sua função biológica sugerir que possam estar envolvidos na doença (candidatos biológicos) ou caso pertençam a uma região previamente identificada por estudos de ligação genética (candidatos posicionais) [33]. Os resultados da maioria dos estudos de genes candidatos foram decepcionantes, com os achados iniciais a falharem, invariavelmente, a replicação em estudos subsequentes [45-48].

A publicação do projecto do genoma humano em 2001 pelo *International Human Genome Sequencing Consortium* e a posterior finalização da sua anotação em 2003, representou um grande contributo para o mapeamento de genes de susceptibilidade para várias doenças de hereditariedade complexa [33]. A ulterior identificação adicional de milhões de polimorfismos nucleótidos singulares (SNP), associada a avanços tecnológicos, designadamente os *microarrays*, tornaram possível e custo-efectiva a pesquisa de milhares de SNP ao longo do genoma, uma estratégia conhecida pelo acrónimo *GWAS (genome-wide association studies)* [49,50].

Os estudos *GWAS*, ao contrário dos estudos de ligação genética, não se restringem à avaliação de nichos familiares, dirigindo a sua pesquisa para diferenças significativas da frequência de alelos ou genótipos entre números consideráveis de doentes e de controlos populacionais, através do rastreio de centenas de milhares de SNPs. Por este motivo, os estudos *GWAS* têm maior poder estatístico que os estudos de ligação genética permitindo, ao contrário destes, a detecção de loci com associação de intensidade ligeira/moderada [51].

O primeiro estudo *GWAS* na DC foi levado a cabo na população Japonesa em 2005 e permitiu identificar o *TNFSF15* como um locus de susceptibilidade para a doença [52]. Seguiram-se, entre 2006 e 2008, vários trabalhos semelhantes, cada um incluindo aproximadamente 500-2000 doentes com DC e um número semelhante de controlos, envolvendo a genotipagem de 100000-600000 SNPs [53-60].

As associações genéticas identificadas nesses primeiros estudos *GWAS* desvendaram e/ou confirmaram vários processos biológicos subjacentes à DC. Merecem destaque as associações com os genes *ATG16L1* e *IGRM* que, pela primeira vez, sugeriram a participação da autofagia na patogénese da DII [6,53,57]. Outros genes, envolvidos na imunidade inata (*TLR4*, *CARD9*, *IL23R*, *STAT3*) ou na imunidade adaptativa (*HLA*, *TNFSF15*, *IRF5*, *PTPN22*), foram também implicados [61]. Estes estudos *GWAS* revelaram ainda a existência de sobreposição genética entre a DC e outras doenças imunomediadas. Cerca de 30% das variantes identificadas eram partilhadas pela CU e, mais curioso, 50% dos loci eram compartilhados com pelo menos uma outra doença imunomediada, com destaque para a diabetes tipo 1, a doença celíaca e a artrite reumatóide [62]. Contudo, ao contrário da maioria dessas doenças, na DC os genes da região do antigénio leucocitário humano (*HLA*) apenas se associaram a um efeito moderado no risco para a doença [ORs 1,1-1,2] [63]. Em contraste, na CU múltiplas variantes do *HLA-B* revelaram contribuição de maior magnitude na susceptibilidade para doença [ORs 1,4-1,5] [63].

Para aumentar o tamanho das amostras estudadas e, dessa forma, incrementar o poder de detecção de associações significativas, foi criado o *International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium (IIBDGC)* (<http://www.ibdgenetics.org/>), intentando juntar investigadores e bases de dados de *GWAS* de DII de todo o mundo [33]. Entre 2008 e 2012 o *IIBDGC* publicou três meta-análises de estudos *GWAS*. O primeiro desses trabalhos, datado de 2008, combinou dados de cerca de 13000 indivíduos procedentes de três estudos *GWAS* previamente publicados, permitindo identificar 21 novos loci de susceptibilidade para DC [64]. Seguiu-se, dois anos mais tarde, uma meta-análise de 6 estudos *GWAS*, envolvendo à volta de 50000 indivíduos e identificando 30 novos loci associados a aumento de susceptibilidade para DC [65]. A meta-análise mais recente foi publicada em 2012, incluiu 75000 indivíduos e fixou o número total de loci de susceptibilidade para DII em 163, dos quais 30 são específicos da DC, 23 específicos da CU e os restantes 110 partilhados pelas duas patologias [63]. Na sequência deste trabalho, a DII tornou-se a doença com maior número de loci de susceptibilidade identificados [33]. Os novos loci de susceptibilidade abrangem genes envolvidos em imunodeficiências primárias e, de forma especialmente representativa, genes implicados na susceptibilidade

para doenças causadas por micobactérias. Saliente-se, ainda, que do total de 163 loci 66 são compartilhados com outras doenças de base imunológica [33].

O mapeamento genético da DII não é uma tarefa acabada. Desde logo porque algumas das variações genéticas associadas a aumento do risco da doença não estão claramente agremiadas a um gene em particular. Várias centenas de genes residem nos 163 loci de susceptibilidade para DII e para muitos desses loci o gene específico envolvido na associação genética ainda não se encontra identificado [66].

1.4. A HEREDITARIEDADE PERDIDA

Apesar dos importantes e fascinantes avanços no conhecimento da base genética da DII, os loci reconhecidamente aliados a aumento de susceptibilidade para a doença explicam apenas 20-25% da hereditariedade que lhe está associada [67-69]. Este fenómeno, que não é exclusivo da DII sendo encontrado em várias outras doenças poligénicas, é conhecido como hereditariedade perdida ou vacuidade genética [70]. Para esta lacuna poderão concorrer múltiplos factores:

- Loci/genes não identificados - Apesar da importância e do poder estatístico dos estudos GWAS, é preciso salientar que nesses trabalhos é feita a pesquisa de variantes genéticas relativamente comuns, nomeadamente de SNPs com frequência > 1% na população geral [33,71,72]. Deste modo, parte da hereditariedade ainda não justificada pode estar relacionada com variantes genéticas raras ou desconhecidas [33,71,72].
- Interacção genética - Mais provável do que a existência de genes não identificados é a possibilidade, crescentemente consubstanciada, duma parte da vacuidade genética ser explicada pela interacção, potenciadora ou frenadora, dos genes entre si [70,73]. A literatura mais recente é fértil em estudos que suportam a existência de interacção entre diferentes genes [5,73-83]. A previsível complexidade desta malha genética justificará, muito provavelmente, a maioria das discrepâncias entre os diversos estudos e, simultaneamente, aconselha a olhar com reservas algumas das conexões, sobretudo as que não auguraram replicação [5,73-83]. O desenvolvimento e refinamento de programas e métodos de análise de associações múltiplas podem ser um poderoso auxiliar na elucidação desta trama genética [84].
- Epigenética e as interacções entre genética e ambiente - No que se refere às interacções entre a genética e o ambiente, a primeira evidência da sua existência foi, necessariamente, indirecta, ou seja, decorrente de dados epidemiológicos que demonstraram heterogeneidade geográfica na contribuição genética para a susceptibilidade da DII [85,86]. Recentemente, os factores epigenéticos foram aventados como potenciais mediadores dessas interacções [87]. A epigenética reporta-se a modificações da função genética herdadas mitoticamente e não decorrentes de alterações da sequência de DNA, mas antes de mudanças na estrutura e/ou na função da cromatina [87]. Os principais

mecanismos epigenéticos incluem a metilação do DNA, as modificações de histonas, a interferência no RNA e as alterações no posicionamento de nucleossomas [87]. Existe evidência da aquisição de alterações epigenéticas com o decorrer da idade, causadas por múltiplos factores ambientais [88]. Por outro lado, os estudos *GWAS* verificaram que genes codificadores de enzimas envolvidas na regulação de fenómenos epigenéticos, nomeadamente da DNA metiltransferase 3a e 3b, se associam a aumento da susceptibilidade para DC [63,65]. Acresce que os mecanismos epigenéticos também já demonstraram participação na regulação do sistema imune, nomeadamente na diferenciação das células Th2 que se encontra dependente do silenciamento epigenético do locus *IFNG* [89]. Assim, a epigenética pode desempenhar um papel central na patogénese da DII, mediando interacções entre elementos genéticos e factores ambientais tais como o microbioma intestinal e, dessa forma, pode explicar uma parte da hereditariedade dita perdida [87]. O aprofundamento do conhecimento dos elementos epigenéticos associados à DII pode suscitar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, nomeadamente dirigidas a mecanismos epigenéticos específicos ou às vias por eles controladas [87].

1.5. GENÉTICA E PATOGÉNESE DA DC E DA CU – O QUE AS UNE E O QUE AS SEPARA

As variantes genéticas associadas a aumento da susceptibilidade para DII participam, quase invariavelmente, em uma ou mais das seguintes vias da patogénese da DII:

- Imunidade inata - A imunidade inata desempenha um papel crucial na resposta imune do hospedeiro através da participação no reconhecimento microbiano a nível intracelular [90]. O representante major desta categoria é o gene *NOD2/CARD15* cuja abordagem será efectuada, detalhadamente, no capítulo seguinte [91]. Outros genes com participação na imunidade inata e igualmente associados a aumento do risco de DC são o *OCTN* e o *TLR* [91,92].
- Autofagia - Vários genes associados a aumento da susceptibilidade para DC (*ATG16L1*, *IRGM* e *LRRK*) regulam a autofagia, um processo inato da homeostase que permite a reciclagem de organelos e contribui para a remoção intracelular de microorganismos [6,53,55,57,93,94]. Recentemente o gene *NOD2/CARD15* também foi implicado na regulação da autofagia, sugerindo uma estreita correlação entre esta via e a imunidade inata [95,96]. Especificando, o produto do gene *ATG16L1* é recrutado para a membrana plasmática pelo *NOD2/CARD15*, onde inicia a internalização bacteriana pelos autofagossomas [96].
- Imunidade adaptativa/adquirida - Genes envolvidos na imunidade adaptativa, nomeadamente na regulação das vias que envolvem a IL-17 e a IL-23, foram associados a aumento do risco de DII [54,69]. Nesse grupo incluem-se genes agremiados a aumento da susceptibilidade para DC e CU (*IL23R*, *IL12B*, *STAT3*, *JAK2* e *TYK2*) e outros apenas implicados no aumento do risco de DC (*IL-27* e *TNFSF15*) [54,68,69,97]. Alguns destes genes (*STAT3*, *JAK2* e *TYK2*) sobrepõem-se à via imunorreguladora da IL-10,

a qual, por seu turno, também já foi associada, independentemente, a aumento do risco de DC e de CU [67]. O gene *IL23R* codifica uma subunidade do receptor da citocina pró-inflamatória IL-23 a qual, por sua vez, se encontra envolvida na gênese de células Th17 [67].

- Regulação da função epitelial. Diversos genes envolvidos na função de barreira epitelial foram especificamente associados com aumento da susceptibilidade para CU e não para DC (*OCTN2*, *ECM1*, *CDH1*, *HNF4A*, *LAMB1* e *GNA12*) [68,98,99]. Destaque para o gene *CDH1* que codifica a caderina E.

Múltiplos estudos avaliaram potenciais associações da DII com loci do complexo major de histocompatibilidade (MHC) [100-116]. Em termos globais, esses estudos demonstraram uma associação entre o *HLA-DR2* e aumento da susceptibilidade para CU, particularmente na população japonesa, e, ainda, maior frequência de manifestações extra-intestinais nos doentes com DC com *HLAA2*, *HLA-DR1* e *DGw5*. Num estudo *GWAS* da população japonesa o haplótipo *HLA-Cw*1202-B*5201-DRB1*1502* associou-se a risco aumentado de CU e, inversamente, a risco diminuído de DC [117]. Outros trabalhos identificaram os loci *HLA DRB1*0103* e *HLA-DQA1* como elementos associados a susceptibilidade aumentada para CU [63,118,119]. Os resultados dos diversos estudos revelam, na verdade, várias dissensões. Algumas dessas discrepâncias poderão ter resultado dos diferentes métodos utilizados na análise do MHC, sendo a avaliação molecular uma opção que apenas recentemente ficou disponível [63].

Existe, agora, um conhecimento detalhado da arquitectura genética molecular da DII e, particularmente, das áreas de sobreposição entre DC e CU (como a via Th17), bem como das áreas específicas de cada uma dessas doenças [*NOD2/CARD15* e autofagia na DC e complexo major de histocompatibilidade (MHC) e genes de barreira epitelial na CU] [120]. Estas diferenças caracterizam a DC predominantemente como uma doença do sistema imune e/ou de perturbação do reconhecimento/processamento de bactérias intracelulares enquanto a CU se assume, essencialmente, como uma doença de permeabilidade mucosa alterada [121]. Estas dissemelhanças genéticas e a respectiva tradução patogénica representam uma potencial e atractiva explicação para o carácter de atingimento de cada uma das doenças, nomeadamente o envolvimento transmural na DC e a inflamação limitada à mucosa na CU [122].

1.6. IMPORTÂNCIA E POTENCIALIDADE DA GENÉTICA NA DII

A descoberta dos componentes integrantes da susceptibilidade genética para DII assume importância e potencial utilidade em múltiplos contextos.

No âmbito do diagnóstico, e contrariando algumas expectativas, é pouco plausível que os elementos genéticos venham a assumir papel preponderante, uma vez que se trata duma doença complexa, envolvendo múltiplos genes, todos eles com baixa penetrância e, muito provavelmente, com intrincadas interacções, não apenas entre si mas também com factores ambientais [33,123,124].

Em termos moleculares, a descoberta de genes associados a risco aumentado de DII ou, melhor, dos produtos codificados por esses genes, representa um interessante e poderoso auxiliar no deslindamento de potenciais vias implicadas na patogénese da DII e, conseqüentemente, alarga o horizonte para novas opções terapêuticas [71]. Embora seja difícil mitigar as conseqüências nefastas da inflamação sem, simultaneamente, comprometer a capacidade de defesa do sistema imune, o incremento do conhecimento da patogénese da DII proporcionado pelas descobertas genéticas alimenta a esperança do desenvolvimento de terapêuticas dirigidas aos mecanismos subjacentes à doença, em vez da habitual acção predominantemente imunossupressora [71,125,126].

Por ventura a aplicação que actualmente se revela mais atraente e factível diz respeito à utilização da genética como elemento prognóstico, ou seja, como factor preditivo de fenótipos mais ou menos agressivos, servindo, dessa forma, de auxiliar nas decisões terapêuticas e aproximando a prática da almejada medicina personalizada [123,127]. A personalização terapêutica ambiciona determinar quais os doentes com maior probabilidade de beneficiar duma certa terapia e, analogamente, identificar aqueles em que essa mesma terapêutica tenha maior risco de se revelar ineficaz ou geradora de efeitos adversos [127]. Na DII, a cronicidade da patologia, o curso imprevisível e potencialmente grave, associados à existência de fármacos eficazes mas dispendiosos e com carácter imunossupressor, personificam um contexto particularmente atractivo para a aplicação da medicina personalizada [127]. É importante dispor, nesta patologia, de ferramentas que permitam identificar os doentes com maior probabilidade de desenvolverem doença com curso grave e que, por isso, beneficiarão duma intervenção mais precoce e intensiva. Paralelamente, os doentes com prognóstico mais favorável poderão ser poupados aos efeitos nefastos de terapêuticas desnecessárias e potencialmente nóxias [127].

CAPÍTULO 2. NOD2/CARD15 COMO GENE DE SUSCEPTIBILIDADE

Foram identificadas cerca de 30 mutações do gene *NOD2/CARD15* das quais se destacam, pela maior frequência, 2 do tipo *missense* (*R702W* e *G908R*) e 1 mutação de inserção (*3020insC*) [128,129]. Estas três mutações representam 82% da variação do gene associada à DC e, por esse motivo, têm concentrado a investigação no que se refere à pesquisa de associações envolvendo o gene *NOD2/CARD15* [130]. Neste sentido, este capítulo cinge-se à abordagem destas três variantes como marcadores de susceptibilidade.

2.1. VIAS MOLECULARES DO GENE *NOD2/CARD15*

O gene *NOD2/CARD15* codifica uma proteína intracelular presente nos monócitos, macrófagos, células de Paneth e células epiteliais intestinais, que funciona como um sensor de detecção de bactérias através do reconhecimento de um dos seus componentes – o peptidoglicano [131,132]. Esse reconhecimento activa o factor nuclear κ B e desencadeia a produção de substâncias antimicrobianas (incluindo α -defensinas), elementos fundamentais para impedir a agressão do hospedeiro, designadamente a translocação bacteriana intestinal [131,133-135]. As mutações do gene *NOD2/CARD15* determinam tradução duma proteína alterada, com o conseqüente compromisso da sua função de sensor bacteriano e, por conseguinte, perturbação da via do factor nuclear κ B e da produção de α -defensinas, factores que parecem ser importantes na fisiopatologia da DC [135-139]. O factor nuclear κ B desempenha, aparentemente, um papel central na DII, através da regulação da transcrição de genes que codificam citocinas pro-inflamatórias, incluindo o factor de necrose tumoral α (TNF α) [140]. Mais recentemente, o gene *NOD2/CARD15* também foi implicado no controlo de outras vias moleculares, nomeadamente da autofagia, da apoptose e da produção do interferão tipo I [95,96].

2.2. MUTAÇÕES DO GENE *NOD2/CARD15* E SUSCEPTIBILIDADE PARA DC

Depois da descoberta, por Hugot e col. e Ogura e col., da associação entre as mutações do gene *NOD2/CARD15* e susceptibilidade aumentada para DC, essa mesma conexão foi confirmada por diversas equipas de investigação [42,43,129,132,141-147]. Não obstante, a prevalência das mutações do gene *NOD2/CARD15* e a magnitude da sua associação com o risco de DC é maior na América do Norte e na Europa Ocidental (pelo menos umas das 3 principais mutações do gene *NOD2/CARD15* presentes em cerca de 40% dos doentes com DC e em apenas 0,5 a 20% dos controlos, $p < 0,05$) do que na Europa do Norte, apesar da incidência de DII ser semelhante nessas regiões [86,124,129,148]. Em Portugal foi identificada mutação do gene *NOD2/CARD15* em 21-34% dos doentes com DC e em 9,9-16% da população controlo ($p < 0,05$) [149-151]. Acresce que as mutações do gene *NOD2/CARD15* se encontram ausentes ou, se presentes, não se associam a risco aumentado de DII nas populações Asiáticas, incluindo Japoneses, Coreanos, Chineses,

Indianos e Malaios [85,152-163]. Resultados semelhantes, ou seja, ausência de associação entre as mutações do gene *NOD2/CARD15* e o risco de DII, foram reportados no Chile e na Turquia [164,165]. Estes dados sugerem a existência de variação geográfica/étnica no contributo das variantes do gene *NOD2/CARD15* para a susceptibilidade de DC.

Vários estudos caso-controlo demonstraram a existência de um efeito de “dose genética”, representado pelo facto dos heterozigotos para qualquer uma das 3 principais mutações do gene *NOD2/CARD15* terem risco de DC 1,5-4,3 vezes superior ao dos indivíduos sem mutação, enquanto nos homozigotos ou heterozigotos compostos esse risco é 20 a 40 vezes superior [165-167]. Mais recentemente, três meta-análises confirmaram a existência do efeito de “dose-genética”, mas atribuíram-lhe menor magnitude do que a reportada nos estudos caso-controlo [130,168,169]. Considerando a última avaliação, que incluiu 79 estudos, os *odds ratios* (ORs) para DC foram 2,4 [intervalo de confiança (IC) 95%: 2,0-2,8), 9,0 (IC 95%: 6,0-13,5) e 6,7 (IC 95%: 4,1-10,9) para os heterozigotos simples, heterozigotos compostos e homozigotos, respectivamente, em comparação com controlos sem mutação [130].

O aumento da susceptibilidade para DC determinado pelas mutações do gene *NOD2/CARD15* assume magnitude semelhante na doença pediátrica e na que surge em idade adulta [170]. É interessante notar que o gene *NOD2/CARD15* não contribui ou tem tributo modesto para a agregação familiar da DC. Dos 5 estudos caso-controlo que analisaram esta questão, dois detectaram maior frequência da mutação nos casos com história familiar enquanto os restantes três trabalhos reportaram distribuição semelhante das mutações independentemente da agregação familiar da doença [145,171-174]. Por seu turno, uma meta-análise publicada em 2009 revelou que o aumento de susceptibilidade para DC associado às mutações *NOD2/CARD15* tem monta semelhante entre casos esporádicos e casos familiares [130]. Outra questão interessante diz respeito à penetrância, ou seja, à taxa de DC entre portadores da mutação a nível populacional, assumindo uma cifra de 0,6% entre heterozigotos e de 5% entre homozigotos [175].

2.3. MUTAÇÕES DO GENE *NOD2/CARD15* E SUSCEPTIBILIDADE PARA CU

No que diz respeito à CU, a maioria dos estudos apontou no sentido da ausência de associação entre as mutações do gene *NOD2/CARD15* e a susceptibilidade para a doença [74,129,130]. Esta conclusão não é, contudo, consensual, já que alguns trabalhos detectaram um aumento do risco de CU, ainda que modesto, nos portadores de mutações do gene *NOD2/CARD15* [176-180].

2.4. MUTAÇÕES DO GENE *NOD2/CARD15* E SUSCEPTIBILIDADE PARA OUTRAS DOENÇAS

O cancro colo-rectal (CCR) associado à DII é um excelente modelo exemplificativo da relação entre inflamação crónica e cancro, podendo fornecer algumas pistas importantes para a compreensão da etiopatogénese do CCR esporádico [181]. Como a mucosa cólica normal se encontra num estado de permanente inflamação de baixo grau em consequência da contínua exposição à flora microbiana, é razoável especular que essa inflamação intestinal possa desempenhar um papel importante na origem do CCR esporádico [182].

Neste contexto e na sequência da associação do gene *NOD2/CARD15* a aumento da susceptibilidade para DII surgiu, natural e inevitavelmente, o interesse em pesquisar a sua associação com o risco de CCR esporádico. Os estudos nesta área, incluindo um do nosso grupo, produziram resultados controversos [183-189]. No nosso trabalho, a variante *R702W* revelou-se significativamente mais frequente nos doentes com CCR do que nos controlos, enquanto a frequência das variantes *G908R* e *3020insC*, bem como a frequência combinada das três variantes, não diferiram significativamente entre os dois grupos [183]. Estes resultados são concordantes com os de Roberts e col. que, na Nova Zelândia, num estudo que incluiu 133 doentes com CCR, verificaram que das três variantes apenas a *R702W* se associava significativamente com o CCR [188]. No entanto, nesse estudo, ao contrário do nosso, a frequência combinada das três variantes foi significativamente superior nos doentes com CCR do que nos controlos [188]. Por outro lado, Papaconstantinou e col. constataram a existência duma associação significativa entre qualquer uma das 3 variantes *NOD2/CARD15* e o risco de CCR esporádico na Grécia e Kurzawski e col. descreveram uma correlação significativa entre a variante *3020insC* e CCR em doentes Polacos [184,185]. Em sentido contrário, Alhopuro e col., Tuupanen e col. e Lakatos e col. verificaram que, nas populações da Finlândia e da Hungria, a incidência de mutações do gene *NOD2/CARD15* não era significativamente superior nos doentes com CCR [186,187,189]. Não obstante, relativamente à Finlândia, a interpretação dos resultados deve ser feita tendo em atenção a baixa incidência das mutações *NOD2/CARD15* na população escandinava [186,187].

Fora do âmbito da DII e para além da pesquisa de associação com o CCR esporádico, o gene *NOD2/CARD15* tem sido estudado noutras situações clínicas. Dada a sua participação no controlo da imunidade inata, essas pesquisas têm-se centrado, essencialmente, na avaliação de potenciais associações com doenças inflamatórias, infecciosas e neoplásicas. Com reservas impostas por dados amiúde controversos, elencam-se, de seguida, algumas das associações detectadas:

- Doenças granulomatosas como a síndrome de Blau e a sarcoidose de início precoce, embora as variantes/mutações do gene *NOD2/CARD15* que aumentam o risco dessas patologias sejam diferentes das que se associam a incremento da susceptibilidade para DII [190,191].
- Apendicite [192]

- Fissura/fístula/abcesso anais [192]
- Artrite psoriática [193]
- Rinite alérgica e dermatite atópica [194]
- Sépsis - aumento do risco e da mortalidade associada a essa condição [195,196]
- Peritonite bacteriana espontânea [197,198]
- Carcinoma gástrico [199,200]. Um dos estudos foi conduzido no nosso centro e restringiu a associação a um aumento do risco de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal em doentes com a variante *3020insC* [199]
- Linfoma gástrico [201]
- Cancro do pulmão [202]
- Cancro da mama [202,203].

CAPÍTULO 3. CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO NA DII: O GENE *NOD2/CARD15* E OS OUTROS

3.1. A IMPORTÂNCIA DA PREDIÇÃO DO FENÓTIPO

A predição do fenótipo de uma doença, ou melhor, a previsão do seu prognóstico e da sua evolução e a consequente abordagem em função dessa presciência, constituem a base da ambicionada medicina personalizada [123,127]. A DII congrega um conjunto de características que a tornam num contexto em que a predição da evolução da doença seria especialmente profícua. Trata-se, desde logo, duma patologia crónica que eclode frequentemente em idade jovem e que avoca amiúde um impacto significativo na qualidade de vida dos doentes [3,204,205]. Acresce que a doença assume uma marcada heterogeneidade, nomeadamente em termos de comportamento, resposta a tratamentos médicos, necessidade de cirurgia e história natural [3,206-209]. Por outro lado, a maior parte dos medicamentos disponíveis, sobretudo os mais efectivos, têm carácter imunossupressor, pelo que a sua utilização, previsivelmente prolongada, se associa a potenciais riscos, sobretudo de doenças infecciosas e neoplásicas [210-212]. Por último, apesar da utilização crescente de medicação imunossupressora, na DC o risco a longo prazo de cirurgia de ressecção intestinal e de ileostomia permanente é, respectivamente, de 80% e de 10%, e na CU o risco de colectomia é de cerca de 1% ao ano, em coortes populacionais do Norte da Europa [3,208]. Na verdade, a história natural da doença não registou mudanças tão expressivas como as que seriam de esperar atendendo à emergência de terapêuticas mais efectivas, muito provavelmente devido ao facto destas serem introduzidas tardiamente, ou seja, numa altura em que o curso natural da doença já não será susceptível de ser invertido ou frenado de forma significativa [209,213].

A importância do momento de introdução da terapêutica encontra-se bem reflectida num estudo português recentemente publicado [214]. Nesse trabalho, verificou-se que a utilização da azatioprina em monoterapia ou em combinação com agentes anti-TNF α em doentes com DC com comportamento inflamatório, não só atrasa a progressão para fenótipo estenosante ou penetrante como também diminui o risco de ocorrência dessa progressão [214]. Simetricamente, longos hiatos temporais entre o diagnóstico da doença e a introdução desses fármacos associaram-se a aumento do risco de progressão da doença [214]. No mesmo sentido apontam os resultados de uma coorte populacional de doentes com DC diagnosticada entre 1986 e 2003 [215]. Os autores verificaram que ao longo desse período se registou uma utilização progressivamente mais frequente e mais precoce de azatioprina e que, paralelamente, se verificou uma diminuição da necessidade de realização de cirurgia intestinal [215]. Além do momento do início da terapêutica a sua duração é outro elemento a ter em conta [216]. Peryn-Biroulet L e col. verificaram que o risco de cirurgia abdominal nos doentes sob medicação com azatioprina há menos de 1,5 meses ou com

agentes anti-TNF α há menos de 16 meses era significativamente superior ao dos doentes expostos a esses fármacos durante períodos mais prolongados [216].

Os argumentos elencados nos parágrafos anteriores realçam a enorme utilidade e premência do desenvolvimento de ferramentas prognósticas na DII. Dispor dessa possibilidade permitirá a introdução de terapêutica mais precoce, efectiva e intensiva em doentes com prognóstico mais sombrio e, ao mesmo tempo, poupar tratamentos desnecessários e/ou nefastos a doentes com patologia previsivelmente indolente [217]. Poder-se-á, dessa forma, ambicionar a alteração da história natural da doença com uma estratégia dotada de segurança e custo-efectividade.

3.2. FORMAS DE PREDIÇÃO DO FENÓTIPO

As principais formas de predição do fenótipo/prognóstico da DII incluem características clínicas, marcadores serológicos e, mais recentemente, determinantes genéticos [217].

3.2.1. Clínica

Tratando-se duma doença heterogénea e multifacetada, o prognóstico da DC dependerá, muito provavelmente, não de uma ou outra característica clínica isolada mas antes da conjunção de diversos elementos. Este foi o princípio subjacente ao trabalho desenvolvido em 2006 pela equipa liderada por Beaugerie L [218]. Nesse estudo envolvendo 1188 doentes com DC, os investigadores começaram por identificar os factores independentes de risco para doença grave/incapacitante que incluíram, além da idade < 40 anos ($OR = 2,6$; IC 95%: 1,3-3,6), a doença perianal ($OR = 1,8$; IC 95%: 1,2-2,8) e a necessidade de corticoesteróides na apresentação da doença ($OR = 3,1$; IC 95%: 2,2-4,4) [218]. De seguida objectivaram que o valor preditivo positivo da presença de doença grave/incapacitante era de 61%, 67%, 91% e 94% quando estavam presentes, respectivamente, 0, 1, 2 e 3 desses factores prognósticos, pelo que sugeriram como modelo preditivo de mau prognóstico a existência de pelo menos dois desses factores [218].

Dois anos mais tarde, Loly C e col. desenvolveram um trabalho que teve como objectivos validar o modelo anterior e identificar eventuais elementos prognósticos adicionais [219]. Deste estudo destacam-se três resultados importantes. O primeiro refere-se ao facto de, ao contrário do trabalho anterior, a idade < 40 anos não ter sido identificada como um factor independente de risco para doença grave/incapacitante, o que os próprios autores assumem que poderá ter resultado, pelo menos em parte, da sua amostra de 361 doentes incluir poucos indivíduos com mais de 40 anos [219]. O segundo resultado que importa realçar diz respeito à identificação adicional de três factores de mau prognóstico, nomeadamente a apresentação da doença com localização íleo-cólica ($OR = 1,74$; IC 95%: 1,06-2,8), com carácter estenosante ($OR = 2,11$, IC 95%: 1,39-3,20) e com perda de peso > 5kg ($OR = 1,67$, IC 95%: 1,14-2,45) [219]. Por último, salienta-se que a aplicação dos modelos prognósticos construídos a partir dos resultados obtidos revelaram um desempenho decepcionante,

com acurácia diagnóstica pouco acima dos 50%, ou seja, constrangedoramente próximo duma selecção passível de se obter com uma escolha aleatória [219].

No que diz respeito à CU, a colite extensa à apresentação tem sido agremiada com um curso clínico mais agressivo nos primeiros 5 a 10 anos de doença, foi consistentemente identificada como um preditor independente do risco de colectomia dentro de um período de 10 anos após o diagnóstico e é considerada um importante factor de risco para CCR [208,217,220-223]. O diagnóstico da doença em idade jovem e o sexo feminino foram associados, em dois estudos, com uma tendência estatística para maior frequência de recidivas [221,222].

3.2.2. Serologia

Existem múltiplos estudos que avaliaram o valor preditivo dos marcadores serológicos na DC. A reactividade para ASCA, OmpC, anti-I2 e CBir1 foi associada com doença de início em idade mais jovem, comportamento estenosante ou penetrante e necessidade precoce de cirurgia de ressecção de intestino delgado [224-226]. No grupo pediátrico, a reactividade basal para ASCA foi agremiada com complicações mais precoces, doença recidivante e necessidade de múltiplas cirurgias [227]. O valor prognóstico dos marcadores serológicos parece assumir um efeito aditivo, na medida em que a frequência das complicações associadas à doença aumenta em paralelo com o incremento do número de marcadores positivos (ASCA, anti-I2, anti-OmpC e anti-CBir1) [228]. O pANCA foi identificado como elemento preditor de doença menos grave, com fenótipo CU-like e baixo risco de complicações envolvendo o intestino delgado [226,229]. Em doentes com DC luminal refractária, a combinação pANCA+/ASCA- revelou uma tendência estatística ($p = 0,067$) para associação com ausência de resposta a infliximab [230]. A positividade do ASCA foi associada com risco de DC da bolsa após realização de proctocolectomia com construção de bolsa íleo-anal [231].

Na CU, elevados níveis de pANCA foram associados com aumento do risco de bolsite nos doentes submetidos a proctocolectomia com construção de bolsa íleo-anal [232]. Por outro lado, a ausência de pANCA foi identificada como elemento preditor independente de resposta rápida ao infliximab [233].

3.2.3. Genética

A identificação de factores genéticos com valor prognóstico na DII é uma estratégia bastante atractiva por diversas ordens de razão. Desde logo porque estão presentes ao diagnóstico da doença e mesmo antes da sua eclosão. Além disso, assumem um carácter objectivo, elemento difícil de assegurar quando se utilizam as características clínicas como elementos preditivos. Por último, mantêm-se estáveis a longo prazo, característica que não é partilhada pelos marcadores serológicos.

A existência de correlação entre o genótipo e a expressão fenotípica da doença é suportada pelo padrão hereditário de algumas das suas características, nomeadamente no que diz respeito à concordância da sua localização (ileal vs. cólica) e do seu comportamento [27-32].

As associações fenotípicas/prognósticas estabelecidas com elementos genéticos na DII são minudenciadas nos próximos itens deste capítulo.

3.3. DC – CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO ENVOLVENDO O GENE *NOD2/CARD15*

Encontram-se identificadas múltiplas conexões entre as mutações do gene *NOD2/CARD15* e o fenótipo da DC, entre as quais a mais consistente diz respeito à localização ileal da doença [141-143,172,179,180,234-245]. Não obstante, esta associação não foi replicada num estudo publicado em 2003 envolvendo uma coorte populacional de 182 doentes, resultado que pode dever-se, pelo menos parcialmente, ao pequeno tamanho da amostra [246].

Uma outra associação frequentemente estabelecida é com o comportamento estenosante da doença, ainda que nem sempre seja claro se essa conexão é independente da maior predisposição para a localização ileal da patologia [129,146,180,235,236,240,244,247-249]. Importa salientar, contudo, que vários trabalhos, incluindo uma meta-análise, falharam na identificação de conexão entre doença estenosante e o genótipo *NOD2/CARD15* [142,143,169,241,250].

Ainda no que se refere ao comportamento da doença, alguns trabalhos associaram as mutações do gene *NOD2/CARD15* a aumento do risco de doença penetrante, mas um outro estudo detectou uma relação oposta, ou seja, protecção relativa para doença penetrante nos doentes portadores de mutação [142,146,172,235,240]. Num trabalho a doença perianal (fissura, fistulas e abscessos) foi detectada mais frequentemente nos doentes com mutação, mas outros dois estudos não encontraram conexão entre essas duas variáveis [171,251,252]. Considerando especificamente as fístulas perianais, um estudo não detectou qualquer associação com o genótipo *NOD2/CARD15*, enquanto outro trabalho relacionou a existência de mutação com risco diminuído de fistulização perianal [31,236].

A associação entre as mutações do gene *NOD2/CARD15* e a eclosão da doença em idade mais jovem é amiúde referida e é suportada por evidência de um conjunto apreciável de trabalhos [129,131,142,168,171,172,178,234,239,241,243,253-258]. Trata-se, ainda assim, duma conexão controversa, atendendo aos resultados de vários trabalhos, incluindo uma meta-análise, que não detectaram essa mesma relação [79,130,236,244,250,259].

Um trabalho associou as mutações do gene *NOD2/CARD15* a propensão para doença com maior actividade, mas essa conexão não foi replicada em dois outros estudos [260,261].

No que se refere ao risco de cirurgia, a maioria dos estudos detectou uma associação entre a existência de mutação e a necessidade de intervenção, mas, uma vez mais, é difícil deslindar se essa conexão é independente de outras características fenotípicas potencialmente influenciadas pelo gene, designadamente a localização ileal e o comportamento estenosante [141,142,150,171,172,180,234-236,240,247,248,262]. Curiosamente, alguns trabalhos associaram as mutações deste gene com cirurgia mais precoce (menor tempo entre o diagnóstico da doença e a necessidade de cirurgia) e até com incremento dos custos cirúrgicos [236,238,263,264]. Importa salientar, contudo, que em alguns estudos não foi encontrada relação entre o genótipo *NOD2/CARD15* e a necessidade de intervenção cirúrgica [250,253,265,266]. Ainda no âmbito cirúrgico, outra questão que tem avocado interesse diz respeito à potencial relação entre as mutações deste gene e o aumento do risco de recorrência da doença com necessidade de nova cirurgia, conexão suportada por dois trabalhos mas refutada noutros três [142,234,247,267,268].

A pesquisa de correlações genótipo-fenótipo envolvendo o gene *NOD2/CARD15* na DC também se debruçou, naturalmente, sobre as respostas às diferentes terapêuticas. Neste contexto, dois trabalhos associaram a presença de mutação com um risco aumentado de corticoressistência e/ou corticodependência, mas um outro estudo, analisando a mesma questão, não detectou idêntica relação [253,260,269]. Relativamente à terapêutica imunossupressora, designadamente com azatioprina, um estudo associou as mutações com predição de boa resposta enquanto outro trabalho não detectou qualquer relação entre essas variáveis [253,269]. No que se refere à resposta à terapêutica biológica, a maioria dos estudos não achou relação com a existência de mutação, tanto para o infliximab como para o adalimumab [140,269-271]. Não obstante, um trabalho correlacionou má resposta ao infliximab com a presença de mutação do gene *NOD2/CARD15* [253].

Por último, relativamente às manifestações extra-intestinais, as mutações do gene *NOD2/CARD15* foram associadas a aumento do risco de espondilartropatia e de uveíte, não revelando qualquer relação com o risco de sacroileíte [272-274].

3.4. DC – CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO ENVOLVENDO OUTROS GENES

Existe uma pletora de estudos de pesquisa de correlações genótipo-fenótipo na DC envolvendo vários genes para além do *NOD2/CARD15*. Os resultados desses trabalhos nem sempre granjearam replicação e, por vezes, revelaram-se mesmo contraditórios. A descrição detalhada desses trabalhos bem como a especificação das inconsistências e contradições ultrapassa os objectivos desta abordagem. Assim, na tabela 3.1, descrevem-se, a título ilustrativo, algumas das correlações detectadas. Excepto quando devidamente assinalado, as conexões relatadas na tabela referem-se a associações positivas, ou seja, reportam determinantes genéticos que aumentam o risco do fenótipo aludido.

Tabela 3.1. DC – Correlações genótipo-fenótipo envolvendo outros genes para além do *NOD2/CARD15*

Característica fenotípica	Associação genética Determinante genético [referência]
Diagnóstico da doença em idade mais jovem	<i>CNR1</i> [275]
Localização da doença	
Tracto digestivo superior	<i>MIF</i> ^A [276]
Ileal	<i>ATG16L1</i> [94]; <i>IRGM</i> [94]; <i>ITLN1</i> [94]; <i>JAK2</i> [277]; <i>CRP</i> [278]
Ileo-cólica	<i>ATG16L1</i> [91,94]; <i>IRGM</i> [94]; <i>ITLN1</i> [94]; <i>TCF-4 (TCF7L2)</i> [91]
Cólica	<i>HLA</i> [91,120,142]; <i>TLR4</i> [279]; <i>TLR1,2,6</i> [280]; <i>MDR1</i> [281]; <i>TNFRSF1B</i> ^B [282]
Comportamento da doença	
Inflamatória	<i>HLA</i> [60]
Estenosante	<i>TLR4</i> [48]; <i>CX3CR1</i> [283]; <i>JAK2</i> [277]
Penetrante	<i>OCTN</i> [284]; <i>PAI-1</i> [285]
Actividade da doença	
Aumentada	<i>HSP70-2</i> [286]
Diminuída	<i>MIF</i> [276]
Doença perianal	
Fissuras/fístulas/abscessos	<i>OCTN2</i> [284]
Fístulas	<i>OCTN1</i> [287]; <i>HLADRBI</i> ^C [288]
Manifestações extra-intestinais	<i>HLADRB*103</i> [91]; <i>HLAB*27 HLA-B*44</i> [91]; <i>HLA-B*35</i> [91]; <i>TLR4</i> [289]
Resposta terapêutica	
Boa resposta a corticóides	<i>ATG16L1</i> [94]
Má resposta a corticóides	<i>MDR1</i> [290,291]; <i>TNFα-308A</i> [292]
Boa resposta a imunossupressão	<i>ATG16L1</i> [94]
Boa resposta a terapêutica biológica/infliximab	<i>ATG16L1</i> [94]; <i>IRGM</i> [94]; <i>ITLN1</i> [94]
Má resposta a terapêutica biológica/infliximab	Polimorfismos do locus <i>IBD5</i> [293]; <i>BRWD1</i> [294]; <i>TNFRSF1B</i> [295,296]
Cirurgia	
Aumento do risco de cirurgia	<i>IRGM</i> [297]
Necessidade de várias cirurgias	<i>TLR4</i> [289]

A - Diminui o risco de atingimento do tracto digestivo superior

B - Diminui o risco de atingimento do cólon

C – Diminuição do risco de fístulas perianais

3.5. CU – CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO

Na CU a pesquisa de correlações genótipo-fenótipo envolvendo o gene *NOD2/CARD15* não tem avocado o interesse da comunidade científica, provavelmente pelo facto do gene ser considerado, habitualmente, como um elemento não associado a aumento da susceptibilidade para a doença. Na verdade, à luz da revisão da literatura levada a cabo para esta tese, essa avaliação foi efectuada apenas num trabalho publicado em 2012 sob a forma de carta ao editor [289]. Nesse estudo, que envolveu 158 doentes com CU e 267 controlos, a frequência da mutação foi semelhante nos dois grupos (13,9% na CU e 15,9% nos controlos) e não foram detectadas correlações entre o genótipo *NOD2/CARD15* e o fenótipo da doença, embora não sejam especificadas quais as características fenotípicas avaliadas [289]. No contexto específico da proctocolectomia com construção de bolsa ileo-anal, as mutações do gene *NOD2/CARD15* foram associadas a risco aumentado de ocorrência de bolsite grave [298,299].

Na sequência da pesquisa de correlações genótipo-fenótipo envolvendo outros genes, foram detectadas algumas associações positivas que se detalham na tabela 3.2. Saliente-se que, até à data, não foi reportado, de forma consistente, nenhum determinante genético com associação significativa com a ocorrência de displasia na CU [300].

Tabela 3.2. CU – Correlações genótipo-fenótipo envolvendo outros genes para além do *NOD2/CARD15*

Característica fenotípica	Associação genética Determinante genético [referência]
Doença extensa	Locus <i>IBD5</i> [82]; <i>OCTN1</i> [287]; <i>TNFR1A36G</i> [301]; <i>HLA DRB1*0103</i> [118,119,302]; <i>IKBL+738</i> [303]; <i>HLA-DR15</i> [304]; <i>ABCB1/MDR1</i> [305]
Manifestações extra-intestinais	<i>HLA DRB1*0103</i> [119]
Necessidade de imunossuppressores	<i>OCTN1</i> [287]
Boa resposta ao infliximab	<i>IL23R</i> [233]
Colectomia	<i>HLA DRB1*0103</i> [118,302,304]; <i>MHC</i> [306]; <i>TNFSF15</i> [306]; <i>IL-10</i> [306]; <i>IL-12B</i> [306]; <i>IL-26</i> [306]; <i>ZFP90</i> [306]; <i>GSDML/ORMDL3</i> [306]; <i>KIF1A</i> [306]; <i>ABCB1/MDR1</i> [307]
Colite pseudomembranosa	<i>CREB5</i> [308]; <i>TNFRSF14</i> [308]

3.6. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Na DII a esmagadora maioria dos estudos de pesquisa de correlações genótipo-fenótipo debruçou-se sobre genes que demonstraram previamente associação com aumento de susceptibilidade para a doença. A assunção dessa estratégia pode constituir um importante viés, porque um gene que não aumenta o risco de desenvolvimento de uma determinada patologia, pode, ainda assim, influenciar a sua expressão fenotípica. Na verdade, existem alguns exemplos que suportam esta glosa. Os polimorfismos do gene *CNR1*, embora não se relacionem com o risco global de desenvolver DC, associam-se a maior probabilidade de eclosão da doença antes dos 40 anos [275]. Um trabalho liderado por Vermiere S demonstrou que as variantes do gene *OCTN1* não aumentam a susceptibilidade para DC mas interferem na expressão fenotípica da doença perianal [283]. Recentemente, uma variante do gene *FOX3* foi associada com um curso indolente da DC, apesar de não revelar qualquer influência na susceptibilidade para o desenvolvimento da doença [309]. No contexto da proctocolectomia com construção de bolsa ileo-anal, Seghal e col. verificaram que as mutações do gene *NOD2/CARD15* se associavam a maior probabilidade de desenvolvimento de bolsite grave, não influenciando, contudo, o risco global de bolsite [298]. Por último, o alelo IKBL+738(C) não se associa a risco aumentado de desenvolvimento de CU, mas a sua existência em doentes com essa patologia mostrou relação com doença mais extensa e com maior resistência terapêutica [303].

As diferenças, incluindo inconsistências e contradições, entre os diversos estudos de pesquisa de correlações genótipo-fenótipo, podem dever-se a vários factores. À semelhança do que foi referido na susceptibilidade para DII, também no que se refere às correlações genótipo-fenótipo a contribuição de cada determinante genético será presumivelmente modesta, pelo que as amostras relativamente reduzidas estudadas na maioria dos trabalhos poderão não deter poder suficiente para fazer sobressair algumas associações [91,123]. Além disso, as avaliações fenotípicas têm a validade limitada pelo facto de serem quase invariavelmente retrospectivas, reportadas a diferentes períodos de seguimento e expostas à variabilidade inter-observador [91]. Por último, as diferenças entre os diversos estudos poderão reflectir também a variabilidade étnica e geográfica das populações estudadas [91].

Os conceitos de patologia poligénica e de interacções dos genes entre si e destes com o ambiente, além de estarem subjacentes à susceptibilidade para a doença estarão também, muito provavelmente, envolvidos nas correlações entre o genótipo e a expressão fenotípica da patologia [71,127]. Esta concepção tem sido reforçada por vários trabalhos e, em sequência, originou o envidamento de esforços para construção de modelos compostos por uma panóplia de factores genéticos, serológicos, clínicos e ambientais [31,83,127,246,306,310-312]. Os avanços nos conhecimentos genéticos, o aumento da acessibilidade e amplitude das ferramentas de avaliação genética, a congregação de esforços em grupos de estudo envolvendo amostras de tamanho considerável e o refinamento dos programas de avaliação de correlações múltiplas, poderão, num prazo mais ou menos curto, produzir importantes resultados nesta área [127,313].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142:46-54.
2. Azevedo LF, Magro F, Portela F, et al. Estimating the prevalence of inflammatory bowel disease in Portugal using a pharmaco-epidemiological approach. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2010;19:499-510.
3. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, et al. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140:1785-1794.
4. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*. 1998;115:182-205.
5. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002;347:417-429.
6. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2011;474:307-317.
7. Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2006;12:4807-4812.
8. Kugathasan S, Fiocchi C. Progress in basic inflammatory bowel disease research. *Semin Pediatr Surg*. 2007;16:146-153.
9. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Animal models of IBD: linkage to human disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10:578-587.
10. Saleh M, Elson CO. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity*. 2011;34:293-302.
11. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, et al. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12:3668-3672.
12. Laharie D, Debeugny S, Peeters M, et al. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology*. 2001;120:816-819.
13. Roth MP, Petersen GM, McElree C, et al. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology*. 1989;96:1016-1020.
14. Monsén U, Broström O, Nordenvall B, et al. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 1987;22:214-218.
15. Fielding JF. The relative risk of inflammatory bowel disease among parents and siblings of Crohn's disease patients. *J Clin Gastroenterol*. 1986;8:655-657.
16. Yang H, McElree C, Roth MP, et al. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut*. 1993;34:517-524.
17. Satsangi J, Grootsholten C, Holt H, et al. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut*. 1996;38:738-741.

18. Russell RK, Satsangi J. IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004;18:525-539.
19. Orholm M, Iselius L, Sørensen TI, et al. Investigation of inheritance of chronic inflammatory bowel diseases by complex segregation analysis. *BMJ.* 1993;306:20-24.
20. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, et al. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut.* 1988;29:990-996.
21. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, et al. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ.* 1996;312:95-96.
22. Orholm M, Binder V, Sørensen TI, et al. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:1075-1081.
23. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, et al. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology.* 2003;124:1767-1773.
24. Brant SR. Update on the heritability of inflammatory bowel disease: the importance of twin studies. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:1-5.
25. Grandbastien B, Peeters M, Franchimont D, et al. Anticipation in familial Crohn's disease. *Gut.* 1998;42:170-174.
26. Lee JC, Lennard-Jones JE. Inflammatory bowel disease in 67 families each with three or more affected first-degree relatives. *Gastroenterology.* 1996;111:587-596.
27. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM 2nd, et al. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences. *Gastroenterology.* 1996;111:573-579.
28. Colombel JF, Grandbastien B, Gower-Rousseau C, et al. Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology.* 1996;111:604-607.
29. Polito JM 2nd, Childs B, Mellits ED, et al. Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology.* 1996;111:580-586.
30. Peeters M, Nevens H, Baert F, et al. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology.* 1996;111:597-603.
31. Henckaerts L, Van Steen K, Verstreken I, et al. Genetic risk profiling and prediction of disease course in Crohn's disease patients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7:972-980.
32. Annese V, Andreoli A, Astegiano M, et al. Clinical features in familial cases of Crohn's disease and ulcerative colitis in Italy: a GISC study. Italian Study Group for the Disease of Colon and Rectum. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:2939-2945.
33. Liu JZ, Anderson CA. Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014;28:373-386.
34. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature.* 1996;379:821-823.

35. Brant SR, Fu Y, Fields CT, et al. American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. *Gastroenterology*. 1998;115:1056-1061.
36. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7502-7507.
37. Mirza MM, Lee J, Teare D, et al. Evidence of linkage of the inflammatory bowel disease susceptibility locus on chromosome 16 (IBD1) to ulcerative colitis. *J Med Genet*. 1998;35:218-221.
38. Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, et al. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet*. 1996;5:1679-1683.
39. Curran ME, Lau KF, Hampe J, et al. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology*. 1998;115:1066-1071.
40. Cavanaugh JA, Callen DF, Wilson SR, et al. Analysis of Australian Crohn's disease pedigrees refines the localization for susceptibility to inflammatory bowel disease on chromosome 16. *Ann Hum Genet*. 1998;62:291-298.
41. Cavanaugh J; IBD International Genetics Consortium. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet*. 2001;68:1165-1171.
42. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:599-603.
43. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:603-606.
44. Mathew CG, Lewis CM. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet*. 2004;13:R161-168
45. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet*. 2004;36:476-480.
46. Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, et al. Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J Hum Genet*. 2004;49:664-668.
47. Gewirtz AT, Vijay-Kumar M, Brant SR, et al. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G1157-1163.
48. Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, et al. The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:645-652.
49. International HapMap Consortium, Frazer KA, Ballinger DG, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449:851-861.
50. Syvänen AC. Toward genome-wide SNP genotyping. *Nat Genet*. 2005;37:S5-10.

51. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996;273:1516-1517.
52. Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J, et al. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet*. 2005;14:3499-3506.
53. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007;39:207-211.
54. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314:1461-1463.
55. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*. 2007;39:596-604.
56. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, et al. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet*. 2007;3:e58.
57. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*. 2007;39:830-832.
58. Franke A, Hampe J, Rosenstiel P, et al. Systematic association mapping identifies NELL1 as a novel IBD disease gene. *PLoS One*. 2007;2:e691.
59. Raelson JV, Little RD, Ruether A, et al. Genome-wide association study for Crohn's disease in the Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14747-14752.
60. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447:661-678.
61. Van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J. The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:89-116.
62. Zhernakova A, van Diemen CC, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet*. 2009;10:43-55.
63. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491:119-124.
64. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40:955-962.
65. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010;42:1118-1125.
66. Fransen K, Mitrovic M, van Diemen CC, et al. The quest for genetic risk factors for Crohn's disease in the post-GWAS era. *Genome Med*. 2011;3:13.
67. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014;20:91-99.

68. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet.* 2011;43:246-252.
69. Franke A, Balschun T, Sina C, et al. Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nat Genet.* 2010;42:292-294.
70. Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR, et al. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:1193-1198.
71. Graham DB, Xavier RJ. From genetics of inflammatory bowel disease towards mechanistic insights. *Trends Immunol.* 2013;34:371-378.
72. Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, et al. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat Genet.* 2010;42:565-569.
73. Csöngéi V, Járomi L, Sáfrány E, et al. Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *World J Gastroenterol.* 2010;16:176-183.
74. Lin Z, Hegarty JP, John G, et al. NOD2 mutations affect muramyl dipeptide stimulation of human B lymphocytes and interact with other IBD-associated genes. *Dig Dis Sci.* 2013;58:2599-2607.
75. Emily M, Mailund T, Hein J, et al. Using biological networks to search for interacting loci in genome-wide association studies. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:1231-1240.
76. Cummings JR, Cooney R, Pathan S, et al. Confirmation of the role of ATG16L1 as a Crohn's disease susceptibility gene. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:941-946.
77. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology.* 2007;132:1665-1671.
78. Glas J, Konrad A, Schmechel S, et al. The ATG16L1 gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to Crohn's disease in the German population. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:682-691.
79. Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, et al. Replication of interleukin 23 receptor and autophagy-related 16-like 1 association in adult- and pediatric-onset inflammatory bowel disease in Italy. *World J Gastroenterol.* 2008;14:4643-4651.
80. Roberts RL, Gearry RB, Hollis-Moffatt JE, et al. IL23R R381Q and ATG16L1 T300A are strongly associated with Crohn's disease in a study of New Zealand Caucasians with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:2754-2761.
81. Glas J, Seiderer J, Wetzke M, et al. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS One.* 2007;2:e819.
82. Latiano A, Palmieri O, Valvano RM, et al. Contribution of IBD5 locus to clinical features of IBD patients. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:318-325.
83. Weersma RK, Stokkers PC, van Bodegraven AA, et al. Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort. *Gut.* 2009;58:388-395.

84. Hu P, Muise AM, Xing X, et al. Association between a multi-locus genetic risk score and inflammatory bowel disease. *Bioinform Biol Insights*. 2013;7:143-152.
85. Juyal G, Amre D, Midha V, et al. Evidence of allelic heterogeneity for associations between the NOD2/CARD15 gene and ulcerative colitis among North Indians. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26:1325-1332.
86. Cavanaugh J. NOD2: ethnic and geographic differences. *World J Gastroenterol*. 2006;12:3673-3677.
87. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, et al. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*. 2013;145:293-308.
88. Relton CL, Davey Smith G. Epigenetic epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment. *PLoS Med*. 2010;7:e1000356.
89. Janson PC, Winerdal ME, Winqvist O. At the crossroads of T helper lineage commitment-Epigenetics points the way. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790:906-919.
90. Alexander KL, Targan SR, Elson CO 3rd. Microbiota activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2014;260:206-220.
91. Tsianos EV, Katsanos KH, Tsianos VE. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2012;18:105-118.
92. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet*. 2004;36:471-475.
93. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40:1107-1112.
94. Durães C, Machado JC, Portela F, et al. Phenotype-genotype profiles in Crohn's disease predicted by genetic markers in autophagy-related genes (GOIA study II). *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:230-239.
95. Cooney R, Baker J, Brain O, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*. 2010;16:90-97.
96. Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*. 2010;11:55-62.
97. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut*. 2009;58:1152-1167.
98. UK IBD Genetics Consortium, Barrett JC, Lee JC, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet*. 2009;41:1330-1334.
99. Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(3):831-848.
100. Forcione DG, Sands B, Isselbacher KJ, et al. An increased risk of Crohn's disease in individuals who inherit the HLA class II DRB3*0301 allele. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5094-5098.
101. Danzé PM, Colombel JF, Jacquot S, et al. Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn's disease. *Gut*. 1996;39:69-72.

- 102.** Mathew CG, Easton DF, Lennard-Jones JE. HLA and inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1996;348:68.
- 103.** Reinshagen M, Loeliger C, Kuehnl P, et al. HLA class II gene frequencies in Crohn's disease: a population based analysis in Germany. *Gut*. 1996;38:538-542.
- 104.** Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, et al. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1996;347:1212-1217.
- 105.** Nakajima A, Matsuhashi N, Kodama T, et al. HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1995;109:1462-1467.
- 106.** De La Concha EG, Fernandez-Arquero M, Santa-Cruz S, et al. Positive and negative associations of distinct HLA-DR2 subtypes with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol*. 1997;108:392-395.
- 107.** Duerr RH, Neigut DA. Molecularly defined HLA-DR2 alleles in ulcerative colitis and an antineutrophil cytoplasmic antibody-positive subgroup. *Gastroenterology*. 1995;108:423-427.
- 108.** Sugimura K, Asakura H, Mizuki N, et al. Analysis of genes within the HLA region affecting susceptibility to ulcerative colitis. *Hum Immunol*. 1993;36:112-118.
- 109.** Kobayashi K, Atoh M, Konoeda Y, et al. HLA-DR, DQ and T cell antigen receptor constant beta genes in Japanese patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*. 1990;80:400-403.
- 110.** Asakura H, Tsuchiya M, Aiso S, et al. Association of the human lymphocyte-DR2 antigen with Japanese ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1982;82:413-418.
- 111.** Bouma G, Oudkerk Pool M, Crusius JB, et al. Evidence for genetic heterogeneity in inflammatory bowel disease (IBD); HLA genes in the predisposition to suffer from ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). *Clin Exp Immunol*. 1997;109:175-179.
- 112.** Hesresbach D, Alizadeh M, Bretagne JF, et al. Investigation of the association of major histocompatibility complex genes, including HLA class I, class II and TAP genes, with clinical forms of Crohn's disease. *Eur J Immunogenet*. 1996;23:141-151.
- 113.** Smolen JS, Gangl A, Polterauer P, et al. HLA antigens in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1982;82:34-38.
- 114.** Zetterquist H, Broomé U, Einarsson K, et al. HLA class II genes in primary sclerosing cholangitis and chronic inflammatory bowel disease: no HLA-DRw52a association in Swedish patients with sclerosing cholangitis. *Gut*. 1992;33:942-946.
- 115.** Biemond I, Burnham WR, D'Amaro J, et al. HLA-A and -B antigens in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1986;27:934-941.
- 116.** Toyoda H, Wang SJ, Yang HY, et al. Distinct associations of HLA class II genes with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1993;104:741-748.
- 117.** Okada Y, Yamazaki K, Umeno J, et al. HLA-Cw*1202-B*5201-DRB1*1502 haplotype increases risk for ulcerative colitis but reduces risk for Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2011;141:864-871.

- 118.** Bouma G, Crusius JB, García-González MA, et al. Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol*. 1999;115:294-300.
- 119.** Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, et al. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1997;112:1845-1853.
- 120.** Parkes M. The genetics universe of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis*. 2012;30:78-81.
- 121.** Waterman M, Xu W, Stempak JM, et al. Distinct and overlapping genetic loci in Crohn's disease and ulcerative colitis: correlations with pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1936-1942.
- 122.** Cavanaugh JA. Genetics of inflammatory bowel disease: the state of play. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28:759-760.
- 123.** Vermeire S. To what extent are genetics clinically useful? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25:S8-14.
- 124.** Yazdanyar S, Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, et al. Penetrance of NOD2/CARD15 genetic variants in the general population. *CMAJ*. 2010;182:661-665.
- 125.** Plenge RM, Scolnick EM, Altshuler D. Validating therapeutic targets through human genetics. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:581-594.
- 126.** Rossin EJ, Lage K, Raychaudhuri S, et al. Proteins encoded in genomic regions associated with immune-mediated disease physically interact and suggest underlying biology. *PLoS Genet*. 2011;7:e1001273.
- 127.** Festen EA, Weersma RK. How will insights from genetics translate to clinical practice in inflammatory bowel disease? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28:387-397.
- 128.** Vermeire S. Review article: genetic susceptibility and application of genetic testing in clinical management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:2-10.
- 129.** Lesage S, Zouali H, Cézard JP, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 2002;70:845-857.
- 130.** Yazdanyar S, Weischer M, Nordestgaard BG. Genotyping for NOD2 genetic variants and crohn disease: a metaanalysis. *Clin Chem*. 2009;55:1950-1957.
- 131.** Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*. 2003;278:5509-5512.
- 132.** Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*. 2003;124:140-146.
- 133.** Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005;307:731-734.
- 134.** Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, et al. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol*. 2003;5:581-592.

- 135.** Kosovac K, Brenmoehl J, Holler E, et al. Association of the NOD2 genotype with bacterial translocation via altered cell-cell contacts in Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:1311-1321.
- 136.** Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 2004;53:1658-1664.
- 137.** Mathew CG. New links to the pathogenesis of Crohn disease provided by genome-wide association scans. *Nat Rev Genet*. 2008;9:9-14.
- 138.** Maeda S, Hsu LC, Liu H, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science*. 2005;307:734-738.
- 139.** Salucci V, Rimoldi M, Penati C, et al. Monocyte-derived dendritic cells from Crohn patients show differential NOD2/CARD15-dependent immune responses to bacteria. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:812-818.
- 140.** Vermeire S, Louis E, Rutgeerts P, et al. NOD2/CARD15 does not influence response to infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;123:106-111.
- 141.** Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*. 2001;357:1925-1928.
- 142.** Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122:854-866. Erratum in: *Gastroenterology*. 2003;125:281.
- 143.** Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122:867-874.
- 144.** Murillo L, Crusius JB, van Bodegraven AA, et al. CARD15 gene and the classification of Crohn's disease. *Immunogenetics*. 2002;54:59-61.
- 145.** Vermeire S, Wild G, Kocher K, et al. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet*. 2002;71:74-83.
- 146.** Radlmayr M, Török HP, Martin K, et al. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;122:2091-2092.
- 147.** Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, et al. CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann Hum Genet*. 2003;67:35-41.
- 148.** Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, et al. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun*. 2004;5:417-425.
- 149.** Freire P, Portela F, Donato MM, et al. *Caspase Activating Recruitment Domain 15 (CARD15): Novas Aplicações*. *Rev Port Coloproct* 2010;7:6-22.
- 150.** Ferreira AC, Almeida S, Tavares M, et al. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:331-339.
- 151.** Vind I, Vieira A, Hougs L, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis in Danish and Portuguese patients and controls. *Digestion*. 2005;72:156-163.

- 152.** Guo QS, Xia B, Jiang Y, et al. NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. *World J Gastroenterol.* 2004;10:1069-1071.
- 153.** Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;123:86-91.
- 154.** Sugimura M, Kinouchi Y, Takahashi S, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis in Japanese patients with Crohn's disease. *Clin Genet.* 2003;63:160-162.
- 155.** Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, et al. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet.* 2002;47:469-72.
- 156.** Lee GH, Kim CG, Kim JS, et al. Frequency analysis of NOD2 gene mutations in Korean patients with Crohn's disease. *Korean J Gastroenterol.* 2005;45:162-168.
- 157.** Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, et al. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:6-16.
- 158.** Mahurkar S, Banerjee R, Rani VS, et al. Common variants in NOD2 and IL23R are not associated with inflammatory bowel disease in Indians. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26:694-649.
- 159.** Pugazhendhi S, Amte A, Balamurugan R, et al. Common NOD2 mutations are absent in patients with Crohn's disease in India. *Indian J Gastroenterol.* 2008;27:201-203.
- 160.** Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:1465-1470.
- 161.** Li M, Gao X, Guo CC, et al. OCTN and CARD15 gene polymorphism in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:4923-4927.
- 162.** Chua KH, Ng CC, Hilmi I, et al. Co-inheritance of variants/mutations in Malaysian patients with Crohn's disease. *Genet Mol Res.* 2012;11:3115-3121.
- 163.** Chua KH, Hilmi I, Ng CC, et al. Identification of NOD2/CARD15 mutations in Malaysian patients with Crohn's disease. *J Dig Dis.* 2009;10:124-130.
- 164.** Figueroa C, Peralta A, Herrera L, et al. NOD2/CARD15 and Toll-like 4 receptor gene polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17:125-130.
- 165.** Ozen SC, Dagli U, Kiliç MY, et al. NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2006;41:304-310.
- 166.** Ouyang Q, Tandon R, Goh KL, et al. The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005;21:408-413.
- 167.** Yang SK, Loftus EV Jr, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflamm Bowel Dis.* 2001;7:260-270.
- 168.** Oostenbrug LE, Nolte IM, Oosterom E, et al. CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: an association study and pooled analysis. *Dig Liver Dis.* 2006;38:834-845.

- 169.** Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, et al. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:2393-2404.
- 170.** Biank V, Broeckel U, Kugathasan S. Pediatric inflammatory bowel disease: clinical and molecular genetics. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:1430-1438.
- 171.** Annese V, Lombardi G, Perri F, et al. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease--an IG-IBD study. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:84-92.
- 172.** Heliö T, Halme L, Lappalainen M, et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut.* 2003;52:558-562.
- 173.** Tukul T, Shalata A, Present D, et al. Crohn disease: frequency and nature of CARD15 mutations in Ashkenazi and Sephardi/Oriental Jewish families. *Am J Hum Genet.* 2004;74:623-636.
- 174.** Zhou Z, Lin XY, Akolkar PN, et al. Variation at NOD2/CARD15 in familial and sporadic cases of Crohn's disease in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:3095-3101.
- 175.** Brant SR. Promises, delivery, and challenges of inflammatory bowel disease risk gene discovery. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11:22-26.
- 176.** McGovern DP, Van Heel DA, Negro K, et al. Further evidence of IBD5/CARD15 (NOD2) epistasis in the susceptibility to ulcerative colitis. *Am J Hum Genet.* 2003;73:1465-1466.
- 177.** Andriulli AJ, Annese V, Latiano A, et al. The frame-shift mutation of the NOD2/CARD15 gene is significantly increased in ulcerative colitis: an *IG-IBD study. *Gastroenterology.* 2004;126:625-627.
- 178.** Brant SR, Wang MH, Rawsthorne P, et al. A population-based case-control study of CARD15 and other risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:313-323.
- 179.** Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol.* 2005;11:681-685.
- 180.** Rigoli L, Romano C, Caruso RA, et al. Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14:4454-4461.
- 181.** Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18:1-5.
- 182.** Rhodes JM, Campbell BJ. Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol Med.* 2002;8:10-16.
- 183.** Freire P, Portela F, Donato MM, et al. CARD15 mutations and colorectal cancer in a South European country. *Int J Colorectal Dis.* 2010;25:1211-1219.
- 184.** Kurzawski G, Suchy J, Kładny J, et al. The NOD2 3020insC mutation and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 2004;64:1604-1606.
- 185.** Papaconstantinou I, Theodoropoulos G, Gazouli M, et al. Association between mutations in the CARD15/NOD2 gene and colorectal cancer in a Greek population. *Int J Cancer.* 2005;114:433-435.

- 186.** Tuupanen S, Alhopuro P, Mecklin JP, et al. No evidence for association of NOD2 R702W and G908R with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2007;121:76-79.
- 187.** Alhopuro P, Ahvenainen T, Mecklin JP, et al. NOD2 3020insC alone is not sufficient for colorectal cancer predisposition. *Cancer Res*. 2004;64:7245-7247.
- 188.** Roberts RL, Geary RB, Allington MD, et al. Caspase recruitment domain-containing protein 15 mutations in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006;66:2532-2535.
- 189.** Lakatos PL, Hitre E, Szalay F, et al. Common NOD2/CARD15 variants are not associated with susceptibility or the clinicopathologic characteristics of sporadic colorectal cancer in Hungarian patients. *BMC Cancer*. 2007;7:54.
- 190.** Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, et al. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet*. 2001;29:19-20.
- 191.** Kanazawa N, Okafuji I, Kambe N, et al. Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood*. 2005;105:1195-1197.
- 192.** Yazdanyar S, Nordestgaard BG. NOD2/CARD15 genotype and common gastrointestinal diseases in 43,600 individuals. *J Intern Med*. 2010;267:228-236.
- 193.** Rahman P, Bartlett S, Siannis F, et al. CARD15: a pleiotropic autoimmune gene that confers susceptibility to psoriatic arthritis. *Am J Hum Genet*. 2003;73:677-681.
- 194.** Kabesch M, Peters W, Carr D, et al. Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:813-817.
- 195.** Ahrens P, Kattner E, Köhler B, et al. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res*. 2004;55:652-656.
- 196.** Brenmoehl J, Herfarth H, Glück T, et al. Genetic variants in the NOD2/CARD15 gene are associated with early mortality in sepsis patients. *Intensive Care Med*. 2007;33:1541-1548.
- 197.** Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann MG, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology*. 2010;51:1327-1333.
- 198.** Bruns T, Peter J, Reuken PA, et al. NOD2 gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis. *Liver Int*. 2012;32:223-230.
- 199.** Freire P, Figueiredo P, Cardoso R, et al. Card15 mutations and gastric cancer in a Portuguese population. *Scand J Gastroenterol*. 2013;48:1188-1197.
- 200.** Angeletti S, Galluzzo S, Santini D, et al. NOD2/CARD15 polymorphisms impair innate immunity and increase susceptibility to gastric cancer in an Italian population. *Hum Immunol*. 2009;70:729-732.
- 201.** Rosenstiel P, Hellmig S, Hampe J, et al. Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on the clinical outcome of Helicobacter pylori infection. *Cell Microbiol*. 2006;8:1188-1198.

- 202.** Lener MR, Oszutowska D, Castaneda J, et al. Prevalence of the NOD2 3020insC mutation in aggregations of breast and lung cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;95:141-145.
- 203.** Huzarski T, Lener M, Domagała W, et al. The 3020insC allele of NOD2 predisposes to early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;89:91-93.
- 204.** Agostini A, Moretti M, Calabrese C, et al. Attachment and quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis.* 2014 Jul 19.
- 205.** Engelmann G, Erhard D, Petersen M, et al. Health-Related Quality of Life in Adolescents with Inflammatory Bowel Disease Depends on Disease Activity and Psychiatric Comorbidity. *Child Psychiatry Hum Dev.* 2014 May 18.
- 206.** Adamiak T, Walkiewicz-Jedrzejczak D, Fish D, et al. Incidence, clinical characteristics, and natural history of pediatric IBD in Wisconsin: a population-based epidemiological study. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:1218-1223.
- 207.** Sjöberg D, Holmström T, Larsson M, et al. Incidence and natural history of ulcerative colitis in the Uppsala Region of Sweden 2005-2009 - results from the IBD cohort of the Uppsala Region (ICURE). *J Crohns Colitis.* 2013;7:e351-357.
- 208.** Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J, et al. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol.* 2009;44:431-440.
- 209.** Jess T, Riis L, Vind I, et al. Changes in clinical characteristics, course, and prognosis of inflammatory bowel disease during the last 5 decades: a population-based study from Copenhagen, Denmark. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:481-489.
- 210.** Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, et al. Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4:621-630.
- 211.** Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, et al. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet.* 2009;374:1617-1625.
- 212.** Peyrin-Biroulet L, Khosrotehrani K, Carrat F, et al. Increased risk for nonmelanoma skin cancers in patients who receive thiopurines for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2011;141:1621-1628
- 213.** Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, et al. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2010;362:1383-1395.
- 214.** Magro F, Rodrigues-Pinto E, Coelho R, et al. Is it possible to change phenotype progression in Crohn's disease in the era of immunomodulators? Predictive factors of phenotype progression. *Am J Gastroenterol.* 2014;109:1026-1036.
- 215.** Ramadas AV, Gunesh S, Thomas GA, et al. Natural history of Crohn's disease in a population-based cohort from Cardiff (1986-2003): a study of changes in medical treatment and surgical resection rates. *Gut.* 2010;59:1200-1206.
- 216.** Peyrin-Biroulet L, Oussalah A, Williet N, et al. Impact of azathioprine and tumour necrosis factor antagonists on the need for surgery in newly diagnosed Crohn's disease. *Gut.* 2011 Jul;60(7):930-936.

- 217.** Beaugerie L, Sokol H. Clinical, serological and genetic predictors of inflammatory bowel disease course. *World J Gastroenterol.* 2012;18:3806-3813.
- 218.** Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, et al. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2006;130:650-656.
- 219.** Loly C, Belaiche J, Louis E. Predictors of severe Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43:948-954.
- 220.** Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, et al. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology.* 1994;107:3-11.
- 221.** Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, et al. Are there any differences in phenotype or disease course between familial and sporadic cases of inflammatory bowel disease? Results of a population-based follow-up study. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:1955-1963.
- 222.** Höie O, Wolters F, Riis L, et al. Ulcerative colitis: patient characteristics may predict 10-yr disease recurrence in a European-wide population-based cohort. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:1692-1701.
- 223.** Höie O, Wolters FL, Riis L, et al. Low colectomy rates in ulcerative colitis in an unselected European cohort followed for 10 years. *Gastroenterology.* 2007;132:507-515.
- 224.** Targan SR, Landers CJ, Yang H, et al. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2005;128:2020-2028.
- 225.** Arnott ID, Landers CJ, Nimmo EJ, et al. Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:2376-2384.
- 226.** Vasiliauskas EA, Kam LY, Karp LC, et al. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut.* 2000;47:487-496.
- 227.** Amre DK, Lambrette P, Law L, et al. Investigating the hygiene hypothesis as a risk factor in pediatric onset Crohn's disease: a case-control study. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:1005-1011.
- 228.** Dubinsky M. What is the role of serological markers in IBD? Pediatric and adult data. *Dig Dis.* 2009;27:259-268.
- 229.** Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, et al. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology.* 1996;110:1810-1819.
- 230.** Esters N, Vermeire S, Joossens S, et al. Serological markers for prediction of response to anti-tumor necrosis factor treatment in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97:1458-1462.
- 231.** Melmed GY, Fleshner PR, Bardakcioglu O, et al. Family history and serology predict Crohn's disease after ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum.* 2008;51:100-108.
- 232.** Fleshner PR, Vasiliauskas EA, Kam LY, et al. High level perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody (pANCA) in ulcerative colitis patients before colectomy predicts the development of chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Gut.* 2001;49:671-677.

- 233.** Jürgens M, Laubender RP, Hartl F, et al. Disease activity, ANCA, and IL23R genotype status determine early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1811-1819.
- 234.** Büning C, Genschel J, Bühner S, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;19:1073-1078.
- 235.** Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, et al. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41:1421-1432.
- 236.** Lacher M, Helmbrecht J, Schroepf S, et al. NOD2 mutations predict the risk for surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *J Pediatr Surg*. 2010;45:1591-1597.
- 237.** Levine A, Kugathasan S, Annese V, et al. Pediatric onset Crohn's colitis is characterized by genotype-dependent age-related susceptibility. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:1509-1515.
- 238.** Kugathasan S, Collins N, Maresso K, et al. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2:1003-1009.
- 239.** Tomer G, Ceballos C, Concepcion E, et al. NOD2/CARD15 variants are associated with lower weight at diagnosis in children with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:2479-2484.
- 240.** Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet*. 2002;359:1661-1665.
- 241.** Gazouli M, Pachoula I, Panayotou I, et al. NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2010;16:1753-1758.
- 242.** Gazouli M, Zacharatos P, Mantzaris GJ, et al. Association of NOD2/CARD15 variants with Crohn's disease in a Greek population. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004;16:1177-1182.
- 243.** Ferraris A, Torres B, Knafelz D, et al. Relationship between CARD15, SLC22A4/5, and DLG5 polymorphisms and early-onset inflammatory bowel diseases: an Italian multicentric study. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:355-361.
- 244.** Russell RK, Drummond HE, Nimmo EE, et al. Genotype-phenotype analysis in childhood-onset Crohn's disease: NOD2/CARD15 variants consistently predict phenotypic characteristics of severe disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:955-964.
- 245.** Weiss B, Shamir R, Bujanover Y, et al. NOD2/CARD15 mutation analysis and genotype-phenotype correlation in Jewish pediatric patients compared with adults with Crohn's disease. *J Pediatr*. 2004;145:208-212.
- 246.** Ryan JD, Silverberg MS, Xu W, et al. Predicting complicated Crohn's disease and surgery: phenotypes, genetics, serology and psychological characteristics of a population-based cohort. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38:274-283.

- 247.** Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to structuring disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg.* 2005;242:693-700.
- 248.** Seiderer J, Brand S, Herrmann KA, et al. Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:1114-1121.
- 249.** Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;123:679-688.
- 250.** Shaoul R, Karban A, Reif S, et al. Disease behavior in children with Crohn's disease: the effect of disease duration, ethnicity, genotype, and phenotype. *Dig Dis Sci.* 2009;54:142-150.
- 251.** Karban A, Itay M, Davidovich O, et al. Risk factors for perianal Crohn's disease: the role of genotype, phenotype, and ethnicity. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:1702-1708.
- 252.** Kanaan Z, Ahmad S, Bilchuk N, et al. Perianal Crohn's disease: predictive factors and genotype-phenotype correlations. *Dig Surg.* 2012;29:107-114.
- 253.** Niess JH, Klaus J, Stephani J, et al. NOD2 polymorphism predicts response to treatment in Crohn's disease- first steps to a personalized therapy. *Dig Dis Sci.* 2012;57:879-886.
- 254.** de Ridder L, Weersma RK, Dijkstra G, et al. Genetic susceptibility has a more important role in pediatric-onset Crohn's disease than in adult-onset Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:1083-1092.
- 255.** De la Vega FM, Lazaruk KD, Rhodes MD, et al. Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan SNP Genotyping Assays and the SNPlex Genotyping System. *Mutat Res.* 2005;573:111-135.
- 256.** Cukovic-Cavka S, Vermeire S, Hrstic I, et al. NOD2/CARD15 mutations in Croatian patients with Crohn's disease: prevalence and genotype-phenotype relationship. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18:895-899.
- 257.** De Diego C, Alcántara M, Valle J, et al. Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: genotype-phenotype correlation. *Genet Test.* 2006;10:178-185.
- 258.** Heresbach D, Gicquel-Douabin V, Birebent B, et al. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype- phenotype analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16:55-62.
- 259.** Leshinsky-Silver E, Karban A, Buzhakov E, et al. Is age of onset of Crohn's disease governed by mutations in NOD2/caspase recruitment domains 15 and Toll-like receptor 4? Evaluation of a pediatric cohort. *Pediatr Res.* 2005;58:499-504.
- 260.** Posovszky C, Pfalzer V, Lahr G, et al. Age-of-onset-dependent influence of NOD2 gene variants on disease behaviour and treatment in Crohn's disease. *BMC Gastroenterol.* 2013;13:77.
- 261.** Wine E, Reif SS, Leshinsky-Silver E, et al. Pediatric Crohn's disease and growth retardation: the role of genotype, phenotype, and disease severity. *Pediatrics.* 2004;114:1281-1286.
- 262.** Barreiro M, Núñez C, Domínguez-Muñoz JE, et al. Association of NOD2/CARD15 mutations with previous surgical procedures in Crohn's disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2005;97:547-553.

- 263.** Bhullar M, Macrae F, Brown G, et al. Prediction of Crohn's disease aggression through NOD2/CARD15 gene sequencing in an Australian cohort. *World J Gastroenterol*. 2014;20:5008-5016.
- 264.** Odes S, Friger M, Vardi H, et al. Role of ASCA and the NOD2/CARD15 mutation Gly908Arg in predicting increased surgical costs in Crohn's disease patients: a project of the European Collaborative Study Group on Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:874-881.
- 265.** Louis E, Collard A, Oger AF, et al. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*. 2001;49:777-782.
- 266.** Brant SR, Picco MF, Achkar JP, et al. Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm Bowel Dis*. 2003;9:281-289.
- 267.** Maconi G, Colombo E, Sampietro GM, et al. CARD15 gene variants and risk of reoperation in Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:2483-2491.
- 268.** Solon JG, Burke JP, Walsh SR, et al. The effect of NOD2 polymorphism on postsurgical recurrence in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of available literature. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:1099-1105.
- 269.** Weiss B, Lebowitz O, Fidler HH, et al. Response to medical treatment in patients with Crohn's disease: the role of NOD2/CARD15, disease phenotype, and age of diagnosis. *Dig Dis Sci*. 2010;55:1674-1680
- 270.** Mascheretti S, Hampe J, Croucher PJ, et al. Response to infliximab treatment in Crohn's disease is not associated with mutations in the CARD15 (NOD2) gene: an analysis in 534 patients from two multicenter, prospective GCP-level trials. *Pharmacogenetics*. 2002;12:509-515.
- 271.** Barreiro-de Acosta M, Ouburg S, Morré SA, et al. NOD2, CD14 and TLR4 mutations do not influence response to adalimumab in patients with Crohn's disease: a preliminary report. *Rev Esp Enferm Dig*. 2010;102:591-595.
- 272.** Laukens D, Peeters H, Marichal D, et al. CARD15 gene polymorphisms in patients with spondyloarthropathies identify a specific phenotype previously related to Crohn's disease. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:930-935.
- 273.** Rodríguez-Pérez N, Aguinaga-Barrilero A, Gorroño-Echebarría MB, et al. Analysis of Crohn's disease-related CARD15 polymorphisms in Spanish patients with idiopathic uveitis. *Dis Markers*. 2008;24:111-117.
- 274.** Peeters H, Vander Cruyssen B, Mielants H, et al. Clinical and genetic factors associated with sacroiliitis in Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:132-137.
- 275.** Storr M, Emmerdinger D, Diegelmann J, et al. The cannabinoid 1 receptor (CNR1) 1359 G/A polymorphism modulates susceptibility to ulcerative colitis and the phenotype in Crohn's disease. *PLoS One*. 2010;5:e9453.
- 276.** Dambacher J, Staudinger T, Seiderer J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173G/C promoter polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement and disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:71-82.

- 277.** Cleyne I, González JR, Figueroa C, et al. Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project. *Gut*. 2013;62:1556-1565.
- 278.** Thalmaier D, Dambacher J, Seiderer J, et al. The +1059G/C polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene is associated with involvement of the terminal ileum and decreased serum CRP levels in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:1105-1115.
- 279.** Ouburg S, Mallant-Hent R, Crusius JB, et al. The toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly polymorphism is associated with colonic localisation of Crohn's disease without a major role for the *Saccharomyces cerevisiae* mannan-LBP-CD14-TLR4 pathway. *Gut*. 2005;54:439-440.
- 280.** Pierik M, Joossens S, Van Steen K, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:1-8.
- 281.** Krupoves A, Seidman EG, Mack D, et al. Associations between ABCB1/MDR1 gene polymorphisms and Crohn's disease: a gene-wide study in a pediatric population. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:900-908.
- 282.** Waschke KA, Villani AC, Vermeire S, et al. Tumor necrosis factor receptor gene polymorphisms in Crohn's disease: association with clinical phenotypes. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:1126-1133.
- 283.** Sabate JM, Ameziane N, Lamoril J, et al. The V249I polymorphism of the CX3CR1 gene is associated with fibrostenotic disease behavior in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:748-755.
- 284.** Vermeire S, Pierik M, Hlavaty T, et al. Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD. *Gastroenterology*. 2005;129:1845-1853.
- 285.** Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, et al. Combined type-1 plasminogen activator inhibitor and NOD2/CARD15 genotyping predicts complicated Crohn's disease behaviour. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25:429-440.
- 286.** Nam SY, Kim N, Kim JS, et al. Heat shock protein gene 70-2 polymorphism is differentially associated with the clinical phenotypes of ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:1032-1038.
- 287.** Palmieri O, Latiano A, Valvano R, et al. Variants of OCTN1-2 cation transporter genes are associated with both Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23:497-506.
- 288.** Bouma G, Poen AC, García-González MA, et al. HLA-DRB1*03, but not the TNFA -308 promoter gene polymorphism, confers protection against fistulising Crohn's disease. *Immunogenetics*. 1998;47:451-455.
- 289.** Guagnozzi D, Pagnini C, Delle Fave G, et al. CARD15 and Toll-like receptor 4 mutations in Italian patients with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*. 2012;44:800-801.
- 290.** Farrell RJ, Kelleher D. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J Endocrinol*. 2003;178:339-346.
- 291.** Potocnik U, Ferkolj I, Glavac D, et al. Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. *Genes Immun*. 2004;5:530-539.

- 292.** Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;44:171-179.
- 293.** Urcelay E, Mendoza JL, Martinez A, et al. IBD5 polymorphisms in inflammatory bowel disease: association with response to infliximab. *World J Gastroenterol.* 2005;11:1187-1192.
- 294.** Dubinsky MC, Mei L, Friedman M, et al. Genome wide association (GWA) predictors of anti-TNFalpha therapeutic responsiveness in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1357-1366.
- 295.** Medrano LM, Taxonera C, Márquez A, et al. Role of TNFRSF1B polymorphisms in the response of Crohn's disease patients to infliximab. *Hum Immunol.* 2014;75:71-75.
- 296.** Steenholdt C, Enevold C, Ainsworth MA, et al. Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor receptor superfamily 1b and fas ligand are associated with clinical efficacy and/or acute severe infusion reactions to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;36:650-659.
- 297.** Michail S, Bultron G, Depaolo RW. Genetic variants associated with Crohn's disease. *Appl Clin Genet.* 2013;6:25-32.
- 298.** Sehgal R, Berg A, Hegarty JP, et al. NOD2/CARD15 mutations correlate with severe pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Dis Colon Rectum.* 2010;53:1487-1494.
- 299.** Meier CB, Hegazi RA, Aisenberg J, et al. Innate immune receptor genetic polymorphisms in pouchitis: is CARD15 a susceptibility factor? *Inflamm Bowel Dis.* 2005;11:965-971.
- 300.** Connelly TM, Berg AS, Harris LR 3rd, et al. Ulcerative colitis neoplasia is not associated with common inflammatory bowel disease single-nucleotide polymorphisms. *Surgery.* 2014;156:253-262.
- 301.** Pierik M, Vermeire S, Steen KV, et al. Tumour necrosis factor-alpha receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20:303-310.
- 302.** Ahmad T, Armuzzi A, Neville M, et al. The contribution of human leucocyte antigen complex genes to disease phenotype in ulcerative colitis. *Tissue Antigens.* 2003;62:527-535.
- 303.** de la Concha EG, Fernandez-Arquero M, Lopez-Nava G, et al. Susceptibility to severe ulcerative colitis is associated with polymorphism in the central MHC gene IKBL. *Gastroenterology.* 2000;119:1491-1495.
- 304.** Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, et al. Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol.* 2003;64:119-123.
- 305.** Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, et al. ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. *Hum Mol Genet.* 2006;15:797-805.
- 306.** Haritunians T, Taylor KD, Targan SR, et al. Genetic predictors of medically refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1830-1840.
- 307.** Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology.* 1982;143:29-36.

- 308.** Ananthakrishnan AN, Oxford EC, Nguyen DD, et al. Genetic risk factors for *Clostridium difficile* infection in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;38:522-530.
- 309.** Lee JC, Espéli M, Anderson CA, et al. Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell.* 2013;155:57-69.
- 310.** Hoefkens E, Nys K, John JM, et al. Genetic association and functional role of Crohn disease risk alleles involved in microbial sensing, autophagy, and endoplasmic reticulum (ER) stress. *Autophagy.* 2013;9:2046-2055.
- 311.** Montero-Meléndez T, Llor X, García-Planella E, et al. Identification of novel predictor classifiers for inflammatory bowel disease by gene expression profiling. *PLoS One.* 2013;8:e76235.
- 312.** Wei Z, Wang W, Bradfield J, et al. Large sample size, wide variant spectrum, and advanced machine-learning technique boost risk prediction for inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet.* 2013;92:1008-1012.
- 313.** Lee SH, Goddard ME, Wray NR, et al. A better coefficient of determination for genetic profile analysis. *Genet Epidemiol.* 2012;36:214-224.

SECÇÃO 2

CONTRIBUTO PESSOAL

CAPÍTULO 4

Dig Dis Sci (2011) 56:853–859
DOI 10.1007/s10620-010-1331-1

ORIGINAL ARTICLE

CARD15 Mutations and Perianal Fistulating Crohn's Disease: Correlation and Predictive Value of Antibiotic Response

Paulo Freire · Francisco Portela · Maria M. Donato ·
Manuela Ferreira · Paulo Andrade ·
Carlos Sofia

Received: 22 February 2010 / Accepted: 18 June 2010 / Published online: 15 July 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract

Background CARD15 mutations alter bowel immunity and increase susceptibility to Crohn's disease (CD). However, the relation between these mutations and Crohn's perianal fistulas has not been fully clarified.

Aims To assess whether CARD15 mutations are associated with risk of developing Crohn's perianal fistulas and whether these mutations are predictors of the response of perianal fistulas to antibiotics.

Methods CARD15 mutations were investigated in 203 consecutive CD patients. Presence/absence of history of perianal fistula was recorded. Patients with history of perianal fistula were divided into two groups (with/without CARD15 mutations), and response to antibiotics was evaluated in both groups.

Results Of the 203 patients, 60 (29.6%) showed at least one CARD15 mutation and 55 (27.1%) had history of perianal fistula. History of perianal fistula was identified in 13 (21.7%) patients with mutations and in 42 (29.4%)

patients without mutations ($P = 0.260$). Mean age at diagnosis of first perianal fistula was similar in patients with/without CARD15 mutations (28.7 ± 9.8 versus 29.7 ± 10.1 years, $P = 0.758$). Average time between disease onset and diagnosis of first perianal fistula was also similar in the two groups (4.6 ± 5.1 versus 5.0 ± 5.9 years, $P = 0.816$). Response of perianal fistulas to antibiotics (metronidazole alone or combined with ciprofloxacin) was significantly higher in patients without CARD15 mutations (7.7% versus 40.5%, $P = 0.041$).

Conclusions In CD, CARD15 mutations are not associated with risk of developing perianal fistulas or with time of their outbreak. Nevertheless, patients with perianal fistulas and CARD15 mutations showed worse response to antibiotics.

Keywords CARD15 · Crohn's disease · Perianal fistulas · Antibiotics

P. Freire (✉) · F. Portela · M. M. Donato · M. Ferreira ·
P. Andrade · C. Sofia
Department of Gastroenterology, Coimbra University Hospital,
Avenida Bissaya Barreto, 3000 Coimbra, Portugal
e-mail: pauloavfreire@gmail.com

F. Portela
e-mail: fasportela@gmail.com

M. M. Donato
e-mail: mariamanueldonato@gmail.com

M. Ferreira
e-mail: malvesferreira@netcabo.pt

P. Andrade
e-mail: paulo_andrade@sapo.pt

C. Sofia
e-mail: carlossofia@huc.min-saude.pt

Introduction

The transmural inflammation characteristic of Crohn's disease (CD) predisposes patients to formation of fistulas. Up to 43% of CD patients will develop perianal fistulas, with a significant increase of disability and direct and indirect costs, and a decrease in perceived quality of life [1–4]. The risk of developing Crohn's perianal fistulas increases when the disease involves the distal bowel. Patients with colonic CD, particularly those with rectal involvement, have significantly higher incidence of perianal fistulas than patients without colonic involvement [2]. Indeed, only 12% of patients with isolated ileal disease develop perianal fistulas, compared with 92% of patients with rectal involvement [2]. These results were recently

corroborated by a large cross-sectional study carried out in our country [5].

The American Gastroenterological Association technical review on perianal CD recommended division of fistulas into either simple or complex [6]. A simple fistula is superficial (intersphincteric or low transsphincteric), painless, with a single external opening and no evidence of rectovaginal involvement or anorectal stricture [6]. In contrast, a complex fistula is located high (high transsphincteric, extrasphincteric or suprasphincteric), may be associated with pain, can potentially involve multiple external openings, and may be associated with rectovaginal fistula and/or anorectal stricture [6]. This is a clinically important differentiation, because several studies have shown better outcomes for patients with simple fistula tracts [7–10].

Although treatments for fistulizing perianal CD have evolved greatly over the past decade, antibiotics remain widely used and are the recommended first-line treatment for these patients, despite the absence of controlled studies to support this approach [4, 11]. However, the response rate of perianal fistulas to antibiotics is only around 50% [12–16]. Furthermore, ineffective or inappropriate treatment of perianal fistula may lead to recurrence of the fistula or can result in the fistula progressing from simple to complex form [17]. Complex fistulas are more difficult to treat, have decreased healing rates, and are associated with less successful outcomes [7–10]. For these reasons, it would be very important to have predictors of the response of perianal fistulas to antibiotics.

The specific pathogenesis of Crohn's perianal fistulas is unknown, but luminal bacteria seem to play a role in their development and maintenance [18]. Since *CARD15* mutations increase susceptibility to CD and appear to change the host response to luminal bacteria, it is reasonable to speculate on a possible connection between this gene and perianal fistulas [19–24]. However, there are few studies on the correlation between *CARD15* mutations and development of Crohn's perianal fistulas, and they provided conflicting data [25, 26]. There is also limited information on whether *CARD15* variants may influence the response of perianal fistulas to treatment, namely to antibiotics [16]. In this study, we assessed whether *CARD15* mutations are associated with risk of developing Crohn's perianal fistulas and whether these mutations are predictors of the response of perianal fistulas to antibiotics (metronidazole and/or ciprofloxacin).

Methods

Patients

Two hundred three consecutive patients with CD [87 males, age (mean \pm standard deviation) = 35.9 ± 10.2 years;

116 females, age (mean \pm standard deviation) = 37.1 ± 7.6 years] were included in this investigation. Diagnosis of CD was based on accepted clinical, endoscopic, radiologic, and histologic criteria [27].

Ethical approval for this research was given by the local Ethics Committee. Each patient was informed of the nature of the study and signed the informed consent form, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Sample DNA Extraction

Blood samples were collected with standard venipuncture technique using ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-containing tubes. Genomic DNA was isolated from whole blood using the QIAamp Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany).

Genotyping

All participants were genotyped for the three major *CARD15* mutations: R702W (SNP8), G908R (SNP12), and 3020insC (SNP13). Genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR): variants R702W and G908R using HybProbe (FRET), and variant 3020insC using SimpleProbe. R702W variant was amplified and detected using the forward primer 5'-AgCCgCACAACCTTAgATCAC-3', the reverse primer 5'-gCgggCACAggCATAgC-3', the anchor probe 5'-LC Red640-gTCTggCACTC AgCCAgCAggCCCC-PH, and the donor probe 5'-gCgC CAgAgCAgggCCTTCTCA-FL. For assay of the G908R mutation, 5'-gCACATATCAggTACTCACTgACACT-3' was used as the forward primer, 5'-TTACCTgAgCCACCTCAA gC-3' as the reverse primer, 5'-LC Red705-CTgAA AAggCCAA AAgTCAACAgAC-PH as the anchor probe, and 5'-CCACTCTgTTgCCCCAgAA-FL as the donor probe. To detect the 3020insC variant, PCR was carried out using the forward primer 5'-gACAggTgggCTTCagTAgA-3', the reverse primer 5'-TgAggTTCggAgAgCTAAAACAg-3', and the simple probe 5'-CTgCAggCCCCCTTgAAA-FLQ.

The reaction mixture consisted of 18 μ l PCR master mix plus 2 μ l DNA of each patient. The PCR master mix for the R702W variant included 5.0 mM MgCl₂, 1 \times LightCycler DNA master hybridization probes (Roche, Mannheim, Germany), 0.5 μ M each primer, and 0.1 μ M each of fluorescein and LC-Red-640-labeled probe. Cycling parameters consisted of 1 cycle of 95°C for 2 min, followed by amplification for 45 cycles of 95°C for 0 s, 55°C for 10 s, and 72°C for 5 s. A melting curve was created by measuring the fluorescence signal generated with the following profile: 95°C for 5 s, 50°C for 10 s, and 90°C for 0 s with a slope 0.4°C/s transition. The PCR master mix for the G908R mutation included 2.5 mM MgCl₂, 1 \times LightCycler

DNA master hybridization probes (Roche, Mannheim, Germany), 0.5 μ M each primer, and 0.2 μ M each of fluorescein and LC-Red-705-labeled probe. Cycling parameters consisted of 1 cycle of 95°C for 2 min, followed by amplification for 40 cycles of 95°C for 10 s, 57°C for 8 s, and 72°C for 17 s. A melting curve was created by measuring the fluorescence signal generated with the following profile: 95°C for 20 s, 40°C for 20 s, and 85°C for 0 s with a slope 0.2°C/s transition. Finally, the PCR master mix for the 3020insC variant included 2.5 mM MgCl₂, 1 \times LightCycler DNA master hybridization probes (Roche, Mannheim, Germany), 0.2 μ M forward primer, 0.5 μ M reverse primer, and 0.2 μ M simple probe. Cycling parameters consisted of 1 cycle of 95°C for 2 min, followed by amplification for 40 cycles of 95°C for 10 s, 55°C for 10 s, and 72°C for 20 s. A melting curve was created by measuring the fluorescence signal generated with the following profile: 95°C for 20 s, 40°C for 20 s, and 85°C for 0 s with a slope 0.2°C/s transition. Sterile water was used as a negative control. The change of fluorescence was converted to a melting peak (T_m) by plotting the negative derivative of the fluorescence signal corresponding to the temperature ($-dF/dT$) using the LightCycler software.

The sequence variations of the PCR products were confirmed by DNA sequencing.

Medical History And Outcomes

This information was obtained from the inflammatory bowel disease database of our department and complemented by a review of patients' files. Initially we recorded whether patients developed perianal fistulas before or during follow-up. Then, in patients with history of perianal fistula, we recorded the following: gender, current age, disease location, type of fistulas (simple or complex), age at diagnosis of first perianal fistula, time between disease onset and diagnosis of first perianal fistula, antibiotics used in treatment of perianal fistulas, concomitant medication, and clinical response of perianal fistulas to antibiotic therapy.

Antibiotic therapy was defined as use of metronidazole and/or ciprofloxacin for at least 1 week. Metronidazole was used in all patients (dosage: median 980 mg/day, range 750–1,500 mg/day) and 28 patients also received ciprofloxacin (dosage: median 970 mg/day, range 500–1,000 mg/day).

Response was defined as absence of fistula drainage, even after compression, for at least 4 weeks, according to the Fistula Drainage Assessment definition of remission and following the current recommendations for efficacy endpoints in clinical trials [28, 29].

Clinical and laboratory investigators were blinded to genetic results and to clinical data, respectively.

Definition of Groups

Patients with history of perianal fistula were divided into two groups according to presence or absence of *CARD15* variants (with/without *CARD15* mutations). These groups were compared for: age at diagnosis of first perianal fistula, time between disease onset and diagnosis of first perianal fistula, and clinical response of perianal fistulas to antibiotic therapy.

Statistical Analysis

Categorical variables were expressed as frequency and percentage, and corresponding contingency tables were analyzed with Pearson's chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. Odds ratios (OR) were determined with 95% confidence intervals (95% CI).

Continuous variables were summarized using mean \pm standard deviation. These variables were tested for normal distributions using the Kolmogorov-Smirnov test. The Student's *t* test was employed to compare means of continuous variables and normally distributed data; otherwise, the Mann-Whitney *U* test was applied.

Only *P* values <0.05 were considered significant.

All variants studied were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Data were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software for Windows.

Results

A total of 203 patients were studied. *CARD15* variants were detected in 60 patients (29.6%), comprising 28 heterozygotes for SNP8 (13.8%), 13 heterozygotes for SNP13 (6.4%), 12 heterozygotes for SNP12 (5.9%), 3 compound heterozygotes [2 (1.0%) for SNP8/SNP12, 1 (0.5%) for SNP12/SNP13], and 4 homozygotes [2 (1.0%) for SNP13, 1 (0.5%) for SNP8, 1 (0.5%) for SNP12]. History of perianal fistula was identified in 55 (27.1%) patients, including 13 (21.7%) of the 60 patients with mutations and 42 (29.4%) of the 143 patients without mutations (*P* = 0.865).

Mean age at diagnosis of first perianal fistula was similar in the two groups (28.7 \pm 9.8 years in patients with *CARD15* mutations versus 29.7 \pm 10.1 years in patients without *CARD15* mutations, *P* = 0.758). Average time between disease onset and diagnosis of first perianal fistula was also similar in the two groups (4.6 \pm 5.1 years in patients with *CARD15* mutations versus 5.0 \pm 5.9 years in patients without *CARD15* mutations, *P* = 0.816).

The overall clinical response of perianal fistulas to antibiotics was 32.7% (18 of the 55 patients). This response was observed in 1 patient with *CARD15* mutation and in 17

patients without *CARD15* mutations (7.7% versus 40.5%, $P = 0.041$) (Table 1). The odds ratio, calculated for the probability of response to antibiotics in patients without mutations compared with patients with mutations, was 8.16 (95% confidence interval 0.97–68.74). This means that the probability of response of perianal fistulas to antibiotics in CD patients without *CARD15* mutations is 8.16 higher than that of patients with mutation of this gene (Table 1). The only patient with *CARD15* mutation who responded to antibiotic therapy was a heterozygote for SNP8. The antibiotics used, as well as the dosage and duration of therapy, were similar in patients with and without *CARD15* mutations (Table 2). Likewise we did not detect any significant differences in concomitant medication (Table 3). Finally, we found that patients with and without *CARD15* mutations did not significantly differ with regard to proportion of simple/complex fistulas (1.5 in patients with *CARD15* mutations versus 1.7 in patients without *CARD15* mutations, $P = 0.921$) or incidence of rectal mucosa involvement by CD (66.6% and 55.0% in patients with and without *CARD15* mutations, respectively; $P = 0.519$).

The 37 patients with perianal fistulas who did not respond to antibiotics then received the following treatments: surgery (26 patients), infliximab (8 patients), and combination surgery + infliximab (3 patients).

Discussion

Perianal fistulas are a common manifestation of CD that can lead to significant morbidity and even proctectomy [1–4].

As it is generally assumed that CD is a heterogeneous disease that is composed of subsets of disorders representing different pathogenic mechanisms, numerous genotype–phenotype studies have been performed reporting the association of *CARD15* variants with multiple characteristics of localization and behavior of CD [25, 26, 30–36]. A major problem in comparing these studies is the heterogeneity of phenotypic classifications presented, especially with regard to penetrating behavior. Some classification schemes, according to the Vienna classification, include perianal fistulas in fistulizing behavior, whereas others, following the

Montreal classification, regard anal involvement as a different entity, separate from intra-abdominal penetrating disease [25, 26, 30–38].

Few studies have specifically evaluated the correlation between *CARD15* mutations and Crohn's perianal fistulas, and their results were controversial. Henckaerts et al., in a recent study involving 875 CD patients, concluded that absence of *CARD15* variants was independently associated with development of perianal fistulas [25]. In contrast, Annese et al. genotyped 360 consecutive CD patients for the three main *CARD15* mutations and found, by univariate analysis, that patients who were carriers of any of the *CARD15* variants presented significantly higher incidence of perianal disease [26]. Additionally, on multivariate analysis, they observed that the R720W and G908P variants were positively and negatively associated with perianal disease, respectively [26]. In our study, we did not find any association between *CARD15* mutations and risk of developing Crohn's perianal fistulas, or with time of perianal fistula outbreak.

Fistula pathogenesis remains poorly understood, and therefore management of patients with Crohn's perianal fistulas remains challenging. Nevertheless, there is evidence suggesting that luminal bacteria might play a role in development and maintenance of fistulas [18, 39–41]. Perhaps for this reason, antibiotics are a widely used and recommended first-line treatment for fistulas in CD patients, despite the near absence of randomized controlled trials supporting this approach [4, 11]. As only 50% of patients respond to this therapy, predictors for selection of patients for antibiotic treatment are crucial [12–16]. This is even more relevant if we remember that inadequate treatment of perianal fistula may lead to fistula recurrence or can result in the fistula progressing from simple to complex form [17].

Regarding the response of perianal fistulas to antibiotics, our results show that this is positively associated with absence of *CARD15* mutations (Table 1). It may be thought that the best response to antibiotics observed in these patients could be related to factors other than *CARD15* genotype [2, 42–44]. This was ruled out by demonstrating no significant differences between patients with and without *CARD15* variants in relation to other factors with a

Table 1 *CARD15* mutations versus response of perianal fistulas to antibiotics

	Total, <i>n</i>	Response of perianal fistulas to antibiotics		<i>P</i>	OR (95% CI)*
		Yes, <i>n</i> (%)	No, <i>n</i>		
Patients with <i>CARD15</i> mutations	13	1 (7.7)	12	0.041	8.16 (0.97–68.74)
Patients without <i>CARD15</i> mutations	42	17 (40.5)	25		

OR odds ratio, CI confidence interval

* Calculated for the probability of response to antibiotics in patients without mutations compared with patients with mutations

Table 2 Characteristics of antibiotic therapy: patients with *CARD15* mutations versus patients without *CARD15* mutations

	With <i>CARD15</i> mutations	Without <i>CARD15</i> mutations	<i>P</i>
Ciprofloxacin alone (% of patients)	0	0	–
Metronidazole alone (% of patients)	44.4	50	0.803
Ciprofloxacin and metronidazole (% of patients)	55.6	50	0.783
Ciprofloxacin: dosage (mg/day)	1,000 ± 0	961 ± 138.7	0.551
Metronidazole: dosage (mg/day)	1,138 ± 356	932 ± 371	0.160
Ciprofloxacin: duration (weeks)	6.0 ± 2.4	6.1 ± 3.3	0.963
Metronidazole: duration (weeks)	8.0 ± 7.0	9.2 ± 8.0	0.687

Table 3 Concomitant medication: patients with *CARD15* mutations versus patients without *CARD15* mutations

	With <i>CARD15</i> mutations (%)	Without <i>CARD15</i> mutations (%)	<i>P</i>
Without medication	25.0	39.5	0.431
5-ASA	75.0	58.1	0.375
Steroids	25.0	7.0	0.148
Azathioprine, <3 months	9.0	19.0	0.251
Azathioprine, ≥3 months	25.0	9.0	0.162

5-ASA 5-aminosalicylic acid

potential effect on the response. In fact, we found no significant differences between these two groups of patients with regard to the characteristics of antibiotic therapy (Table 2), concomitant medication (Table 3), proportion of simple/complex fistulas or incidence of rectal mucosa involvement by CD.

Angelberger et al., in a prospective study including 52 CD patients with perianal fistulas treated with antibiotics, also found better clinical response in patients without *CARD15* mutations [16]. Nevertheless, in that work ciprofloxacin was used as first-line treatment, while in our study all patients received metronidazole, with or without ciprofloxacin (association with ciprofloxacin in about half of the cases). Thus, to our knowledge, our study is the first to show that *CARD15* genotype predicts the response of Crohn's perianal fistulas to treatment with metronidazole alone or in combination with ciprofloxacin. Based on our results, we suggest that antibiotics should be questioned as first-line treatment in perianal fistulas of CD patients with *CARD15* variants.

Usually infliximab is recommended as second-line treatment for Crohn's perianal fistulas when first-line treatment (antibiotics and/or azathioprine/6-mercaptopurine) fails [4, 11]. Nevertheless, given the low response rate of Crohn's perianal fistulas to antibiotics and/or azathioprine/6-mercaptopurine and the encouraging results of infliximab in this setting, some authors consider a "top-down" approach as an option for these patients [4, 11–16]. Our results, demonstrating that *CARD15* genotype seems to predict clinical response of perianal fistulas to antibiotics, suggest that *CARD15* genotype may be a factor in selection

of patients with perianal fistulas for a "top-down" approach. This interesting hypothesis needs to be tested in randomized controlled studies.

There is, so far, no explanation for our observation of a greater response to antibiotics in Crohn's perianal fistulas of *CARD15* wild-type patients. However, we know that *CARD15* plays a role in bowel immunity by participating in recognition of intestinal bacteria [21–24]. Thus, we can speculate that, in *CARD15* wild-type patients, endogenous antimicrobial activity may synergize with antibiotics to enhance their action, while in patients with *CARD15* mutations this synergy does not occur. This speculation is reinforced by some recent data that support an association between *CARD15* mutations and increased risk of several infectious complications [45–47].

Some limitations of our study should be mentioned. Firstly, characterization and evaluation of fistulas were carried out retrospectively. Secondly, the size of the study population is relatively small. Finally, this work was performed in an academic referral hospital; therefore, our results may not be applicable to institutions with different patient populations.

Our work shows how gene identification strategies combined with genotype–phenotype correlations might identify prognostic markers to guide disease management. In the future, randomized controlled studies are highly warranted to confirm our results and to identify more prognostic markers in order to define the optimum approach for treatment of this challenging, and often serious, complication of CD.

In conclusion, our study suggests that *CARD15* mutations are not associated with risk of developing Crohn's perianal fistulas, or with time of perianal fistula manifestation. Nevertheless, in our series, *CARD15* genotype seems to predict clinical response of perianal fistulas to antibiotic treatment. In fact, CD patients with perianal fistulas and *CARD15* mutations showed worse response to antibiotic therapy with metronidazole alone or in combination with ciprofloxacin. Thus, in the light of our findings, we propose that antibiotics should be questioned as first-line treatment for Crohn's perianal fistulas in patients with *CARD15* mutations. Such patient selection might avoid delay in application of effective treatment and minimize the risk of adverse events under antibiotic treatment.

Conflicts of interest statement We declare that we have no conflicts of interest.

References

- Schwartz DA, Herdman CR. Review article: the medical treatment of Crohn's perianal fistulas. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;19:953–967.
- Hellers G, Bergstrand O, Ewerth S, Holmström B. Occurrence and outcome after primary treatment of anal fistulae in Crohn's disease. *Gut.* 1980;21:525–527.
- Schwartz DA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, et al. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology.* 2002;122:875–880.
- Nielsen OH, Rogler G, Hahnloser D, Thomsen OØ. Diagnosis and management of fistulizing Crohn's disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2009;6:92–106.
- Magro F, Portela F, Lago P, et al. Crohn's disease in a southern European country: montreal classification and clinical activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:1343–1350.
- American Gastroenterological Association Clinical Practice Committee. American Gastroenterological Association medical position statement: perianal Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2003;125:1503–1507.
- Bell SJ, Williams AB, Wiesel P, Wilkinson K, Cohen RC, Kamm MA. The clinical course of fistulizing Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;17:1145–1151.
- Regueiro M, Mardini H. Treatment of perianal fistulizing Crohn's disease with infliximab alone or as an adjunct to exam under anesthesia with seton placement. *Inflamm Bowel Dis.* 2003;9:98–103.
- Scott HJ, Northover JM. Evaluation of surgery for perianal Crohn's fistulas. *Dis Colon Rectum.* 1996;39:1039–1043.
- Topstad DR, Panaccione R, Heine JA, Johnson DR, MacLean AR, Buie WD. Combined seton placement, infliximab infusion, and maintenance immunosuppressives improve healing rate in fistulizing anorectal Crohn's disease: a single center experience. *Dis Colon Rectum.* 2003;46:577–583.
- Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut.* 2006;55:i36–i58.
- Dejaco C, Harrer M, Waldhoer T, Miehsler W, Vogelsang H, Reinisch W. Antibiotics and azathioprine for the treatment of perianal fistulas in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18:1113–1120.
- Brandt LJ, Bernstein LH, Boley SJ, Frank MS. Metronidazole therapy for perineal Crohn's disease: a follow-up study. *Gastroenterology.* 1982;83:383–387.
- Jakovovits J, Schuster MM. Metronidazole therapy for Crohn's disease and associated fistulae. *Am J Gastroenterol.* 1984;79:533–540.
- Turumen U, Fakkila M, Yaltonen V. Longterm outcome of ciprofloxacin treatment in severe perianal or fistulous Crohn's disease. *Gastroenterology.* 1993;104:A793.
- Angelberger S, Reinisch W, Dejaco C, et al. *NOD2/CARD15* gene variants are linked to failure of antibiotic treatment in perianal fistulating Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1197–1202.
- Williamson PR, Hellinger MD, Larach SW, Ferrara A. Twenty-year review of the surgical management of perianal Crohn's disease. *Dis Colon Rectum.* 1995;38:389–392.
- West RL, Van der Woude CJ, Endtz HP, et al. Perianal fistulas in Crohn's disease are predominantly colonized by skin flora: implications for antibiotic treatment? *Dig Dis Sci.* 2005;50:1260–1263.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of *NOD2* leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411:599–603.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411:603–606.
- Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through *NOD2*. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* 2003;278:5509–5512.
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. *NOD2*-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005;307:731–734.
- Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. *NOD2 (CARD15)* mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut.* 2004;53:1658–1664.
- Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, et al. Crohn's disease-associated *NOD2* variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology.* 2003;124:140–146.
- Henckaerts L, Van Steen K, Verstreken I, et al. Genetic risk profiling and prediction of disease course in Crohn's disease patients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7:972–980. e2.
- Annese V, Lombardi G, Perri F, et al. Variants of *CARD15* are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease—an IG-IBD study. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:84–92.
- Stange EF, Travis SP, Vermeire S, et al. European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut.* 2006;55:i1–i15.
- Present DH, Rutgeerts P, Targan S, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med.* 1999;340:1398–1405.
- Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, et al. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;122:512–530.
- Vermeire S, Wild G, Kocher K, et al. *CARD15* genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet.* 2002;71:74–83.
- Lesage S, Zouali H, Cézard JP, et al. *CARD15/NOD2* mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet.* 2002;70:845–857.
- Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutations in *NOD2* are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2002;123:679–688.

33. Heliö T, Halme L, Lappalainen M, et al. *CARD15/NOD2* gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut*. 2003;52:558–562.
34. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of *NOD2* variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:2393–2404.
35. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, et al. Toll-like receptor 4 and *NOD2/CARD15* mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1489–1495.
36. Radford-Smith G, Pandeya N. Associations between *NOD2/CARD15* genotype and phenotype in Crohn's disease—Are we there yet? *World J Gastroenterol*. 2006;12:7097–7103.
37. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis*. 2000;6:8–15.
38. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005;19:5–36.
39. Janowitz HD, Croen EC, Sachar DB. Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut*. 1985;26:279–284.
40. Yamamoto T, Allan RN, Keighley MR. Effect of fecal diversion alone on perianal Crohn's disease. *World J Surg*. 2000;24:1258–1262.
41. Gaertner WB, Decanini A, Mellgren A, et al. Does infliximab infusion impact results of operative treatment for Crohn's perianal fistulas? *Dis Colon Rectum*. 2007;50:1754–1760.
42. Nordgren S, Fasth S, Hultén L. Anal fistulas in Crohn's disease: incidence and outcome of surgical treatment. *Int J Colorectal Dis*. 1992;7:214–218.
43. Sandborn WJ, Fazio VW, Feagan BG, Hanauer SB. American Gastroenterological Association Clinical Practice Committee. AGA technical review on perianal Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003;125:1508–1530.
44. Halme L, Sainio AP. Factors related to frequency, type, and outcome of anal fistulas in Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*. 1995;38:55–59.
45. Ahrens P, Kattner E, Köhler B, et al. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res*. 2004;55:652–656.
46. Brenmoehl J, Herfarth H, Glück T, et al. Genetic variants in the *NOD2/CARD15* gene are associated with early mortality in sepsis patients. *Intensive Care Med*. 2007;33:1541–1548.
47. den Hartog JE, Ouburg S, Land JA, et al. Do host genetic traits in the bacterial sensing system play a role in the development of Chlamydia trachomatis-associated tubal pathology in subfertile women? *BMC Infect Dis*. 2006;6:122.

CAPÍTULO 5

Int J Colorectal Dis (2014) 29:653–661
DOI 10.1007/s00384-014-1850-x

ORIGINAL ARTICLE

NOD2 gene mutations in ulcerative colitis: useless or misunderstood?

Paulo Freire · Ricardo Cardoso · Pedro Figueiredo · Maria M. Donato · Manuela Ferreira · Sofia Mendes · Ana Margarida Ferreira · Helena Vasconcelos · Francisco Portela · Carlos Sofia

Accepted: 9 March 2014 / Published online: 22 March 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Purpose NOD2 mutations have been linked to an increased risk of Crohn's disease and to some of its phenotypes. The association between NOD2 mutations and susceptibility to ulcerative colitis (UC) remains somewhat controversial and potential correlations between these mutations and UC phenotype have not been studied.

Aim To assess whether NOD2 mutations are a risk factor for UC in Portugal and if there are any genotype–phenotype correlations in these patients.

Methods The three main NOD2 mutations were searched in 200 patients with UC and in 202 healthy controls.

Results NOD2 mutations were present in 28 patients with UC (14.0 %) and in 27 controls (13.4 %) ($p=0.853$). Mutation carriers were more likely to receive steroids during the first

year of disease than non-carriers (54.2 % vs. 29.6 %, $p=0.018$) and among these patients the need for intravenous administration was more frequent in those with the R702W polymorphism (90.0 % vs. 45.5 %, $p=0.014$). In patients with severe colitis admitted for intravenous steroids, a greater proportion of mutation carriers was considered intravenous-steroid refractory and required salvage therapy (90.0 % vs. 38.1 %, $p=0.004$). Patients with NOD2 mutation were submitted to colectomy more frequently than non-carriers (17.9 % vs. 4.1 %, $p=0.015$). No correlation with the need for immunosuppressants/immunomodulators was found.

Conclusions In the Portuguese population, NOD2 mutations do not increase the risk of UC but are associated with a more aggressive course including greater need of steroids in the first

Paulo Freire and Ricardo Cardoso contributed equally to the article.

P. Freire (✉) · R. Cardoso · P. Figueiredo · M. Ferreira · S. Mendes · A. M. Ferreira · F. Portela · C. Sofia
Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Avenida Bissaya Barreto, 3000 Coimbra, Portugal
e-mail: pauloavfreire@gmail.com

R. Cardoso
e-mail: racardoso@gmail.com

P. Figueiredo
e-mail: pnf11@sapo.pt

M. Ferreira
e-mail: malvesferreira@netcabo.pt

S. Mendes
e-mail: msosiamendes@iol.pt

A. M. Ferreira
e-mail: magaidaferrreira@gmail.com

F. Portela
e-mail: fasportela@gmail.com

C. Sofia
e-mail: carlossofia@huc.min-saude.pt

P. Figueiredo · M. M. Donato · C. Sofia
Center of Gastroenterology, Faculty of Medicine,
University of Coimbra,
Avenida Bissaya Barreto, 3000 Coimbra, Portugal

M. M. Donato
e-mail: mariamanueldonato@gmail.com

H. Vasconcelos
Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar Leiria-Pombal,
Rua das Olhalvas, 2410-197 Leiria, Portugal
e-mail: hml.vasconcelos@gmail.com

year, increased incidence of intravenous-steroid refractoriness and a higher colectomy rate.

Keywords Ulcerative colitis · *NOD2* mutations · Genotype–phenotype correlations · Disease course · Prognosis

Introduction

The inflammatory bowel diseases (IBDs), ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), are chronic relapsing and remitting inflammatory conditions affecting the gastrointestinal tract. They are likely the result of a dysregulated immune response to the gut microflora in genetically predisposed individuals [1].

Over the past two decades, investigators have used whole genome linkage and genome-wide association studies, to identify over 163 genetic loci containing susceptibility genes for IBD [2]. These loci, although nearly all low-risk, have provided important lessons regarding IBD etiopathogenesis, including that UC and CD are related polygenic IBDs, with distinct and overlapping susceptibility loci [2, 3].

Although UC and CD share associations with many single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in Th17/IL22-23 axis, adaptive immunity and epithelial barrier function, there are divergences between the two diseases in the *NOD2* and autophagy pathway SNPs which are both associated with CD but not UC [2, 4, 5].

NOD2, located on chromosome 16, was one of the earliest genes in which mutations have been shown to be associated with IBD [6, 7]. This gene encodes a protein that functions as an intracellular sensor of muramyl-dipeptide, a component of bacterial cell walls [8]. Therefore, *NOD2* mutations compromise host response to enteric bacteria [8]. Three major *NOD2* SNPs, two missense [R702W, G908R] and one frameshift (1,007 fs), were shown by independent groups to be associated with susceptibility to CD [6, 7, 9–11]. By contrast, even though most available data showed no link between *NOD2* mutations and susceptibility to UC, a few recent studies have reached different conclusions, and so this matter remains somewhat controversial [4, 5, 10, 12–15].

Great efforts have been made to predict disease behavior and response to treatment in IBD [16–19]. Such understanding could personalize therapy, namely early introduction of more aggressive therapies to patients at high risk or avoiding starting predictably ineffective treatments. Indeed, the ultimate goal in the genomic study of IBD is to identify biologically relevant genotype–phenotype associations and to apply them to clinical practice [17, 20].

Patients with UC demonstrate a certain degree of heterogeneity as the age of onset, disease extent, natural history, response to medical therapies, and need for surgery vary between individuals [17, 21, 22]. Among the UC

susceptibility genes, HLA DRB1*0103 and the multidrug resistance gene 1 (MDR1/ABCB1) also contribute to clinical phenotype and natural history, being associated with extensive and severe disease [17, 23–37]. In CD, *NOD2* gene mutations have repeatedly been shown to be associated with ileal disease, early age of onset, stricturing, and/or penetrating phenotype and increased need for surgery [5, 9, 10, 38–49].

Surprisingly, there are no studies focusing on potential genotype–phenotype associations between *NOD2* mutations and UC, perhaps because it is not commonly considered a susceptibility gene for UC [5, 10, 50]. All genotype–phenotype UC association studies focus on genes that had previously been identified as susceptibility genes for the disease [5, 17]. Nevertheless, this may produce a bias, since one gene not related with increased susceptibility to a disease may be associated with a particular phenotype of this disease. Indeed, this lesson can clearly be taken from the study of Seghal et al. [20]. In this work, even though *NOD2* mutations were not associated with the overall risk of pouchitis, a relation between the mutation carrier status and severe pouchitis was found [20]. Thus, the authors concluded that preoperative assessment of *NOD2* in ileal pouch-anal anastomosis candidates may predict severe pouchitis and might assist in preoperative surgical decision making [20].

In light of these data, we aimed to investigate if *NOD2* mutations increase susceptibility to UC in Portugal and whether there are genotype–phenotype correlations in these patients.

Methods

Patients and controls

In this case-control study, 200 Portuguese patients with UC (male/female, 86/114; mean age at diagnosis of UC 34.8±14.4 years old) and 202 healthy (blood donors) sex-matched controls, were genotyped for the three main *NOD2* mutations (R702W, G908R, and 3020insC). UC patients were consecutively recruited from a gastroenterology department in the inpatient and outpatient setting. The inclusion criteria for all study participants included Caucasian ethnicity and residency in the central region of Portugal and, for UC patients, a confirmed disease diagnosis based on established clinical, endoscopic, radiological, and histological criteria [51–53]. Patients with CD or colonic inflammatory bowel disease unclassified (IBDU) were excluded from the study.

Genomic DNA was isolated from whole blood in all the study participants.

Detailed phenotypic characteristics, including demographic data and clinical parameters, were obtained with a standardized questionnaire filled out by reviewing the medical charts and a patient interview at the time of enrolment. Phenotypic characteristics were classified

according to the recently published second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of UC [54–56]. All phenotypic data were collected blind to the results of the genotypic data.

Correlations between *NOD2* mutations and UC phenotypic characteristics were sought. The associations with statistical significance in the univariate analysis were then tested in multivariate analysis using age at diagnosis and extent of disease as covariates since these are the factors most often and consistently described as having prognostic value in UC [57].

This study was approved by the local Ethics Committee and informed consent was obtained from all participants prior to enrolment into the study, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Sample DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood in accordance with the QIAamp Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany).

All participants were genotyped for the three major *NOD2* mutations: 3020insC (SNP13), R702W (SNP8) and G908R (SNP12). Genotyping was performed by real-time polymerase chain reaction (PCR): 3020insC variant using SimpleProbe and variants R702W and G908R using HybProbe (FRET). In order to detect the 3020insC variant, PCR was carried out using the forward primer 5'-gACAggTgggCTTCagTAgA-3', the reverse primer 5'-TgAggTTCggAgAgCTAAAACAg-3' and the simple probe 5'-CTgCaggCCCCTTgAAA-FLQ. The R702W variant was amplified and detected using the forward primer 5'-AgCCgCACAACTTAgATCAC-3', the reverse primer 5'-gCgggCACAggCATAgC-3', the anchor probe 5'-LC Red640-gTCTgGCACTCAGCCAgCaggCCCC-PH and the donor probe 5'-gCgCCAgAgCagggCCTTCTCA-FL. For assay of the G908R mutation, 5'-gCACATATCaggTACTCACTgACACT-3' was used as the forward primer, 5'-TTACTgAgCCACCTCAAgC-3' as the reverse primer, 5'-LC Red705-CTgAAAAgGCCAAAAGgTCAACAgAC-PH as the anchor probe and the 5'-CCACTCTgTTgCCCCAgAA-FL as the donor probe.

The reaction mixture consisted of 18 μ l of the PCR master mix plus 2 μ l of the DNA of each patient. The PCR master mix for the R702W variant included 5.0 mM MgCl₂, 1 \times LightCycler DNA master hybridization probes (Roche, Mannheim, Germany), 0.5 μ M each primer and 0.1 μ M each fluorescein and LC-Red-640-labeled probe. Cycling parameters consisted of 1 cycle of 95 °C for 2 min., followed by amplification for 45 cycles of 95 °C for 0 s, 55 °C for 10 s, and 72 °C for 5 s. A melting curve was created by measuring the fluorescent signal generated with the following profile: 95 °C for 5 s, 50 °C for 10 s, and 90 °C for 0 s with a slope 0.4 °C/s

transition. The PCR master mix for the G908R mutation included 2.5 mM MgCl₂, 1 \times LightCycler DNA master hybridization probes (Roche, Mannheim, Germany), 0.5 μ M each primer and 0.2 μ M each fluorescein and LC-Red-705-labeled probe. Cycling parameters consisted of 1 cycle of 95 °C for 2 min., followed by amplification for 40 cycles of 95 °C for 10 s, 57 °C for 8 s, and 72 °C for 17 s. A melting curve was originated by measuring the fluorescent signal generated with the following profile: 95 °C for 20 s, 40 °C for 20 s, and 85 °C for 0 s with a slope 0.2 °C/s transition. Finally, the PCR master mix for the 3020insC variant included 2.5 mM MgCl₂, 1 \times LightCycler DNA master hybridization probes (Roche, Mannheim, Germany), 0.2 μ M forward primer, 0.5 μ M reverse primer and 0.2 μ M simple probe. Cycling parameters consisted of 1 cycle of 95 °C for 2 min, followed by amplification for 40 cycles of 95 °C for 10 s, 55 °C for 10 s, and 72 °C for 20 s. A melting curve was created by measuring the fluorescent signal generated with the following profile: 95 °C for 20 s, 40 °C for 20 s, and 85 °C for 0 s with a slope 0.2 °C/s transition. Sterile water was used as a negative control. The change of fluorescence was converted to a melting peak (T_m) by plotting the negative derivative of the fluorescent signal corresponding to the temperature ($-dF/dT$) with the LightCycler software.

The sequence variations of the PCR products were confirmed by DNA sequencing.

Statistical analysis

Continuous variables were summarized using means and standard deviation and categorical variables were expressed as frequency and percentage. Standard tests were used to compare means and proportions: Student's *t* test or Wilcoxon rank-sum test for continuous variables and Mann-Whitney *U* Test, Chi-Square or Fisher's Exact Test for categorical variables, when appropriate.

Multivariate analysis was performed by logistic regression for each outcome that showed a significant correlation with *NOD2* mutations in the univariate analysis using age at diagnosis and maximum extent of disease as additional covariates.

Colectomy-free survival was calculated with the Kaplan-Meier method and the log-rank test was employed to make comparisons between groups. Data were censored at the time of colectomy or at the patient's last recorded visit.

Only *p* values <0.05 were considered significant and all *p* values presented are two-tailed.

Each genetic variant studied was in Hardy-Weinberg equilibrium.

The data was analyzed using the IBM SPSS Statistics (IBM Co., Armonk, NY, USA) computer software for Windows (version 20.0).

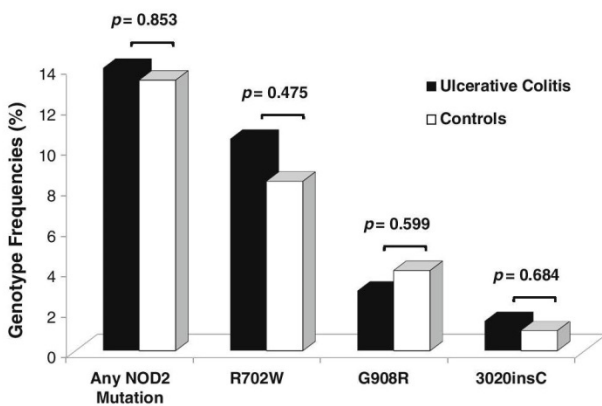


Fig. 1 Genotype frequencies of the *NOD2* variants in UC patients and sex-matched controls

Results

NOD2 mutation frequency

NOD2 mutations were found in 28 patients with UC (including one R702W homozygote, one compound heterozygote R702W/G908R and another compound heterozygote G908R/3020insC) corresponding to a prevalence of 14.0 %. The most frequent polymorphism was R702W, present in 21 patients (10.5 %). The combined frequency of the three tested SNP's was similar between the study population and the sex-matched controls, as was the frequency of each individual genotype (Fig. 1). The *NOD2* allele frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in all patients and in control subjects.

Study population

Demographic characteristics

The demographic characteristics of the study population are summarized in Table 1. As shown, there are no significant differences between carriers and non-carriers of *NOD2* mutations concerning age at diagnosis, gender, family history or

smoking habits. Overall mean follow-up, considered as the time passed between diagnosis and last visit or colectomy, was 180.26±105.60 months.

Extent of disease

Regarding the maximum extent of disease, 17 (8.6 %) patients had proctitis, 84 (42.6 %) distal colitis and 96 (48.7 %) extensive colitis. There were no significant differences in the extent of the disease (proctitis/distal colitis/extensive colitis) between patients with and those without *NOD2* mutations (respectively, 11.1 %/37.0 %/51.9 % vs. 8.2 %/43.5 %/48.2 %; $p=0.865$).

First year of disease

When evaluating the disease course during the first year following diagnosis, we observed that a greater proportion of patients with a *NOD2* mutation required at least one course of steroids compared with non-carriers: 54.2 % (13 patients) as compared with 29.6 % (42 patients) ($p=0.018$) (Table 2).

Among steroid-treated patients, even though the percentage of patients admitted for intravenous steroids was superior in the group of the mutation carriers [9 patients (75.0 %) vs. 20 patients (47.6 %)], it did not reach statistical significance ($p=0.113$). Nevertheless, the carriers of the R702W variant were more likely to need the intravenous route than non-carriers of this specific mutation [9 patients (90.0 %) vs. 20 patients (45.5 %), $p=0.014$] (Table 2).

Severe colitis

A total of 52 patients (26.0 % of the study population) had at least one episode of severe colitis, defined as a flare with severe activity according Truelove and Witts criteria and requiring admission and treatment with intravenous steroids [54, 58]. There was no difference in the incidence of this event between genotype groups (Table 3). Significantly more patients with *NOD2* carrier status were intravenous-steroid

Table 1 Demographic characteristics of the study population

Variables		All Patients	Carriers	Non-carriers	<i>p</i>
Age at diagnosis	A1/A2/A3 ^a	3.0 %/65.5 %/31.5 %	7.1 %/57.1 %/35.7 %	2.3 %/66.9 %/30.8 %	0.882
	mean ± SD ^b	34.83±14.41	35.43±14.26	34.73±14.48	0.811
Male <i>n</i> (%)		86 (43.0 %)	12 (42.9 %)	74 (43.0 %)	0.987
Positive family history for IBD <i>n</i> (%)		25 (12.5 %)	5 (17.9 %)	20 (11.6 %)	0.359
Positive smoking history <i>n</i> (%)		40 (20.0 %)	5 (17.9 %)	35 (20.3 %)	0.760

SD Standard deviation; IBD inflammatory bowel disease

^a A1 <16, A2 16–40, A3 >40 years; according Montreal classification [54, 58]

^b Values in years

Table 2 First year of disease

Variables	All <i>NOD2</i> mutations			R702W polymorphism		
	Carrier (%)	Non-carrier (%)	<i>p</i>	Carrier (%)	Non-carrier (%)	<i>p</i>
≥1 flare requiring steroids ^a	54.2 %	29.6 %	0.018	55.6 %	30.4 %	0.032
≥1 admission for IV steroids ^b	75.0 %	47.6 %	0.113	90.0 %	45.5 %	0.014

IV intravenous

^aData available in 166 patients

^bData available in 54 patients

refractory and required salvage therapy with cyclosporine, infliximab, or colectomy as compared to *NOD2* wild-type patients (90.0 % vs. 38.1 %, *p*=0.004). Nevertheless, there was no difference between carriers and non-carriers of *NOD2* polymorphisms regarding response to medical salvage therapy and therefore in the need for salvage colectomy (Table 3).

Long-term disease course—treatment requirements

The rate of steroid-dependence was similar between groups (33.3 % vs. 27.5 %, *p*=0.531). Even though there was no statistical difference between carriers and non-carriers regarding the rate of steroid-resistance when the three polymorphisms were studied together, we did find that patients with the polymorphism R702 W (6 patients, 28.6 %) were more often resistant to steroids than non-carriers (18 patients, 10.3 %) (*p*=0.027). There were no significant differences between genotypes regarding the proportion of patients treated with thiopurines or infliximab.

The colectomy rate was significantly higher in carriers of *NOD2* mutations than in non-carriers: 17.9 % (5 patients) as compared with 4.1 % (7 patients) (*p*=0.015) (Table 4 and Fig. 2). The same behavior was observed when R702W polymorphism was considered individually (Table 4 and Fig. 2).

No patient deaths were recorded during follow-up.

Multivariate analysis

The above-described results that reached statistical significance were then tested in multivariate analysis considering age at diagnosis and extent of disease as covariates. All these correlations remained statistically significant, indicating that the *NOD2*-phenotype associations detected are independent from the age at diagnosis and the extent of disease (data not shown).

Discussion

IBD, including UC, has a great amount of heterogeneity, starting in the type and age of presentation, through natural history of disease and ending in the therapeutic requirements and response [17, 21, 22]. An old and still unachieved goal is to discover a way of predicting the disease evolution and thereby define a more appropriate and individually tailored monitoring and therapeutic approach [16–19]. The personalized choice of the treatment regimen may help to maximize efficacy, minimize delays to effective treatment, and improve safety and tolerability.

Therefore, an ultimate objective in the genomic study of IBD is to identify biologically relevant genotype–phenotype associations and to apply them to clinical practice [16, 17, 20]. In the past two decades, genetic variants identified as being

Table 3 Severe colitis—incidence and therapy

Variables	All <i>NOD2</i> mutations			R702W polymorphism		
	Carriers <i>n</i> (%)	Non-carriers <i>n</i> (%)	<i>p</i>	Carriers <i>n</i> (%)	Non-carriers <i>n</i> (%)	<i>p</i>
Severe colitis ^a	10 (35.7 %)	42 (24.4 %)	0.206	8 (38.1 %)	44 (24.6 %)	0.182
IV steroid refractory ^b	9 (90.0 %)	16 (38.1 %)	0.004	7 (87.5 %)	18 (40.9 %)	0.022
CYA/IFX refractory ^c	2 (28.6 %)	2 (13.3 %)	0.565	2 (33.3 %)	2 (12.5 %)	0.292

IV intravenous, CYA cyclosporine, IFX infliximab

^a Flare with severe activity according Truelove and Witts criteria and requiring admission and treatment with intravenous steroids [54, 59]

^b No response to intravenous steroids and required salvage therapy with cyclosporine, infliximab, or colectomy

^c No response to cyclosporine and/or infliximab and required salvage colectomy

Table 4 Long term disease course—treatment requirements

Variables	All <i>NOD2</i> mutations			R702W polymorphism		
	Carrier <i>n</i> (%)	Non-carrier <i>n</i> (%)	<i>p</i>	Carrier <i>n</i> (%)	Non-carrier <i>n</i> (%)	<i>p</i>
Steroid-dependent ^a	9 (33.3 %)	47 (27.5 %)	0.531	7 (33.3 %)	49 (27.7 %)	0.587
Steroid refractory ^b	7 (25.0 %)	17 (10.1 %)	0.054	6 (28.6 %)	18 (10.3 %)	0.027
AZA/6-MP ^c	11 (39.3 %)	66 (38.4 %)	0.927	8 (38.1 %)	69 (38.5 %)	0.968
Infliximab ^d	6 (21.4 %)	20 (11.6 %)	0.220	5 (23.8 %)	21 (11.7 %)	0.161
Colectomy ^e	5 (17.9 %)	7 (4.1 %)	0.015	4 (19.0 %)	8 (4.5 %)	0.026

AZA azathioprine; 6-MP 6-Mercaptopurine

^aData available in 198 patients

^bData available in 196 patients

^cData available in 200 patients

^dData available in 200 patients

^eData available in 200 patients

associated with increased susceptibility to IBD were then subject to research in order to investigate whether they are also correlated with the disease phenotype. *NOD2*, the first gene linked with increased susceptibility to CD, has later been shown to be associated with ileal disease, early age of onset, stricturing, and/or penetrating phenotype and increased need

for surgery [5, 9, 10, 38–49]. Among the UC susceptibility genes, HLA DRB1*0103 and the multidrug resistance gene 1 (MDR1/ABCB1) were also identified as being associated with extensive and severe disease [17, 23–37].

In UC, all genotype–phenotype association studies focus on genes which have previously demonstrated association with increased susceptibility to the disease [5, 17]. Thus, as *NOD2* has not been generally linked with UC susceptibility, there are no published studies of potential associations between *NOD2* genotype and UC phenotype [5]. However, this reasoning may produce a bias because a gene can be associated with a particular phenotype despite not being related with increase susceptibility to the disease. For example, Seghal et al. demonstrated that *NOD2* variants are associated with severe pouchitis, although these mutations do not increase the overall risk of pouchitis [20].

Taking this data into account, this paper aimed to clarify if *NOD2* mutations increased susceptibility to UC in Portugal and whether there are genotype–phenotype correlations in these patients. To our knowledge, this is the first study that sought potential associations between *NOD2* mutations and phenotype, natural history or therapeutic responsiveness in patients with UC.

In line with the evidence from the majority of previous studies, we found that *NOD2* mutations are not linked with increased susceptibility to UC in the Portuguese population [5, 10, 50].

In the study population, we found that there were no associations between *NOD2* mutations and demographic characteristics (age at onset, gender, and family history of IBD) or smoking habits. Similarly, the disease extent showed no correlation with *NOD2* mutation status.

Regarding the disease course during the first year following diagnosis, we found that patients with a mutation of the studied gene were more likely to receive steroids for a disease

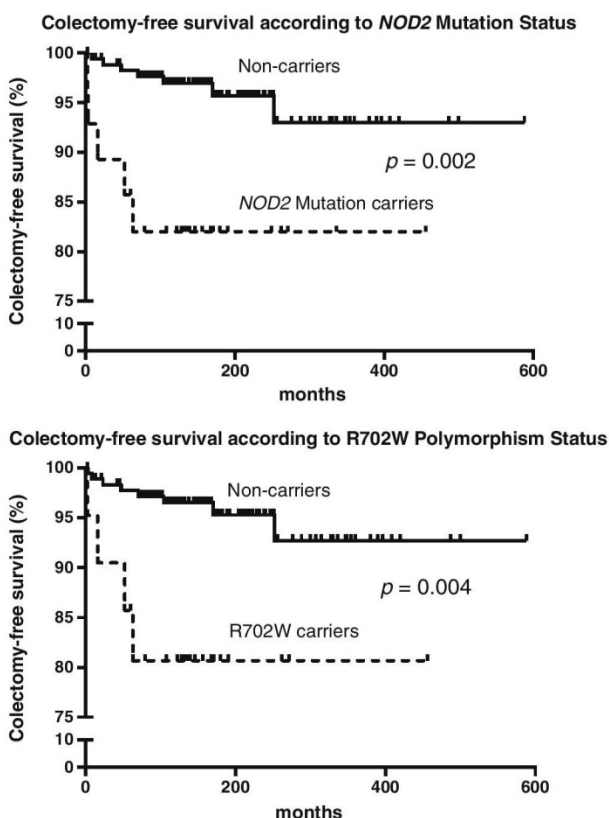


Fig. 2 Cumulative colectomy-free survival in patients with and without *NOD2* mutation and R702W polymorphism

flare (54.2 vs. 29.6 %, $p=0.018$). Among patients who required steroids in this setting, the need for intravenous administration was significantly more frequent in those with the R702W polymorphism (90.0 % vs. 45.5 %, $p=0.014$).

According to our results, there was no association of any genotype with the incidence of severe colitis, defined as a flare with severe activity according Truelove and Witts criteria and requiring admission and treatment with intravenous steroids [54, 59]. Nevertheless, *NOD2* mutations were significantly associated with intravenous-steroid refractoriness and, hence, with the need for salvage therapy with cyclosporine, infliximab, or colectomy ($p=0.004$). By contrast, *NOD2* carrier status was not associated with the response to medical salvage therapy and therefore with the need for salvage colectomy, but the small number of patients with these events advises a careful interpretation.

In addition to severe colitis episodes, the course of UC can be indirectly evaluated through the therapeutic needs and responses, including steroid-dependence, steroid-resistance, need of immunosuppressive/immunomodulatory agents and colectomy rates. In our study cohort, even though the combined three key *NOD2* mutations were not associated with steroid-dependence or steroid-resistance, we found that carriers of the R702W polymorphism were more often resistant to steroids ($p=0.027$). The need for immunosuppressants/immunomodulators showed no significant associations with *NOD2* mutations, even when R702W polymorphism was considered separately. However, both, R702W polymorphism alone and 3020insC/R702W/G908R variants together, were associated with increased need of colectomy (respectively, $p=0.026$ and $p=0.015$).

The age at diagnosis and the extent of disease are frequently and consistently identified as prognostic factors in UC [57]. In this context, the significant associations found between *NOD2* gene and UC phenotype characteristics, were included in a multivariate analysis using age at diagnosis and extent of disease as covariates. This evaluation has shown that the *NOD2* prognostic value detected in our work is independent of these two important variables.

Our data suggests that although *NOD2* genotype does not correlate with susceptibility to UC, the mutations of this gene appear to be associated with a more aggressive course of the disease. Similar findings were reported in CD, where *NOD2* carrier status has been associated not only with a more aggressive disease phenotype but also to an increased likelihood of steroid refractoriness and a higher need for surgery [5, 9, 10, 38–49].

Surprisingly, apart from our work, there is no other study regarding potential *NOD2* genotype–phenotype correlations in UC patients. Thus, further data from different and larger populations is needed to determine whether *NOD2* mutations lead to a predisposition to a more aggressive UC disease course and, if so, to identify the additional determinants

necessary for this increased susceptibility, namely their possible interactions with other genes, environmental factors, clinical features, and demographic data. A thorough investigation of these issues may improve knowledge of the disease pathophysiology, can shed light on the determinants of clinical UC heterogeneity and could lead to the development of new therapeutic paradigms.

This study has some limitations. Firstly, the size of the study population is relatively small. Secondly, the potential effect of other genetic and/or environmental factors and/or their interaction with *NOD2* mutations has not been evaluated. Thirdly, disease course, treatment requirements and response/remission rates were evaluated retrospectively. Finally, this work was performed in a teaching and referral hospital and therefore our results may not be applicable to institutions with different patient populations.

In conclusion, our study suggests that even though *NOD2* mutations do not confer an increased risk of UC in the Portuguese population, these genetic variants are associated with a more aggressive course of the disease, including greater need of steroids in the first year, increased incidence of intravenous-steroid refractoriness and a higher rate of colectomy. This is the first study that demonstrated a link between *NOD2* genotype and UC phenotype. Regional heterogeneity within the *NOD2* genotype in UC patients shows the importance of the genetic assessment and evaluation of its correlation with the phenotype in different populations [4, 5, 10, 12–15, 50]. In addition, other potential genetic predictors and detailed information about environmental exposure should be assessed in future studies, because the low-penetrance genetic effects of common SNPs may largely depend on interaction with other determinant factors. Hence, additional research, using larger patient groups as well as other populations and with the assessment of additional genetic and environmental factors, is required in order to unequivocally determine the role of *NOD2* variants in UC heterogeneity. This investigation will be essential to validate our data, to provide the rationale for identifying objective predictors of disease course and that could, ultimately, be an important step toward a personalized therapy in UC patients.

Acknowledgments This study was supported by research grants awarded by: Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/SINTD/60055/2009), Fundação Glaxo Smith Kline das Ciências da Saúde, Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Programa de Estímulo à Investigação, En 2011) and Centro de Estudos Ibéricos. These institutions had no role in any phase of this study.

We acknowledge all our colleagues who referred cases, and the patients for generously participating in the research. We thank Dr. Jorge Tomaz and Dr. Ana Esesúmagá for providing biological material (whole blood) from blood donors. We are indebted to Carlos Alberto for this expert technical assistance.

Conflicts of interest/disclosure The authors have no potential conflicts of interest.

References

- Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347:417–429
- Brant SR (2013) Promises, delivery, and challenges of inflammatory bowel disease risk gene discovery. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11:22–26
- Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY et al (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491:119–124
- Waterman M, Xu W, Stempak JM, Milgrom R, Bernstein CN, Griffiths AM et al (2011) Distinct and overlapping genetic loci in Crohn's disease and ulcerative colitis: correlations with pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 17:1936–1942
- Cho JH, Brant SR (2011) Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 140:1704–1712
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J et al (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599–603
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R et al (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:603–606
- Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T et al (2003) Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 124:140–146
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S et al (2001) Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357:1925–1928
- Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S et al (2002) CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 70:845–857
- Heliö T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U et al (2003) CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 52:558–562
- Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A et al (2005) Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 11:681–685
- Pugazhendhi S, Santhanam S, Venkataraman J, Creveaux I, Ramakrishna BS (2013) NOD2 gene mutations associate weakly with ulcerative colitis but not with Crohn's disease in Indian patients with inflammatory bowel disease. *Gene* 512:309–313
- Yun J, Xu CT, Pan BR (2009) Epidemiology and gene markers of ulcerative colitis in the Chinese. *World J Gastroenterol* 15:788–803
- Juyal G, Amre D, Midha V, Sood A, Seidman E, Thelma BK (2007) Evidence of allelic heterogeneity for associations between the NOD2/CARD15 gene and ulcerative colitis among North Indians. *Aliment Pharmacol Ther* 26:1325–1332
- Niess JH, Klaus J, Stephani J, Pflüger C, Degenkolb N, Spaniol U et al (2012) NOD2 polymorphism predicts response to treatment in Crohn's disease—first steps to a personalized therapy. *Dig Dis Sci* 57:879–886
- Haritunians T, Taylor KD, Targan SR, Dubinsky M, Ippoliti A, Kwon S et al (2010) Genetic predictors of medically refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 16:1830–1840
- Beaugerie L, Seksik P, Nion-Lamurier I, Gendre JP, Cosnes J (2006) Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology* 130:650–656
- Loly C, Belaiche J, Louis E (2008) Predictors of severe Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 43:948–954
- Sehgal R, Berg A, Hegarty JP, Kelly AA, Lin Z, Poritz LS et al (2010) NOD2/CARD15 mutations correlate with severe pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis. *Dis Colon Rectum* 53:1487–1494
- Adamiak T, Walkiewicz-Jedrzejczak D, Fish D, Brown C, Tung J, Khan K et al (2013) Incidence, clinical characteristics, and natural history of pediatric IBD in Wisconsin: a population-based epidemiological study. *Inflamm Bowel Dis* 19:1218–1223
- Sjöberg D, Holmström T, Larsson M, Nielsen AL, Holmquist L, Ekblom A et al (2013) Incidence and natural history of ulcerative colitis in the Uppsala Region of Sweden 2005–2009—results from the IBD Cohort of the Uppsala Region (ICURE). *J Crohns Colitis* 7(9):e351–e357
- Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S et al (1997) Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 112:1845–1853
- Bouma G, Crusius JB, García-González MA, Meijer BU, Hellems HP, Hakvoort RJ et al (1999) Genetic markers in clinically well defined patients with ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 115:294–300
- de la Concha EG, Fernandez-Arquero M, Lopez-Nava G, Martin E, Allcock RJ, Conejero L et al (2000) Susceptibility to severe ulcerative colitis is associated with polymorphism in the central MHC gene IKBL. *Gastroenterology* 119:1491–1495
- Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Ruiz-Morales JA, Higuera L, Cutiño T et al (2003) Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol* 64:119–123
- Ahmad T, Armuzzi A, Neville M, Bunce M, Ling KL, Welsh KI et al (2003) The contribution of human leucocyte antigen complex genes to disease phenotype in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 62:527–535
- Fernández L, Núñez C, Mendoza JL, Urcelay E, Fernández-Arquero M, Taxonera C et al (2005) A recombinant haplotype in the major histocompatibility region contains a cluster of genes conferring high susceptibility to ulcerative colitis in the Spanish population. *Inflamm Bowel Dis* 11:785–791
- Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D, Reddy DM, Bonen DK, Karaliukas R et al (2003) MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 73:1282–1292
- Ho GT, Gaya DR, Satsangi J (2005) Multidrug resistance (MDR1) gene in inflammatory bowel disease: a key player? *Inflamm Bowel Dis* 11:1013–1019
- Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, Tenesa A, Goldstein DB, Satsangi J (2006) ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a genome-wide haplotype tagging approach. *Hum Mol Genet* 15:797–805
- Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott NJ et al (2008) Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet* 40:710–712
- Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G et al (2008) Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 40:1319–1323
- Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, McGovern DP, Wu J, Anness V et al (2009) Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* 41:216–220
- Anderson CA, Massey DC, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Fisher SA et al (2009) Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship. *Gastroenterology* 136:523–529

36. Yang H, Rotter JI, Toyoda H, Landers C, Tyrann D, McElree CK et al (1993) Ulcerative colitis: a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA class II) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers. *J Clin Invest* 92:1080–1084
37. Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ (1999) HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 45:395–401
38. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ et al (2002) Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 123:679–688
39. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR et al (2002) The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 122:854–866
40. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ et al (2002) The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122:867–874
41. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S et al (2002) Association of NOD2 (CARD15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 359:1661–1665
42. Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A et al (2002) CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 71:74–83
43. Oostenbrug LE, Nolte IM, Oosterom E, van der Steege G, te Meerman GJ, van Dullemen HM et al (2006) CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: an association study and pooled analysis. *Dig Liver Dis* 38:834–845
44. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, Balogh M, Szípcos I, Kamaras G et al (2004) Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977–2001. *World J Gastroenterol* 10:404–409
45. Newman B, Siminovitch KA (2005) Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 21:401–407
46. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK (2003) CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124:993–1000
47. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Herrmann K et al (2006) Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007 fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* 41:1421–1432
48. Seiderer J, Brand S, Herrmann KA, Schnitzler F, Hatz R, Crispin A et al (2006) Predictive value of the CARD15 variant 1007 fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm Bowel Dis* 12:1114–1121
49. Henckaerts L, Van Steen K, Verstreken I, Cleynen I, Franke A, Schreiber S et al (2009) Genetic risk profiling and prediction of disease course in Crohn's disease patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 7:972–980
50. Rigoli L, Romano C, Caruso RA, Lo Presti MA, Di Bella C, Procopio V et al (2008) Clinical significance of NOD2/CARD15 and Toll-like receptor 4 gene single nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14:4454–4461
51. Lennard-Jones JE (1989) Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 170:2–6, discussion 16–9
52. Sands BE (2004) From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 126:1518–1532
53. Podolsky DK (1991) Inflammatory bowel disease (2). *N Engl J Med* 325:1008–1016
54. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K et al (2012) Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 6:965–990
55. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel JF, Allez M et al (2012) Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J Crohns Colitis* 6:991–1030
56. Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B, Danese S, Gionchetti P, Moser G et al (2013) Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations. *J Crohns Colitis* 7:1–33
57. Zallot C, Peyrin-Biroulet L (2012) Clinical risk factors for complicated disease: how reliable are they? *Dig Dis* 30:67–72
58. Truelove SC, Witts LJ (1955) Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 2:1041–1048
59. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF (2006) The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 55:749–753

PARTE II

NEOPLASIA DO CÓLON NA COLITE ULCEROSA

SECÇÃO 1

REVISÃO DA LITERATURA

ABREVIATURAS POR ORDEM ALFABÉTICA

ALM - *Adenoma-like masse*

ACG - *American College of Gastroenterology*

AGA - *American Gastroenterological Association*

AUDC – *Ácido ursodesoxicólico*

BSG - *British Society of Gastroenterology*

CCR – *Cancro colo-rectal*

CEP – *Colangite esclerosante primária*

CU – *Colite ulcerosa*

DALM - *Dysplasia-associated lesion or mass*

DII – *Doença inflamatória intestinal*

ECCO - *European Crohn's and Colitis Organization*

EMC – *Endomicroscopia confocal*

FICE - *Fuji Intelligent Chromoendoscopy*

HR - *Hazard ratio*

IC - *Intervalo de confiança*

MRR - *Mortality rate ratio*

NBI - *Narrow band imaging*

NIE – *Neoplasia intra-epitelial*

OR – *Odds ratio*

RR – *Risco relativo*

CAPÍTULO 6. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA NEOPLASIA DO CÓLON NA COLITE ULCEROSA (CU)

6.1. MAGNITUDE DO RISCO

A primeira descrição de cancro colo-rectal (CCR) como complicação da CU foi efectuada por Crohn e Rosemberg em 1925 [1]. A partir daí, vários trabalhos se debruçaram sobre este assunto, detectando magnitudes de associação variáveis. Embora apenas 0,5-2% da totalidade dos CCRs esteja associado à doença inflamatória intestinal (DII), estima-se que o CCR seja responsável por 10-15% das mortes dos doentes com DII [2-5].

No início da década de 1990 Ekblom e col. publicaram um estudo de base populacional envolvendo 3117 doentes com CU diagnosticada entre 1922 e 1983, detectando CCR em 91 desses doentes, o que se traduziu num risco 5,7 [intervalo de confiança (IC) 95%: 4.6 – 7,0] vezes superior ao da população geral [6].

Em 2001 foi publicada uma meta-análise liderada por Eaden, trabalho que analisou 116 estudos, incluindo 54478 doentes, dos quais 1698 com CCR. A prevalência global de CCR foi de 3,7%, sendo de 5,4% nos casos de pancolite [7]. Levando em linha de conta o tempo de evolução da doença, o risco cumulativo de CCR foi de 2% após 10 anos, 8% após 20 anos e 18% após 30 anos de evolução da CU [7]. Este trabalho é, até à data, muito provavelmente, o mais citado em termos de referências à magnitude do risco de CCR em doentes com CU. Não obstante, é preciso salientar a marcada heterogeneidade da origem dos estudos analisados, incluindo centros de referência, estudos de base populacional, séries cirúrgicas, séries de rastreio e coortes de medicina privada [7].

Sucederam-se vários trabalhos, descritos a seguir, que não replicaram estes resultados em termos da magnitude do risco, sugerindo que o risco de CCR na CU terá diminuído ao longo das últimas décadas ou é, simplesmente, inferior ao que se acreditava anteriormente. Estes novos dados vieram, na verdade, consubstanciar o cepticismo de vários clínicos que, à data, se intrigavam com facto de não encontrarem na sua prática clínica correspondência para o elevado risco de CCR associado à CU relatado na literatura.

Bernstein e col. desenvolveram um amplo estudo de base populacional em Manitoba (Canadá), de carácter retrospectivo, incluindo uma coorte de 2672 doentes com CU diagnosticada entre 1984 e 1997, com um seguimento global de 19655 doentes-anos, detectando um risco anual de CCR da ordem de 0,16% e um risco aumentado, em termos globais, em comparação com a população geral, da ordem de 2,75 (IC 95%: 1,91-3,97) [8].

Um trabalho proveniente do Hospital de St. Mark (Reino Unido) e liderado por Rutter reportou a experiência deste grupo resultante dum programa de rastreio de neoplasia que envolveu 600 doentes com CU durante um período de 30 anos, com um seguimento global de 5932 doentes-anos, que permitiu identificar

uma incidência cumulativa de CCR de 2,5% após 20 anos, 7,6% após 30 anos e 10,8% após 40 anos de doença, valores significativamente superiores ao do risco de CCR na população geral, em modelos ajustados à idade [9].

Num estudo de base populacional levado a cabo na Hungria, foram estudados 723 doentes com CU com um seguimento global de 8564 doentes-anos, identificando-se uma incidência anual de CCR de 0,15% e uma incidência cumulativa de 0,6% aos 10 anos, 5,4% aos 20 anos e 7,5% aos 30 anos de doença [10]. A análise destes dados deve, contudo, ter em linha de conta que a Hungria apresenta uma elevada prevalência de CCR esporádico e uma baixa taxa de colectomia em contexto não neoplásico [10,11].

Num pequeno estudo de base populacional proveniente do condado de Olmsted (Estados Unidos), Jess e col. avaliaram 378 doentes com CU diagnosticada entre 1940 e 2001 e, num seguimento global de 5567 doentes-anos, detectaram apenas 6 casos de CCR, traduzindo-se numa incidência anual de 0,1% e numa incidência cumulativa de 2% após 30 anos de doença, ou seja, sem diferença significativa relativamente à população sem DII [12].

No mesmo sentido aponta uma coorte dinamarquesa de base populacional constituída por 1160 doentes, na qual os autores detectaram um risco anual de CCR de apenas 0,06% e uma incidência cumulativa após 30 anos de doença de 2,1%, valores que não assumiram diferença significativa em comparação com os que caracterizam o risco de CCR na população geral [13]. Importa, contudo, salientar que a taxa de colectomia por CU na Dinamarca é, entre as reportadas, das mais altas, facto que pode, pelo menos em parte, explicar o baixo risco de CCR nessa população [13].

Em 2009, Söderlund e col. avaliaram uma coorte sueca de base populacional composta por 4125 doentes com CU diagnosticada entre 1954 e 1989, na qual detectaram um risco relativo (RR) de CCR, em comparação com o da população geral, de 2,7 (IC 95%: 2,3-3,2) [14].

Mais recentemente, foi estudada uma vasta coorte de origem dinamarquesa, composta por 32911 doentes com CU diagnosticada ao longo de um período de 30 anos, revelando que esses doentes, em comparação com a população sem DII, apresentavam um risco de CCR de 1,07 (IC 95%: 0,95-1,21), ou seja, uma diferença sem significado estatístico [15].

Uma meta-análise de estudos de base populacional, incluindo 8 trabalhos e envolvendo um total de 10350 doentes com um seguimento médio de 14 anos (7-24 anos) foi publicada em 2012. O RR de CCR nos doentes analisados, em comparação com o da população sem DII, foi, em termos globais, de 2,4 (IC 95%: 2,1-2,7), e, tendo em consideração o tempo de evolução da doença, foi <1% após 10 anos, 0,4%-2% após 15 anos e 1,1%-5,3% após 20 anos de evolução da DII [16].

Mais recentemente, em 2013, foi publicada outra meta-análise, cujo desenho, critérios de inclusão e exclusão, análise grupal e trabalho estatístico foram levados a cabo com especial propriedade [17]. O RR de

CCR, em comparação com o da população geral, foi de 1,7 (IC 95%: 1,03-2,4) na análise efectuada a partir estudos de base populacional e de 8,3 (IC 95%: 5,9-10,7) na avaliação restrita aos trabalhos provenientes de centros de referência [17]. Em termos cumulativos e considerando a globalidade dos estudos (populacionais e de centros de referência) o RR de CCR, em comparação com o da população sem DII, foi de 0,7 (IC 95%: 0,4-1,4) na CU com <10 anos, 1,9 (IC 95%: 0,8-4,7) na CU com 10-20 anos e 4,2 (IC 95%: 1,3-13,8) na CU com > 20 anos de evolução [17].

A menor magnitude do risco de CCR associado à CU reportada pelos estudos mais recentes poderá dever-se a uma plethora de factores: emergência de terapêuticas mais eficazes no controlo da inflamação, maior adesão à terapêutica de manutenção, desenvolvimento e implementação de programas de rastreio, mas pode resultar, também, pelo menos parcialmente, da base de recrutamento predominantemente populacional e do refinamento da qualidade dos estudos, tanto em termos de critérios de inclusão como no que se refere à análise estatística. Assim, é lícito colocar a questão se há ou não, efectivamente, uma real diminuição do risco de CCR, em termos temporais, nos doentes com CU. Há 4 estudos que incluem dados interessantes e que permitem, de forma mais ou menos directa, responder a esta questão. Rutter e col. verificaram, na sua série de três décadas de rastreio de CU, através de regressão linear, um decréscimo significativo ao longo do tempo no que diz respeito a neoplasias proximais ao ângulo esplénico, não encontrando a mesma relação no que concerne às neoplasias distais a esse limite [9]. Na coorte de base populacional reportada por Jess e col., que incluiu doentes com DII diagnosticada entre 1940 e 2001, os autores verificaram que todos os casos de CCR detectados correspondiam a doentes com diagnóstico de DII efectuado antes de 1980, mas, ainda assim, essa diferença não foi suficiente para atingir significado estatístico, muito provavelmente em consequência da amostra relativamente pequena e, também, da baixa incidência global de CCR [12]. Söderlund e col., avaliaram o RR de CCR ao longo de várias décadas num estudo de base populacional envolvendo 7607 doentes com DII diagnosticada entre 1954 e 1989, cujo seguimento foi efectuado até 2004 [14]. O RR de CCR, em comparação com o da população geral, foi de 5,4 (IC 95%: 2,2-11,0) entre 1960-1969, 3,0 (IC 95%: 2,0-4,4) entre 1970-1979, 2,4 (IC 95%: 1,8-3,1) entre 1980-1989, 2,1 (IC 95%: 1,6-2,7) entre 1990-1999 e 1,8 (IC 95%: 1,3-2,5) entre 2000-2004, representando diferenças com significância estatística ($p = 0,006$) [14]. Mais recentemente, em 2012, foram reportados os resultados dum estudo que avaliou o risco de CCR ao longo dum período de 30 anos numa coorte dinamarquesa composta por 32911 doentes com CU e com um seguimento global de 178 milhões doentes-anos [15]. O RR de CCR, em comparação com o da população geral, foi de 1,34 (IC 95%: 1,13-1,58), 1,09 (IC 95%: 0,90 -1,33) e 0,57 (IC 95%: 0,41-0,80) em doentes com CU diagnosticada entre 1979-1988, 1989-1998 e 1999-2008, respectivamente. Essa tendência de decréscimo do risco de CCR ao longo das três décadas avaliadas manteve-se quando a análise foi efectuada levando em linha de conta a idade de diagnóstico e o tempo de evolução da doença [15].

Acresce que existe, também, heterogeneidade geográfica do risco de CCR associado à CU. A título de exemplo refira-se que esse risco é maior nos estudos provenientes dos Estados Unidos e do Reino Unido em

comparação com os resultados dos trabalhos escandinavos [9,12,13,15]. Para essa diferença podem concorrer, simultaneamente, diversos factores, tais como: diferenças ambientais, particularidades genéticas, abordagens terapêuticas médicas e/ou cirúrgicas diversas e políticas de rastreio dissimilares.

6. 2. FACTORES DE RISCO

6.2.1. Duração da doença

É elemento consensual o facto do risco de CCR associado à CU aumentar com o incremento da duração da doença. No item anterior, referente ao risco de CCR na CU, mencionaram-se vários estudos, incluindo meta-análises, que reflectem essa correlação e que revelaram que o risco de CCR é baixo até aos 8-10 anos de doença, limite que é, por esse motivo, usado para iniciar os programas de rastreio [7,9,10,16,17].

Pela qualidade e clareza de apresentação de dados, importa, neste contexto, salientar os resultados da última meta-análise publicada em 2013. Considerando apenas os estudos de base populacional o risco cumulativo de CCR foi de 0,8%, 2,2% e 4,5% para doença com duração < 10 anos, 10-20 anos e > 20 anos, respectivamente. Para os mesmos tempos de evolução da CU o risco cumulativo calculado a partir dos estudos de centros de referência foi de 0,6%, 11,4% e 43,4%, respectivamente. Considerando a globalidade dos estudos e fazendo a análise de acordo com esses mesmo intervalos de duração da doença, o risco acumulado de CCR revelou ser 0,7%, 2,6% e 6,6%, respectivamente [17].

Um estudo retrospectivo de origem holandesa, publicado em 2008, pesquisou, através duma base de dados de carácter nacional, os casos de CCR associado a DII diagnosticados entre 1990 e 2006. Dos 149 casos identificados, os autores verificaram que 22% tinham ocorrido antes do tempo de evolução de doença geralmente recomendado para iniciar o rastreio, ou seja, 8 anos na colite extensa e 15 anos na colite esquerda. Esses resultados, claramente dissonantes dos restantes trabalhos, foram alvo de crítica devido ao modo de selecção e identificação dos doentes incluídos no estudo o que poderá ter introduzido, na respectiva análise, um importante viés [18].

6. 2.2. Extensão da doença

Tal como foi dito relativamente à duração da doença, também a extensão da CU é, consensualmente, considerada um importante factor de risco para CCR. Estas duas características são, por isso, na maioria dos doentes, os elementos determinantes na definição da necessidade e do momento de início do programa de rastreio.

A evidência generalizada é de que quanto maior a extensão da CU maior o risco de CCR, sendo esse risco baixo ou inexistente na proctite, moderado na colite esquerda e elevado na colite extensa. A título de

exemplo, num estudo de base populacional de origem sueca, o RR de CCR na CU, em comparação com o da população geral, foi de 14,8 (IC 95%: 11,4-18,9) na colite extensa, 2,8 (IC 95%: 1,6-4,4) na colite esquerda e 1,7 (IC 95%: 0,8-3,2) na proctite [6].

Na meta-análise de Lutgens e col. o RR de CCR associado à CU extensa, em comparação com o da população geral, foi de 6,9 (IC 95%: 1,9-11,9) nos estudos de base populacional e de 21,6 (IC 95%: 15,0-31,0) nos estudos provenientes de centros de referência [17]. A mesma avaliação dirigida à colite esquerda revelou RR de 1,7 (IC 95%: 0,6-4,5) e de 2,0 (IC 95%: 1,01-4,1), respectivamente. O dado novo e curioso resultante desta avaliação é o de que, em termos populacionais, a CU esquerda não se associa a risco aumentado de CCR [17].

A ileíte retrógrada, como acompanhante de alguns casos de pancolite, foi aventada e estudada como potencial marcador de risco aumentado de CCR na CU. Esta questão foi avaliada em dois estudos que obtiveram resultados discordantes deixando, por isso, a contenda em aberto. Num dos trabalhos, liderado por Heuschen, avaliaram-se, prospectivamente, 590 doentes consecutivos com CU submetidos a proctocolectomia [19]. Os autores verificaram que nos doentes com ileíte retrógrada a incidência de CCR era três vezes superior (29% vs. 9%) e que esses doentes apresentavam, também, maior incidência de neoplasias múltiplas (45% vs. 24%) [19]. Não obstante, algumas limitações metodológicas, nomeadamente a não utilização de critérios anátomo-patológicos estritos, suscitou a dúvida sobre a eventual inclusão de casos que podiam corresponder, na verdade, a doença de Crohn e não a CU, circunstância que, naturalmente, introduz algumas reservas na interpretação desses resultados [19]. No outro trabalho, publicado mais recentemente, foi utilizado um desenho de estudo semelhante mas usando uma avaliação anátomo-patológica mais rigorosa [20]. Nesse trabalho, que incluiu 200 doentes, a incidência de neoplasia não foi significativamente superior nos doentes com ileíte retrógrada (3% vs. 2%) [20].

6.2.3. Colangite esclerosante primária (CEP)

A associação entre CEP e CU foi identificada, pela primeira vez, em 1965 por Smith e Loe [21]. Cerca de 2-5% dos doentes com CU têm também ou virão a ter CEP [22].

A hipótese do risco de CCR ser particularmente elevado nos doentes que, além de CU, têm também CEP, foi levantada, originalmente, por um artigo publicado por Broomé e col. em 1992 [23]. O mesmo autor liderou uma equipa que, três anos mais tarde, levou a cabo um estudo caso-controlo em que o risco cumulativo de CCR foi identificado como sendo de 9% vs. 2%, 31% vs. 5% e 50% vs. 10% após 10, 20 e 25 anos de colite em doentes com CU e CEP vs. doentes apenas com CU, respectivamente ($p < 0,001$) [24].

Volvidos dois anos, Kornfeld e col., num estudo de base populacional, identificaram um risco cumulativo de CCR em doentes com CU e CEP de 33% e 40% após 20 anos e 40 anos de colite, respectivamente [25].

Vários outros estudos confirmaram que a agremiação de CEP a CU se associava a um risco especialmente elevado de CCR [26-30].

Não obstante, num estudo caso-controlo liderado por Loftus verificou-se que o risco RR de CCR em doentes com CU e CEP não se encontrava significativamente aumentado [31]. Um outro estudo com um desenho semelhante, proveniente da Clínica Mayo, chegou à mesma conclusão, ou seja, inexistência de risco de CCR significativamente aumentado em doentes com CU e CEP em comparação com os que apenas tinham CU [*Odds ratio (OR)* = 1,23; IC 95%: 0,62-2,42] [32].

Neste contexto, em 2002, Soeketino e col. levaram a cabo uma meta-análise que incluiu 11 estudos e em que se identificou um risco aumentado de CCR nos doentes com CU e CEP em comparação com os doentes apenas com CU (*OR* = 4.09; IC 95%: 2,89-5,76) [33].

Mais recentemente, um amplo estudo de origem dinamarquesa denotou um risco de CCR em doentes com CU e CEP bastante superior ao dos doentes com CU sem CEP (RR = 9,13; IC 95%: 4,52-18,5) [15].

Curiosamente, o risco de CCR em doentes com CU e CEP permanece elevado mesmo após transplante hepático, mantendo-se a necessidade de vigilância endoscópica apertada nesses doentes [34-37].

O CCR em doentes com CU e CEP tem, em comparação com os casos em doentes com CU sem CEP, várias particularidades: marcada predilecção pelo cólon direito, histologia mais indiferenciada e diagnóstico em estádios mais avançados [15,28,29,38,39].

6.2.4. Displasia/neoplasia intra-epitelial (NIE)

A displasia/NIE representa um óbvio e bem identificado factor de risco, histologicamente definido, de CCR [40-45]. A abordagem destas lesões depende das suas características histológicas (baixo ou alto grau), morfologia, número e potencial ressecabilidade endoscópica, indo da intensificação da vigilância até à colectomia, passando pela ressecção endoscópica. A abordagem terapêutica por via endoscópica é, neste âmbito, como se discute adiante, uma opção crescente. Neste contexto, a história de displasia tem emergido como um forte factor de risco para displasia em avaliações posteriores justificando, por isso, uma vigilância especialmente apertada [46,47].

6.2.5. História familiar

Num estudo caso-controlo proveniente da Clínica Mayo e que incluiu 297 doentes, verificou-se que a história familiar de CCR esporádico era duas vezes mais comum nos doentes com colite e CCR do que nos doentes com CU sem CCR, em modelo ajustado para a extensão e duração da colite [48]. Askling e col. levaram

a cabo um estudo de base populacional envolvendo 19876 doentes com DII e verificaram que a história familiar de CCR se associava a um RR de CCR que era mais do dobro que o dos doentes sem esse antecedente (2,5; IC 95%: 1,4-4,4). Nesse mesmo trabalho os autores verificaram ainda que esse risco era significativamente maior nos doentes em que a história familiar incluía diagnóstico de CCR em parente de primeiro grau com menos de 50 anos (RR = 9,2; IC 95%: 3,7-23) [49]. Mais recentemente, numa coorte retrospectiva, uma equipa liderada por Velayos também identificou a história familiar de CCR como um importante factor de risco para CCR em doentes com CU (OR = 3,7; IC 95%: 1,0-13,2) [50].

Não obstante, a existência de história familiar de DII em parente de primeiro grau não representa, por si só, risco acrescido de CCR [49].

6.2.6. Idade de início da doença

Num estudo publicado há mais de 3 décadas, os autores verificaram que o risco de CCR era superior em doentes com DII diagnosticada após os 30-40 anos em comparação com aqueles em que a doença tinha sido detectada antes dos 20 anos de idade [51].

No início da década de 1990, Ekblom e col. publicaram os resultados da análise de uma coorte de base populacional composta por 3117 doentes, tendo verificado que o risco cumulativo de CCR em doentes com colite extensa com pelo menos 35 anos de evolução era de 40% nos doentes em que a CU tinha tido início antes dos 15 anos e de 25% naqueles em que a doença havia eclodido entre os 15 e os 39 anos de idade [6].

Em 2006 Rutter e col. divulgaram os resultados da sua série de 30 anos de rastreio endoscópico na CU, constatando que os doentes diagnosticados com CCR tinham uma idade de início da CU superior à dos doentes em que não se tinha detectado CCR [9].

Mais recentemente, nomeadamente numa meta-análise publicada em 2013, o efeito da idade de diagnóstico da DII no risco de CCR foi avaliado, separadamente, a partir de estudos de base populacional e de centros de referência. Assim, restringindo a análise aos estudos populacionais, o RR de CCR, em comparação com o da população geral, foi de 8,2 (IC 95%: 1,8-14,6) e de 1,8 (IC 95%: 0,9-2,7) consoante o diagnóstico de DII havia sido estabelecido antes ou depois dos 30 anos de idade, respectivamente. Na análise limitada aos centros de referência esse mesmo risco foi de 70,7 (IC 95%: 15,6-320,9) e de 5,5 (IC 95%: 2,0-14,9) na DII diagnosticada, respectivamente, antes ou depois dos 25 anos de idade [17].

Da análise dos parágrafos anteriores facilmente se depreende que a evidência relativa ao potencial efeito da idade de início da DII no risco de CCR não só não é unânime como é até, de certa maneira, contraditória. Apesar dos dados mais robustos serem a favor da DII com início em idade jovem se associar a maior risco de CCR, a verdade é que a DII com início precoce se junte também, geralmente, a doença mais extensa e mais grave (com maior carga inflamatória), não sendo possível excluir que sejam esses elementos, e

não a idade cronológica de início da doença, os responsáveis pelo maior risco de CCR [52-54]. Acresce que uma doença com início mais precoce terá também, naturalmente, possibilidade de evoluir durante mais tempo, sendo sabido que a duração da doença é um importante factor de risco para CCR na DII [52-54].

Outra vertente da questão, igualmente não consensual, diz respeito ao potencial efeito da idade de diagnóstico da DII no momento de eclosão do CCR. Winter e col. verificaram que o tempo que mediou entre o diagnóstico de CU e o aparecimento de CCR foi semelhante independentemente da idade de diagnóstico da colite [13]. Já no estudo publicado por Karvellas e col. a média de duração da CU até ao aparecimento de CCR foi de 22 anos nos doentes com CU diagnosticada antes dos 40 anos e de 10 anos naqueles em que a colite teve início após a 4ª década de vida ($OR = 11,5$; IC 95%: 2,41-20,16; $p = 0,00029$) [55]. No mesmo sentido apontam os resultados do trabalho liderado por Baars, que revelaram a existência de correlação entre o diagnóstico de CU em idade mais avançada e o aparecimento mais precoce de CCR [56].

6.2.7. Inflamação

A identificação da gravidade da inflamação como factor de risco para CCR na CU foi efectuada, pela primeira vez, em 2004 por um grupo do hospital de St. Mark [57]. Os autores efectuaram um estudo caso-controlo que envolveu 68 casos de CU com CCR e verificaram, em análise univariada, a existência de correlação significativa entre a inflamação, quer endoscópica ($OR: 2,5$; $p < 0,001$) quer histológica ($OR: 5,1$; $p < 0,001$), e o risco de CCR [57]. Na análise multivariada, manteve-se o significado estatístico da inflamação histológica ($OR: 4,7$; $p < 0,001$) [57]. Dois trabalhos posteriores identificaram, igualmente, a inflamação histológica como um factor de risco para CCR na CU [58,59]. De forma complementar, num outro trabalho a cicatrização da mucosa foi associada a uma diminuição do risco de CCR [60]. No mesmo sentido aponta, de modo indirecto, a evidência de que a utilização de imunossuppressores e imunomoduladores se correlaciona com redução do risco de CCR [59,61]. Não obstante, alguns estudos não encontraram correlação entre a actividade da DII e o risco de CCR [10,21].

Vários trabalhos têm associado os pseudopólipos a um risco aumentado de CCR na CU [50,60,62]. Os pseudopólipos não têm, *per se*, potencial maligno, pelo que o risco aumentado de CCR que lhes está associado advém do facto de serem marcadores de inflamação prévia grave e/ou de dificultarem a identificação de lesões durante o rastreio. Áreas de inflamação grave e estenoses cólicas também foram associadas a aumento do risco de CCR [57,63,64].

6.2.8. Aminossalicilatos

Os aminossalicilatos são usados como terapêutica de manutenção na CU. Estudos *in vitro* verificaram que esses fármacos inibem a via do factor nuclear κ B, o qual se encontra envolvido na inflamação crónica e na sobrevivência tumoral [65-67].

A primeira evidência clínica do potencial efeito quimiopreventivo dos aminossalicilatos contra o CCR associado à CU foi publicada por Pinczowski e col. em 1994 [68]. Num estudo caso-controlo, os investigadores compararam 102 doentes com CU e CCR com um grupo controlo constituído por 196 doentes com CU sem CCR e verificaram que o tratamento com sulfassalazina ou corticóides durante pelo menos 3 meses se associava a um efeito protector contra o desenvolvimento de CCR, efeito esse mais pronunciado em doentes a tomar sulfassalazina (RR = 0,38; IC 95%: 0,20-0,69, após ajuste para actividade da doença) [68].

Alguns anos mais tarde, Eaden e col. demonstraram, num estudo caso controlo que envolveu 102 doentes com CU, que o tratamento regular com aminossalicilatos reduzia o risco de CCR em 75% (OR = 0,75; IC 95%: 0,13-0,48). Os autores analisaram ainda o risco de CCR de acordo com diferentes medicações e doses, verificando que a messalazina na dose de pelo menos 1,2g/dia reduzia o risco em 81% (OR = 0,19; IC 95%: 0,006-1,61) enquanto a sulfassalazina na dose de pelo menos 2g/dia não determinava redução significativa desse risco (OR = 0,85%; IC 95%: 0,32-2,26) [69].

Seguiu-se, contudo, a publicação, em 2001 e 2003, de dois estudos que não associaram a toma de aminossalicilatos a uma menor prevalência de CCR na DII [38,70].

Neste contexto, Velayos liderou uma equipa que publicou, em 2005, uma meta-análise sobre este assunto, na qual foram analisados 9 estudos e incluídos 1932 doentes com CU [71]. Nesse trabalho, a toma regular de aminossalicilatos (numa dose de pelo menos 1,2g/dia de messalazina) revelou um claro efeito protector contra o CCR (OR = 0,51; IC 95%: 0,37-0,69) [71].

Nos dois anos seguintes, foram publicados vários trabalhos que consubstanciaram o efeito quimiopreventivo dos aminossalicilatos na DII [50,72,73]. Num estudo caso-controlo proveniente da Universidade de Chicago, 26 doentes com CU e CCR foram comparados com 96 doentes com CU sem CCR, verificando-se que a toma de pelo menos 1,2g/dia de messalazina se associou a uma redução de 72% do risco de displasia e de CCR [72]. Van Staa e col., usando uma base de dados de prescrições do Reino Unido, verificaram que nos doentes com DII: os utilizadores regulares (6 ou mais prescrições nos últimos 12 meses) de aminossalicilatos tinham um risco de CCR inferior ao dos utilizadores irregulares (OR = 0,7; IC 95%: 0,44-1,03); que esse efeito protector não se verificava com a sulfassalazina; e que para a messalazina esse efeito era significativo apenas nos doentes com histórico de pelo menos 13 prescrições [73]. Um estudo caso-controlo proveniente da Clínica Mayo, incluindo 188 doentes com CU e CCR e 188 controlos apenas com CU, detectou uma redução do risco de CCR da ordem dos 60% nos doentes sob medicação com aminossalicilatos durante 1-

5 anos ($OR = 0,4$; $IC\ 95\%: 0,2-0,9$) [50]. De forma surpreendente, os autores verificaram ainda que nos doentes a tomar esses medicamentos há mais de 6 anos o efeito protector se diluía, deixando mesmo de assumir significado estatístico [50].

A posterior publicação de dois trabalhos que não detectaram um efeito protector significativo dos aminossalicilatos contra o CCR na DII, amplificada pelo resultado igualmente negativo duma meta-análise que excluiu estudos de centros de referência ($OR: 0,95$; $IC: 0,66-1,38$), reacendeu o cepticismo e o debate sobre este assunto, alimentando uma controvérsia que se mantém até aos dias de hoje [74,75].

O esclarecimento desta questão através da realização dum ensaio randomizado não é factível, porque óbvias questões éticas obstam à sua concretização. Assim, a evidência possível nesta matéria resulta, inevitavelmente, de estudos observacionais, como os mencionados anteriormente. O problema é que esses estudos podem ser enviesados por uma questão de propensão, isto é, por ser mais provável a toma de aminossalicilatos em doentes com maior risco de CCR, o que pode, como se entende, diluir ou até, em última instância, originar uma análise subvertida da acção destes fármacos como quimiopreventivos [76]. É certo que, quase invariavelmente, os diversos estudos procuraram fazer análises corrigidas e estratificadas para outros factores de risco para CCR, mas são conhecidas as limitações desse tipo de avaliações em estudos observacionais e retrospectivos [76].

Relativamente consensual é o facto, já anteriormente referido, da sulfassalazina se revelar, neste contexto, menos efectiva que a messalazina [22,69,73]. Embora isso possa resultar da circunstância de ser difícil tolerar doses elevadas de sulfassalazina, pode dever-se também, pelo menos em parte, ao facto da sulfassalazina inibir competitivamente a absorção do ácido fólico [22].

Apesar dos dados não serem consensuais e não sendo expectável a possibilidade de ancorar recomendações em estudos prospectivos randomizados, existe, actualmente, evidência suficiente para recomendar a utilização dos aminossalicilatos na quimioprevenção do CCR associado à DII [77]. Não obstante, não é possível estabelecer, com segurança, directrizes sobre vários pontos: quando se deve iniciar a terapêutica, qual a duração dessa terapêutica para obter o efeito quimiopreventivo, se o efeito é permanente ou se há circunstâncias que permitem suspender a terapêutica, quais os doentes em que o benefício desse tratamento poderá ser maior e, ainda, se os aminossalicilatos conseguem inibir a progressão de displasia para carcinoma [77].

Por último, importa salientar outra interrogação: nos doentes em remissão sob tratamento imunossupressor há benefício em manter a terapêutica com aminossalicilatos? Embora alguns dados sugiram a potencial adição dos efeitos quimiopreventivos desses fármacos, nomeadamente uma sinergia farmacodinâmica entre os aminossalicilatos e as tiopurinas, a verdade é que esta questão se mantém, até à data, irresoluta [78].

6.2.9. Ácido ursodexocólico

Um estudo transversal retrospectivo de doentes com CU e CEP demonstrou que o uso de ácido ursodesoxicólico (AUDC) se associou a uma incidência significativamente inferior de displasia cólica ($OR = 0,18$; IC 95%: 0,05-0,61), efeito que se manteve após ajuste para a duração da CU e da CEP, idade de diagnóstico da doença e toma de sulfassalazina [79]. No mesmo sentido, um estudo prospectivo de 52 doentes com CU e CEP seguidos na Clínica Mayo revelou que os doentes tratados com AUDC ($n = 29$; 13-15mg/kg/dia) tinham um risco de CCR significativamente inferior ao dos doentes que não tomavam essa medicação ($RR = 0,26$; IC 95%: 0,07-0,99) [80].

Em sentido contrário, Wolf e col. estudaram, retrospectivamente, uma coorte de 120 doentes com CU e CEP e verificaram a inexistência de diferenças significativas no risco de CCR entre os doentes que tomavam ($n = 28$; 3,4 anos em média) e os que não tomavam AUDC [81].

Alguns estudos recentes sugeriram que a duração do tratamento e a dose de AUDC utilizada são factores importantes na quimioprevenção [82-85]. Eaton e col. avaliaram o efeito do AUDC em altas doses (28-30mg/Kg/dia) no desenvolvimento de neoplasia colo-rectal em 56 doentes com CU e CEP durante um seguimento de 235 doentes- anos, constatando que os doentes expostos às doses elevadas do fármaco tinham um risco de neoplasia colo-rectal 4,44 vezes superior ao dos doentes do grupo placebo (IC a 95%: 1,30-20,10) [82]. Num outro estudo, igualmente com utilização de doses elevadas de AUDC (17-23 mg/Kg), após um seguimento de 5 anos verificou-se uma incidência de displasia semelhante no grupo activo e no grupo placebo (13% vs. 16%) [83]. Num trabalho que incluiu doentes transplantados por CEP, a utilização de aminossalicilatos ou de AUDC associou-se, em análise multivariada, a aumento do risco de CCR [84]. Um estudo prospectivo germânico, que envolveu 120 doentes com DII e CEP, no qual todos os doentes foram tratados com AUDC, verificaram-se incidências crescentes de CCR até 6 anos após início da terapêutica constatando-se, subsequentemente, incidências decrescentes, ou seja, sublinhando que a duração da exposição ao fármaco poderá ser um importante factor a ter em conta no seu efeito quimiopreventivo [85].

Recentemente, no ano de 2012, foi publicada uma meta-análise que incluiu 4 estudos e um total de 281 doentes com CU e CEP, na qual se concluiu pela inexistência de efeito quimiopreventivo do AUDC relativamente ao risco de CCR nesses doentes [86].

Em conclusão, o papel do AUDC como quimiopreventivo de CCR na DII permanece controverso, sobretudo quando usado em doses elevadas. O esclarecimento desta questão permanece refém da realização de estudos prospectivos randomizados que, idealmente, deveriam incluir também a comparação entre a utilização de doses baixas e doses elevadas do fármaco [77]. No entanto, a concretização desse tipo de estudos assoma como improvável, dada a dificuldade em congregiar um número suficiente de doentes com diagnóstico CEP e CU à admissão no estudo e, ainda, pelo longo seguimento necessário para obter conclusões consubstanciadas [77].

Apesar de serem escassos os dados sobre um eventual efeito quimiopreventivo do AUCD em doentes com CU sem CEP, num pequeno estudo sueco 19 doentes com DII (13 CU, 6 DC; a maioria sem CEP) com displasia de baixo grau e/ou aneuploidia de DNA foram randomizados para toma de AUCD 500mg 2id ou placebo e seguidos durante 2 anos [87]. Dois dos 9 doentes do grupo placebo progrediram para displasia de alto grau ou *dysplasia-associated lesion or mass (DALM)* e necessitaram de colectomia, enquanto no braço activo do estudo não se verificou nenhum caso de progressão [87].

6.2.10. Outros fármacos

Relativamente ao eventual efeito das tiopurinas no risco de CCR na CU, os dados não são consensuais. Dois trabalhos, um proveniente do hospital de Mount Sinai (Estados Unidos) e outro do hospital de St Mark (Reino Unido), não associaram a utilização desses fármacos à diminuição do risco de CCR em doentes com CU [88,89]. Em sentido contrário, três trabalhos verificaram que nos doentes com DII sob medicação com tiopurinas o risco de CCR era significativamente inferior [59,61,90]. Relativamente à magnitude desse efeito, um desses estudos identificou um OR de 0,3 (IC 95%: 1,16-0,56; $p < 0,001$) para CCR em doentes medicados com tiopurinas, em comparação com os doentes não expostos a essa medicação [61]. Importa salientar que, tal como foi discutido no caso dos 5-ASA, a análise dos resultados destes trabalhos, sobretudo dos mais diosos, é perturbada pela muito provável comparação de doentes com diferente propensão para CCR, efeito que, não sendo tido em conta, mitiga, naturalmente, um eventual efeito protector da toma destes medicamentos. Quanto aos fármacos anti-TNF, um estudo recente associou a administração desses medicamentos a um risco significativamente diminuído de CCR (OR = 0,009; IC 95%: 0,01-0,68; $p = 0,02$), em análise que incluiu estratificação para outros factores de risco de CCR na DII [61].

Estudos experimentais e epidemiológicos sugeriram que baixos níveis de ácido fólico podem representar um factor de risco para CCR esporádico, provavelmente através de indução de alterações genéticas, nomeadamente no gene *p53* [91-93]. Os doentes com DII têm um risco aumentado de apresentar deficiência de folato e, recentemente, Phelip e col. reportaram um risco de CCR 17 vezes superior em doentes com DII com hiperhomocisteinémia e deficiência de folato [94]. Não obstante, até à data, apenas um pequeno estudo caso-controlo (incluindo 6 casos e 61 controlos) detectou um efeito protector significativo da suplementação com ácido fólico e, adicionalmente, um pequeno estudo piloto randomizado que comparou a suplementação de ácido fólico com placebo em 12 doentes com CU demonstrou que, após 3 meses, se registou uma redução da proliferação celular no braço activo do estudo [95,96]. Os restantes estudos caso-controlo não detectaram um efeito significativo da suplementação de ácido fólico [57,80,97,98]. Assim, neste momento, a suplementação com ácido fólico não pode ser considerada um tratamento quimiopreventivo efectivo na CU ainda que, naturalmente, a deficiência de folato deva ser pesquisada e corrigida.

Apesar das estatinas exibirem um efeito inibitório da carcinogénese colo-rectal em modelos animais, o impacto clínico desses dados permanece obscuro. Num estudo de base populacional, Poynter e col. reportaram uma associação entre o uso de estatinas durante pelo menos 5 anos e uma diminuição significativa do risco de CCR, em análise corrigida e estratificada para outros potenciais factores protectores [99]. Esse efeito protector foi particularmente significativo no pequeno grupo de doentes com DII em que se registou uma redução do risco de CCR de 94% [99]. Não obstante, outros estudos não detectaram o mesmo efeito protector na população geral e, recentemente, uma meta-análise de 18 estudos não identificou uma redução significativa do risco de CCR em doentes medicados com estatinas por hipercolesterolemia [100,101].

6.3. DIFERENÇAS DA NEOPLASIA DO CÓLON ASSOCIADA A COLITE ULCEROSA EM RELAÇÃO À ESPORÁDICA

6.3.1. Idade

Vários trabalhos demonstraram que a idade dos doentes ao diagnóstico de CCR é inferior na DII do que nos casos esporádicos [10,65,102]. Lakatos e col. detectaram uma diferença entre os dois grupos de 10-15 anos (50,9 vs. 62,2 anos) enquanto no trabalho liderado por Ali R.A. essa diferença foi, em média, de 7,7 anos [10,102].

6.3.2. Origem

A inflamação crónica, ainda que apenas microscópica, parece ser o factor principal do CCR associado à DII [58,103]. A nível clínico, a conexão entre a inflamação e o CCR fica evidente pelo facto de constituírem factores de risco para displasia a DII extensa, de longa duração e com maior intensidade de inflamação, tal como abordado na secção respectiva. O substrato molecular dessa conexão começa, gradualmente, a ser elucidado. Os *toll-like receptors* (TLR) e as citocinas pró-inflamatórias IL-1b, TNF- α e IL-6 interagem, directa ou indirectamente, com o factor nuclear κ B o qual, por seu turno, induz a transcrição de genes envolvidos na carcinogénese, incluindo a COX-2 [103-107]. A COX-2, que metaboliza o ácido araquidónico em prostaglandinas, influi a proliferação celular, a apoptose e a angiogénese [108]. As bactérias comensais também foram implicadas no processo de carcinogénese, uma vez que a sua exclusão em modelos murinos de cancro associado a inflamação demonstrou ter um efeito protector contra o desenvolvimento de displasia/cancro [109].

6.3.3. Genética

A maioria dos CCR, tanto esporádicos como associados à DII, envolve uma ou mais das três principais vias de cancerização, nomeadamente: instabilidade cromossómica, instabilidade de microssatélites e hipermetilação [110-112]. Acresce que as anomalias genéticas sequentes a essas vias, envolvendo múltiplos

reguladores do ciclo celular, são também, em grande medida, comuns aos dois tipos de CCR - o esporádico e o associado a DII [110,113]. Não obstante, apesar dessas similitudes, é geralmente a frequência e o momento de ocorrência dessas alterações genéticas que diferenciam o perfil genético do CCR nesses dois contextos distintos [110,113,114].

As alterações genéticas dos genes *APC* e *p53* representam o exemplo mais clássico e elucidativo do conceito anteriormente exposto. As mutações do gene *APC* são frequentes e precoces (antes da fase de adenoma inicial) na carcinogénese esporádica enquanto no CCR associado à DII são um evento menos frequente e mais tardio (precedendo a fase de carcinoma) [2,114]. De forma inversa, as alterações do gene *p53* são algo infrequentes e tardias (entre o estágio de adenoma tardio e carcinoma) no CCR esporádico enquanto na carcinogénese relacionada com a DII são uma ocorrência frequente e relativamente precoce (mesmo em mucosa normal, precedendo qualquer alteração displásica) [1,115,116].

As mutações no oncogene *K-ras*, por seu turno, ocorrem em 75% dos CCR e adenomas esporádicos e são, provavelmente, um evento precoce, sendo detectadas apenas em 0-24% das displasias e 0-15% dos CCR associados à DII onde ocorrem, geralmente, numa fase tardia [117-120].

As perturbações genéticas anteriormente mencionadas fazem parte da principal via de cancerização do CCR, tanto esporádico como associado à DII, designadamente a instabilidade cromossómica. No que se refere à instabilidade de microssatélites e à hipermetilação, vias relativamente bem elucidadas no contexto da carcinogénese esporádica, têm vindo a ser desvendadas e, conseqüentemente, a assumir protagonismo crescente no contexto da carcinogénese relacionada com a DII [110,113,122-124].

O mapa genético da carcinogénese associada à DII, do qual conhecemos apenas, provavelmente, um mero esboço, tem vindo a ser progressivamente completado, com a identificação de múltiplos genes envolvidos, em interligação, nos diversos estádios, desde a mucosa normal até ao CCR, passando pelo estágio intermédio de displasia [113,125,126]. O incremento do conhecimento nesta área, para além das potenciais aplicações em termos terapêuticos, tem suscitado o interesse na sua virtual translação clínica, nomeadamente para o rastreio de displasia/CCR, através de duas vias. Uma delas diz respeito à utilização de alterações genéticas reconhecidamente precoces, que ocorrem antes da existência de alterações histológicas, ou seja, detectáveis em mucosa normal, podendo funcionar como preditores de risco de transformação neoplásica [108,115,127-131]. A outra refere-se, em paralelo com o que existe para o CCR esporádico, à utilização de testes de DNA fecal, isto é, testes de detecção de perturbações genéticas sabidamente associadas à displasia/CCR da DII e que poderão ser descobertas em células esfoliadas libertadas nas fezes [132,133]. Apesar dos resultados promissores e da demonstração de exequibilidade prática, não existe, ainda, suporte nem evidência suficiente para incluir qualquer uma dessas avaliações na prática clínica. Não obstante, trata-se dum área de elevado interesse pelas virtuais implicações no refinamento do rastreio, desde a adesão aos

programas até ao aumento da efectividade e custo-benefício da estratégia, passando também pela melhor alocação dos recursos disponíveis [132,134].

6.3.4. Aspecto Macroscópico

Em comparação com o CCR esporádico, a displasia/CCR em doentes com DII tem uma apresentação macroscópica mais heterogénea tendendo a assumir um aspecto mais irregular e limites menos definidos, podendo apresentar-se sob a forma de estenoses, úlceras, lesões exofíticas ou lesões planas mais ou menos inconspícuas [127,135-137].

6.3.5. Plano e multifocal

Em comparação com os casos esporádicos, o CCR na CU é mais frequentemente plano e multifocal [2,138,139]. A existência de tumores síncronos é, de facto, mais comum no contexto da DII do que nos casos esporádicos (12% vs. 3-5%) [2].

6.3.6. Localização

Apesar do CCR na CU, tal como o CCR esporádico, ser mais frequente no recto e no sigmóide, a magnitude desse predomínio não é tão marcada como nos casos esporádicos, havendo mesmo alguns trabalhos que relataram distribuições semelhantes a montante e a jusante do ângulo esplénico [8,10,140-148].

6.3.7. Histologia

A maioria dos CCR associados à DII são adenocarcinomas convencionais. No entanto, na DII 15-30% são adenocarcinomas mucinosos e até 7% são adenocarcinomas com células em anel de sinete em oposição aos 10-15% e 1%, respectivamente, no CCR esporádico [113,144,149].

6.3.8. Sequência

A clássica sequência “adenoma-carcinoma” dos CCR esporádicos dá lugar, no caso da DII, à sequência “inflamação-displasia-carcinoma” [148,150]. Não obstante, ao contrário do que acontece na carcinogénese esporádica, na DII nem sempre há uma progressão clara e linear desde mucosa normal, passando por displasia de baixo e alto grau e culminando em carcinoma [2,151]. De facto, pode desenvolver-se carcinoma sem prévia detecção de displasia e, além disso, displasia de baixo grau pode regredir ou progredir directamente para carcinoma sem passar pelo estágio de displasia de alto grau [152,153]. Ainda assim e pese embora os dados

não sejam absolutamente claros e categóricos, acredita-se que a progressão de displasia para carcinoma na DII ocorra mais rapidamente que a progressão de adenoma para CCR esporádico [154].

6.3.9. Prognóstico

Um estudo dinamarquês de base populacional comparou 71259 casos de CCR esporádicos com 279 casos de CCR associados a CU, diagnosticados entre 1977 e 1999. Apesar de não haver diferenças entre os grupos relativamente ao estágio tumoral verificou-se que a mortalidade 1 e 5 anos após o diagnóstico era significativamente superior nos doentes com CU [*Mortality rate ratio* (MRR) = 1,24; IC 95%: 1,02-1,51 e MRR = 1,17; IC 95%: 1,01-1,36, respectivamente] [155].

Do mesmo modo, Brackmann e col. publicaram um estudo de base populacional referente ao período compreendido entre 1962 e 2005, que permitiu a comparação entre 81780 CCR esporádicos e 60 CCR associados a DII (54 com CU e 6 com DC), no qual verificaram inexistência de diferenças em termos de estadiamento mas um excesso de mortalidade nos casos associados a DII (MRR = 3,71; IC 95%: 2,54-5,42) [156].

Em 2012, dois trabalhos importantes, um europeu e outro norte americano, liderados, respectivamente, por Peyrin-Biroulet L. e Herrinton L.I., obtiveram conclusões semelhantes, ou seja, maior mortalidade nos casos de CCR de doentes com DII em comparação com casos de CCR esporádicos [157,158].

Mais recentemente, em 2014, Hrabe e col. publicaram um estudo caso-controlo que incluiu ajuste de acordo com o estágio tumoral e verificaram que nos CCR associados a DII o risco de morte era significativamente superior ao dos doentes com CCR esporádico [*Hazard ratio* (HR) = 2,01; IC 95%: 1,24-3,23] [159].

Apesar das evidências anteriores, alguns trabalhos obtiveram resultados dissemelhantes. Um estudo proveniente da Clínica Mayo envolvendo a comparação de duas coortes de 290 doentes com CCR, uma delas em doentes com DII e a outra de casos esporádicos, detectou sobrevidas semelhantes aos 5 anos (56% vs. 57%) [145]. Resultados idênticos foram relatados num trabalho conduzido por Rhodes e col. [160]. Dois outros estudos, um liderado por Bansal e o outro por Ali, detectaram uma tendência estatística para maior sobrevida nos casos de CCR de doentes com DII em comparação com os casos de CCR esporádico [102,161].

Em conclusão, apesar de haver dados díspares e contraditórios, a maioria da evidência suporta um prognóstico mais sombrio para o CCR associado a DII do que para o CCR esporádico, tendo sido identificados como factores de mau prognóstico o sexo masculino e o diagnóstico antes dos 60 anos [77].

6.4. VISIBILIDADE DA DISPLASIA

Antes do advento do rastreio por colonoscopia, Morson e Pang glosaram, em 1967, que as transformações neoplásicas associadas à CU assumiam um aspecto plano em vez de polipóide e que essas alterações não eram passíveis de serem reconhecidas macroscopicamente [162]. Trabalhos publicados nas décadas de 1980 e 1990 consubstanciaram esta noção, reportando que 50% a 95% dos focos de displasia eram endoscopicamente imperceptíveis [138,139,163]. Este conceito esteve na origem do desenvolvimento dos protocolos de rastreio endoscópico baseados na realização de biopsias aleatórias seriadas.

Na década de 2000 foram publicados vários trabalhos que demonstraram que a maioria dos casos de displasia na CU, mais propriamente entre 59% a 88%, eram endoscopicamente visíveis [47,164-166]. Os dados do Hospital de St. Mark, publicados por Rutter e col. em 2004, revelaram que a visibilidade endoscópica das neoplasias era de 77,3% e 89,3%, na avaliação por lesão e por doente, respectivamente [164]. Esses mesmos índices foram de 61,3% e 76,1%, respectivamente, no trabalho liderado por Rubin e publicado em 2007 [165]. Um ano mais tarde foi publicado o estudo de Blonski e col. no qual os autores reportaram que 87,9% das lesões displásicas detectadas na sua série de doentes com CU eram endoscopicamente visíveis [166].

A discrepância entre os dados dos estudos mais antigos e a evidência mais recente resultam, muito provavelmente, da melhoria da resolução endoscópica e não de modificações na biologia tumoral [165]. A resolução dos instrumentos endoscópicos tem incrementado gradualmente ao longo das últimas 3 décadas e, recentemente, viu-se melhorada ainda mais com a introdução da tecnologia de alta definição [165]. Uma explicação complementar resulta do facto de ser reconhecidamente difícil discriminar entre inflamação e displasia, elemento que, por limitações metodológicas, poderá ter enviesado os resultados dos estudos mais ancestrais [42,164].

CAPÍTULO 7. RASTREIO DA NEOPLASIA DO CÓLON NA CU

7.1. BIOPSIAS ALEATÓRIAS

O conceito clássico de que o CCR associado à DII, ao contrário da sequência adenoma-carcinoma esporádica, se origina e desenvolve em mucosa plana endoscopicamente indistinguível da mucosa normal, esteve na origem da concepção e aplicação de protocolos de biopsias aleatórias seriadas. Esta estratégia visa, nesse contexto, obter, tanto quanto possível, uma amostra representativa da mucosa cólica, identificando ou excluindo evidência microscópica de displasia [167].

Obviamente, a probabilidade de detecção de displasia é tanto maior quanto maior o número de biopsias efectuadas [9]. Num estudo liderado por Rubin, amplamente citado a este propósito, os autores reportaram que a exclusão de displasia com um grau de certeza de 90% era conseguida com a realização de 33 biopsias, sendo necessárias 56-64 biopsias para elevar a fasquia dessa exactidão para 95% [168]. Em sequência, em 2005, numa reunião internacional de consenso, foi estabelecido que deveriam ser realizadas, no contexto do rastreio na DII, biopsias aleatórias nos 4 quadrantes a cada 10cm, com colheita de pelo menos 32 biopsias [169]. Atendendo ao predomínio da localização distal do CCR associado à CU, alguns peritos recomendam execução de maior número de biopsias na região rectosigmoideia, nomeadamente realização de biopsias nos 4 quadrantes a cada 5cm [142,170,171]. As diversas *guidelines* incorporaram este conceito na estratégia de rastreio, ou seja, recomendando, além de biopsias dirigidas a lesões suspeitas, a realização de biopsias aleatórias seriadas [44,169,172].

A aceitação global destas recomendações e, conseqüentemente, a sua aplicação prática, revelaram-se constrangedoramente baixas. A adesão dos Gastrenterologistas aos protocolos recomendados revelou ser de 9%, 25% e 54%, na Alemanha, Holanda e Estados Unidos, respectivamente [64,173,174]. No Reino Unido, 57% dos Gastrenterologistas colhiam menos de 10 biopsias por exame e apenas 2% realizavam mais de 20 biopsias por colonoscopia [175]. No mesmo sentido, 50% dos Gastrenterologistas da Nova Zelândia colhiam, em média, menos de 17 biopsias por colonoscopia [176].

Os baixos níveis de adesão aos protocolos de biopsias aleatórias recomendados resultarão, directa ou indirectamente, das várias limitações incorporadas nessa estratégia. Trata-se, desde logo, de procedimentos demorados. Por outro lado, os custos, não só os relacionados com o procedimento endoscópico mas também os inerentes ao processamento e avaliação histológicos, são, como se depreende, não despreciables. Acresce que, considerando os dados de 8 estudos prospectivos que envolveram colheita de biopsias aleatórias nos 4 quadrantes a cada 10cm, foram necessárias, em média, 1266 biopsias para detectar um caso de NIE, ou seja, expressando uma baixa rendibilidade diagnóstica [46,177-183].

Adita que a aplicação desta estratégia garante a avaliação duma amostra que representa, na verdade, menos de 1% da mucosa do cólon, ou seja, tendo associado um elevado risco de erro de amostragem [2]. Estes

receios foram reforçados pela descrição de casos de CCR de intervalo, ou seja, diagnosticados no intervalo entre exames em doentes incluídos em programas de rastreio [9]. A conjugação de todas estas limitações traduz-se, em termos práticos, numa estratégia com custo-efectividade altamente questionável [184].

Se a recomendação de realização de biopsias seriadas, pela sua natureza laboriosa e pelas limitações anteriormente mencionadas, nunca granjeou simpatia entre a comunidade gastroenterológica, o seu espaço de manobra tem vindo a reduzir-se ainda mais com a acumulação da evidência, previamente referida, de que a maioria das lesões displásicas associadas à CU são, na verdade, endoscopicamente visíveis.

7.2. CROMOENDOSCOPIA

7.2.1 - Corantes e técnica

A cromoendoscopia consiste na aplicação, por via endoscópica, de substâncias corantes na mucosa do tubo digestivo tendo em vista a observação de detalhes da mucosa que permitam facilitar o diagnóstico de determinada lesão, melhorando a sua localização e caracterização [185]. Estão descritos vários corantes que podem ser utilizados isoladamente ou em associação, precedendo ou acompanhando a realização da endoscopia [186].

Os corantes podem ser classificados em três grupos de acordo com o seu modo de acção. Os corantes vitais, de que são exemplo o azul de metileno, o soluto de Lugol, o azul de toluidina e o violeta de cresil, são absorvidos por determinadas células epiteliais. Os corantes de contraste, grupo em que se inclui o índigo carmim, não penetram nas células, permitindo apenas acentuar os contornos e limites da lesão. Por fim, os corantes reactivos são aqueles que reagem com um constituinte das células epiteliais ou com uma secreção mucosa (vermelho de Congo e o vermelho fenol) [185].

No contexto do rastreio do CCR na DII, o azul de metileno e o índigo carmim são os corantes mais utilizados. O azul de metileno, que é absorvido pelos colonócitos normais, apresenta absorção diminuída ou mesmo abolida pelos tecidos neoplásicos ou inflamados [180]. O índigo carmim, tal como mencionado anteriormente, acentua os contornos lesionais mas não é absorvido [187]. Estes agentes são aplicados directamente pelo do canal de trabalho ou, preferencialmente, através dum cateter de *spray* (idealmente radial), permitindo observação dentro de 1-2 minutos e mantendo coloração de qualidade durante 10 a 20 minutos após a sua aplicação [168]. Em termos de eficácia não é possível recomendar um agente em detrimento de outro porque não há estudos comparativos entre eles, ainda que a coloração do azul de metileno seja mais estável que a do índigo carmim [188,189]. Relativamente à segurança, o índigo carmim, não sendo absorvido, é considerado um agente inócuo [190]. Já o azul de metileno, pelo facto de ser absorvido, tem sido, classicamente, associado a algumas reservas [190]. Estudos bioquímicos *in vitro* alimentaram os receios através da demonstração de que o azul de metileno se pode ligar ao DNA e, na

sequência da exposição à luz, induzir alterações genéticas [191,192]. Não obstante, estes resultados não foram replicados e, em termos clínicos, apesar da longa e ampla utilização esses efeitos nefastos não foram documentados, pelo que se mantém o uso deste corante [193,194]. No que concerne ao custo, o azul de metileno é, em comparação com o índigo carmim, uma opção mais económica [190].

Durante a cromoendoscopia, a avaliação do padrão de criptas, preferencialmente com endoscópios de alta resolução, é fortemente recomendada. Nessa avaliação usa-se, geralmente, a validada e amplamente aceite classificação de Kudo [195]. Nessa classificação, os tipos I (criptas arredondadas) e II (criptas com formato estrelado ou papilar) sugerem lesão não neoplásica enquanto os tipos III (criptas tubulares), IV (criptas cerebriformes) e V (criptas indistinguíveis ou com morfologia irregular) são suspeitos de natureza neoplásica [195].

Intentando a estandardização da técnica, foram desenvolvidas recomendações de aplicação da cromoendoscopia em doentes com DII, em especial com CU de longa evolução, designadas pelo acrónimo *SURFACE*, que se detalham no quadro 7.1 [196].

Quadro 7.1. Guidelines SURFACE para cromoendoscopia em doentes com CU [196]

Seleccionar, rigorosamente, os doentes (*Strict patient selection*)

Doentes com CU histologicamente comprovada com ≥ 8 anos de duração e em remissão clínica.

Evitar doentes com doença activa.

Expor a superfície mucosa (*Unmask the musal surface*)

É essencial uma excelente preparação intestinal. Quando necessário deve proceder-se à aspiração de líquido luminal e à remoção de muco aderente à mucosa.

Reduzir a peristalse (*Reduce peristaltic waves*)

Durante a extubação, um agente espasmolítico deve, se necessário, ser administrado.

Efectuar pancromoendoscopia (*Full-length staining of the colon*)

Deve efectuar-se pancromoendoscopia em vez de cromoendoscopia selectiva.

Aplicar corantes para salientar lesões (*Augmented detection with dyes*)

Devem ser aplicados, intraluminalmente, corantes, designadamente indigo carmim a 0,4% ou azul de metileno a 0,1%, de forma a salientar lesões que, de outra forma, passariam despercebidas com a colonoscopia convencional.

Avaliar a arquitectura das criptas (*Crypt architecture analysis*)

Todas as lesões devem ser avaliadas de acordo com a classificação do padrão de criptas. Enquanto os padrões tipo I-II sugerem lesão não neoplásica, os padrões tipo III-V são sugestivos de neoplasia intra-epitelial ou carcinoma.

Realizar biopsias dirigidas (*Endoscopic targeted biopsies*)

Devem ser efectuadas biopsias das alterações detectadas, sobretudo das lesões circunscritas com padrão de criptas suspeito (tipos III-V).

7.2.2. Estudos que avaliaram a cromoendoscopia no rastreio de CCR na DII

O primeiro estudo, controlado e randomizado, que avaliou a aplicação da cromoendoscopia no rastreio da CU, foi levado a cabo por Kiesslich e col. em 2003 [180]. Nesse trabalho, 165 doentes com CU com pelo menos 8 anos de evolução foram randomizados, numa proporção de 1:1, realizando colonoscopia convencional ou cromoendoscopia com magnificação [180]. Em ambos os grupos, foram realizadas biopsias dirigidas das alterações detectadas durante o exame, bem com biopsias aleatórias, mais propriamente 5 biopsias a cada 10cm [180]. No grupo da cromoendoscopia foi utilizado azul de metileno a 0,1% e as lesões

circunscritas foram avaliadas com magnificação, sendo classificadas como neoplásicas ou não neoplásicas de acordo com os critérios de Kudo [195]. O número de NIE detectadas foi significativamente superior no grupo da cromoendoscopia (32 vs. 10, $p = 0,00315$), resultante, essencialmente, da detecção dum maior número de NIE em mucosa plana (24 vs. 4, $p = 0,0007$), enquanto o número de NIE polipóides não foi significativamente diferente (8 vs. 6, $p = ns$) [180]. Apesar do número de doentes com NIE ser mais do dobro no grupo que efectuou cromoendoscopia, a diferença não foi suficiente para atingir significado estatístico (13 vs. 6, $p = ns$) [180]. Quanto ao número de biopsias efectuadas, a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa (42,2 vs. 38,2, $p = ns$), mas é preciso salientar que foram realizadas biopsias aleatórias em todos os doentes incluídos no estudo [180]. Não obstante, o número de biopsias dirigidas foi significativamente superior no grupo da cromoendoscopia (14,2 vs. 4,3; $p = 0,044$) [180]. No que diz respeito ao tempo despendido no exame, apesar desse valor ser superior no grupo que efectuou cromoendoscopia, a diferença não atingiu significado estatístico ($44 \pm 12,2$ min vs. $35 \pm 9,3$ min, $p = ns$) [180]. No grupo da cromoendoscopia, utilizando a histologia como *gold standard*, a avaliação das lesões por cromoendoscopia e magnificação permitiu a sua distinção entre neoplásicas e não neoplásicas com sensibilidade de 93%, especificidade de 93%, valor preditivo positivo de 83% e valor preditivo negativo de 98% [180]. Seis lesões inflamatórias foram, erradamente, classificadas como neoplásicas e, adicionalmente, 2 falsos negativos advieram de 2 NIE de baixo grau detectadas nas biopsias aleatórias [180]. O mesmo grupo desenvolveu, em 2007, um estudo com desenho semelhante mas substituindo a magnificação endoscópica por endomicroscopia confocal (EMC), obtendo conclusões semelhantes, ou seja, incremento significativo do número de NIE detectadas no grupo da cromoendoscopia [178]. Os detalhes desse trabalho, tanto metodológicos como em termos de resultados obtidos, serão minudenciados na secção relativa à EMC.

No mesmo ano, um estudo prospectivo mais pequeno ($n = 57$), proveniente do Japão, comparando, num mesmo grupo de doentes, a colonoscopia convencional com a cromoendoscopia com índigo carmim a 0,2% (cromoendoscopia realizada depois da colonoscopia convencional), demonstrou que a avaliação com corante incrementou, de forma significativa, a detecção e caracterização de lesões planas [177].

Em 2004 Rutter e col. publicaram um trabalho com um desenho semelhante no qual incluíram 100 doentes com CU de longa evolução [179]. Inicialmente os doentes efectuaram colonoscopia convencional com biopsias dirigidas e, associadamente, biopsias aleatórias seriadas [179]. Nessa avaliação foram detectadas 2 NIE em 2 doentes, todas elas decorrentes de biopsias dirigidas, enquanto as 2904 biopsias aleatórias não revelaram nenhum caso de NIE [179]. Em seguida foi efectuada cromoendoscopia com índigo carmim a 0,1% e biopsia das lesões circunscritas salientadas pelo corante, o que permitiu identificar mais 7 NIE em 5 doentes [179]. Comparando os 2 métodos, verificou-se uma clara tendência estatística para diagnóstico de maior número de doentes com NIE no grupo da cromoendoscopia (7 vs. 2, $p = 0,06$) [179]. O desempenho, em termos de número de doentes com NIE, foi significativamente melhor para as biopsias dirigidas em comparação com as biopsias aleatórias (7 vs. 0, $p = 0,02$), com um número de biopsias efectuadas claramente

inferior (157 vs. 904) [179]. Em termos de duração dos exames, o tempo despendido durante a retirada foi semelhante nos dois métodos, nomeadamente 10 minutos no grupo das biopsias seriadas e 11 minutos no grupo da cromoendoscopia [179].

Hurlstone liderou um amplo estudo caso-controlo publicado em 2005, que incidiu sobre o papel da cromoendoscopia acoplada com magnificação endoscópica no rastreio de neoplasia em doentes com CU de longa evolução [197]. Nesse trabalho, 350 doentes foram rastreados através de colonoscopia com biopsias dirigidas e biopsias aleatórias seriadas e, perante existência de subtis alterações endoscópicas (convergência focal de pregas, deformação induzida pela insuflação-desinsuflação, alterações cromáticas discretas), realização de cromoscopia dirigida com indigo carmim a 0,5% [197]. Como grupo controlo foram utilizados 350 doentes com extensão e duração de doença sobreponíveis à dos casos [197]. O número total de NIE e o número de NIE planas detectadas foram significativamente superiores no grupo da cromoendoscopia (69 vs. 24, $p < 0,0001$ e 53 vs. 14, $p < 0,001$, respectivamente). Em termos de duração do exame, o tempo de extubação foi significativamente mais longo no grupo da cromoendoscopia (24 min vs. 13 min, $p < 0,02$) [197]. O desempenho da cromoendoscopia acoplada com magnificação endoscópica na correcta distinção entre lesões neoplásicas e não neoplásicas revelou sensibilidade de 93%, especificidade de 88%, valor preditivo positivo de 96% e valor preditivo negativo de 80% [197]. Registaram-se 8 falsos negativos, incluindo 6 NIE de baixo grau e 2 NIE de alto grau, a maioria em doentes com múltiplos pseudopólipos, circunstância que condiciona a aplicação da técnica [197]. Quinze lesões foram, erradamente, classificadas como neoplásicas (falsos positivos) [197].

Em 2008, Marion e col. publicaram, neste âmbito, o único estudo proveniente dos Estados Unidos [46]. Nesse trabalho, os 102 doentes (79 com CU e 23 com colite de Crohn) incluídos efectuaram, inicialmente, colonoscopia convencional com biopsias dirigidas e biopsias aleatórias e, de seguida, cromoendoscopia com azul de metileno a 0,1% [46]. Os autores verificaram que o número de doentes com NIE detectados através das biopsias dirigidas pela cromoendoscopia (16 doentes com NIE de baixo grau e 1 doente com NIE de alto grau) era significativamente superior ao dos encontrados pelas biopsias aleatórias (3 doentes com NIE de baixo grau) ($p = 0,001$) e pelas biopsias dirigidas sem cromoendoscopia (8 doentes com NIE de baixo grau e 1 doentes com NIE de alto grau) ($p = 0,057$) [46]. As biopsias dirigidas, com ou sem cromoendoscopia, permitiram detectar um total de 20 doentes com NIE, em oposição aos 3 doentes com NIE detectados através das biopsias aleatórias ($p = 0,0002$) [46]. Neste trabalho, o procedimento convencional (biopsias dirigidas + biopsias aleatórias) revelou-se mais demorado que o exame com cromoendoscopia, sem que, contudo, a diferença entre ambos se tenha revelado estatisticamente significativa (22,11 min vs. 15,12 min) [46].

Em 2011 foram publicados 2 trabalhos, um eslovaco e outro de origem germânica, com resultados que sublinham, na essência, as mesmas conclusões: a redundância das biopsias aleatórias (nenhuma NIE detectada dessa forma) e que as lesões neoplásicas (a totalidade das lesões nestes trabalhos) são detectadas através de

biopsias dirigidas, com ganho adicional, nesse contexto, pela utilização da cromoendoscopia, acoplada ou não a EMC [198,199].

Numa análise global destes trabalhos verifica-se que apesar da cromoendoscopia se associar a detecção de maior número de NIE e de doentes com NIE, o incremento em termos do número de doentes nem sempre se revelou estatisticamente significativo [46,177-180,197-199]. Esta é, obviamente, uma questão crucial, porque a detecção de NIE adicionais em doentes com NIE já detectada na colonoscopia convencional não tem a mesma relevância clínica que a detecção de NIE em doentes cujo rastreio convencional não tenha detectado NIE. Os diversos estudos abordados anteriormente encontram-se sumariados, de forma sistematizada, na tabela 7.1.

Também no ano de 2011, foi publicada uma meta-análise que incluiu 6 estudos, envolveu um total de 1277 doentes e teve como objectivo comparar a *performance* da cromoendoscopia com a da colonoscopia convencional no contexto do rastreio de neoplasia em doentes com DII do cólon [190]. Na análise por doente o incremento diagnóstico de displasia associado à utilização da cromoendoscopia foi de 7% (IC 95%: 3,2-11,3) com um *number needed to treat* (NNT) de 14,3, ou seja, por cada 14 doentes rastreados a aplicação da cromoendoscopia permite diagnosticar, em comparação com a colonoscopia convencional, mais um doente com displasia [190]. Na avaliação por número de lesões displásicas detectadas, a cromoendoscopia associou-se a um incremento diagnóstico de 44% (IC 95%: 11,2-41,9) [190]. Por outro lado, verificou-se que com a aplicação da cromoendoscopia ocorre uma redução de 40% do número de lesões displásicas detectadas exclusivamente em biopsias aleatórias [190]. Concluíram os autores que a cromoendoscopia deve ser usada, nestes doentes, como método preferencial de rastreio, mas que, ainda assim, se deve manter a realização de biopsias seriadas porque algumas lesões apenas foram detectadas dessa forma [190]. Relativamente à duração dos exames, a cromoendoscopia revelou ser significativamente mais demorada que a colonoscopia convencional, com uma diferença, em média, de 11 minutos [190].

Tabela 7.1. Estudos de comparação entre cromoendoscopia e colonoscopia convencional no rastreio de doentes com DII do cólon de longa evolução

Autor ^[ref] (Ano)	País	Número de endoscopistas	Desenho do estudo	Corante	Tipo de CR	Número de doentes	Doentes com NIE (n,%)	Resultado CR vs CC	Incremento diagnóstico da CR
Kiesslich e col. ^[180] (2003)	Alemanha	Múltiplos	Randomizado	AM 0,1%	Pancolónica	165 ^C	19 (11,5%)	32 vs 10 LNIE	3 vezes (por lesão)
Matsumoto e col. ^[177] (2003)	Japão	Único	Coorte prospectiva. Exames sequenciais ^A	IC 0,2%	Pancolónica	57 ^C	12 (21,1%)	86% vs 38% Sensibilidade	Não mencionado
Rutter e col. ^[179] (2004)	Reino Unido	Único	Coorte prospectiva. Exames sequenciais ^A	IC 0,1%	Pancolónica	100 ^C	7 (7,0%)	9 vs 2 LNIE	4,5 vezes (por lesão)
Hurlstone e col. ^[197] (2005)	Reino Unido	Único	Coorte prospectiva. Caso-controlo	IC 0,5%	Dirigida	700 ^C	81 (11,6%)	69 vs 24 LNIE	3 vezes (por lesão)
Kiesslich e col. ^[178] (2007)	Alemanha	Múltiplos	Randomizado	AM 0,1%	Pancolónica ^B	153 ^C	15 (9,8%)	19 vs 4 LNIE	4,75 vezes (por lesão)
Marion e col. ^[46] (2008)	Estados Unidos	Múltiplos	Coorte prospectiva. Exames sequenciais ^A	AM 0,1%	Pancolónica	102 ^D	19 (18,6%)	17 vs 3 doentes com LNIE	1,5 vezes (por doente)
Günther e col. ^[198] (2011)	Alemanha	Múltiplos	Retrospectivo	IC 0,1%	Pancolónica	150 ^D	8 (5,3%)	8 vs 0 doentes com LNIE	Não mencionado
Hlavaty e col. ^[199] (2011)	Eslováquia	Múltiplos	Coorte prospectiva. Exames sequenciais ^A	IC 0,4%	Pancolónica ^B	45 ^D	7 (15,6%)	7 vs 0 doentes com LNIE	Não mencionado

CR - cromoendoscopia; CC - colonoscopia convencional; AM - azul de metileno; IC - índigo carmin; LNIE - lesões com NIE

A- Os mesmos doentes fizeram, sequencialmente, os dois exames - primeiro CC e depois CR.

B - Lesões circunscritas salientadas pela cromoscopia foram avaliadas por endomicroscopia antes de serem biopsadas/removidas.

C- Apenas doentes com colite ulcerosa

D - Doentes com colite ulcerosa e doentes com colite de Crohn

7.2.3. Inclusão da cromoendoscopia nas *guidelines*

Com a crescente acumulação de evidência de superioridade da cromoendoscopia relativamente à colonoscopia convencional com biopsias aleatórias no rastreio de CCR associado à DII, várias sociedades e grupos científicos têm incluído a cromoendoscopia como uma alternativa e, progressivamente, como método preferencial de rastreio, desde que a sua aplicação seja efectuada por operador com experiência na técnica [169,200-204].

7.2.4. Limitações e problemas

Apesar da evidência acumulada na última década em favor da utilização da cromoendoscopia como método preferencial de rastreio em doentes com DII, a sua disseminação entre os Gastrenterologistas na prática clínica tem permanecido titubeante. Para este facto contribuem, indubitavelmente, algumas limitações associadas à técnica que, de seguida, se elencam.

A utilização da cromoendoscopia implica custos acrescidos, relacionados não só com os corantes mas também, e sobretudo, com o material, designadamente os cateteres, necessário para a sua aplicação [205]. Adita o acréscimo de tempo despendido com a realização do exame, ainda que, se a cromoendoscopia permitir abolir a necessidade de realização de biopsias aleatórias, determinará uma poupança de tempo que poderá, na verdade, compensar a duração adicional associada à utilização do corante [188]. Além disso, o manejo do corante implica algumas medidas de protecção do doente, dos operadores e da sala de exames [198].

Outra limitação prende-se com contingências que perturbam ou coarctam a qualidade da observação após a cromoendoscopia. Essa limitação pode resultar duma distribuição não uniforme do corante, circunstância passível de correcção, ou então derivar de condições não resolúveis durante o procedimento, como sejam a má preparação intestinal ou a inflamação, situações em que a cromoendoscopia não pode ser efectuada, devendo optar-se, nesse contexto, pela realização de biopsias aleatórias seriadas [205-207]. A limitação introduzida pela má preparação resulta, obviamente, da perturbação da distribuição do corante. No caso da inflamação, o problema decorre do facto de, nesse âmbito, a interacção da mucosa com o corante produzir um padrão de criptas que pode mimetizar alterações neoplásicas e, dessa forma, incrementar significativamente o risco de falsos positivos [187,206].

Outra categoria de limitações resulta não de deficiências da técnica propriamente dita, mas antes duma série de questões que aguardam exploração e conseqüente resposta. A primeira dessas questões diz respeito à curva de aprendizagem do procedimento, assunto que não se encontra cabal nem inequivocamente esclarecido, sendo apontados, apenas com suporte de recomendação de peritos, 20 a 30 exames para poder iniciar de forma autónoma e rotineira a sua aplicação prática [47,207,208]. Outra questão prende-se, directa

ou indirectamente, com a maior sensibilidade de detecção de displasia evidenciada pela cromoendoscopia, sendo necessário definir, nesse contexto, se os intervalos entre exames podem ou não ser maiores do que os classicamente considerados para a colonoscopia convencional [113,209]. É preciso também, pelo mesmo motivo, esclarecer qual a história natural da displasia detectada desta forma, que não é necessariamente igual à da displasia encontrada pelos métodos convencionais, o que poderá, naturalmente, ter importantes implicações terapêuticas [46,113,209]. Por outro lado, a superioridade diagnóstica da cromoendoscopia sobre a colonoscopia convencional foi demonstrada em trabalhos provenientes de centros de referência e incluindo doentes de alto risco, sendo essencial esclarecer se as mesmas vantagens se verificam em doentes de risco baixo e intermédio, ou seja, no contexto populacional, ou se, pelo contrário, a técnica deverá ser reservada para doentes e circunstâncias particulares que tenham associado risco mais elevado de NIE [46,177-180,197-199,210,211]. Por último, importa salientar que os estudos que avaliaram o papel da cromoendoscopia e a identificaram como uma mais valia no contexto do rastreio de CCR na DII, foram efectuados com colonoscópios convencionais de resolução *standard*, urgindo a necessidade de reavaliar a sua importância e utilidade com os novos colonoscópios de alta definição [46,177-180,190,197-199,206].

7.3. ENDOMICROSCOPIA

7.3.1. A técnica

Em Gastrenterologia, o diagnóstico e/ou *follow up* das doenças do tubo digestivo implica, comumente, a observação endoscópica com realização de biopsias, complementadas pela respectiva avaliação histológica.

No caso de algumas doenças, tais como a CU e o esófago de Barrett, desenvolveram-se protocolos de biopsias seriadas, estratégia dotada de efectividade clínica questionável, cuja implementação derivou da incapacidade técnica de identificar áreas suspeitas e, conseqüentemente, de realizar biopsias dirigidas. As biopsias aleatórias não excluem existência de lesão nas áreas não biopsadas, facto minimizado, mas não eliminado, através dos protocolos com múltiplas biopsias, embora a expensas do prolongamento do procedimento e da longanimidade do Anátomo-Patologista [212,213]. Acresce que a realização de múltiplas biopsias incrementa a probabilidade de ocorrência de complicações do procedimento, nomeadamente o risco de hemorragia e de infecção [212,213].

Por outro lado, detectam-se frequentemente nos exames endoscópicos lesões cujo manejo terapêutico, nomeadamente mucosectomia *versus* cirurgia, fica refém da colheita de biopsias e respectiva avaliação diferida, adiando a decisão terapêutica e podendo, eventualmente, determinar duplicação de exames [212,213]. Adita que a realização de biopsias condiciona geralmente uma reacção desmoplásica que poderá dificultar ou mesmo inviabilizar uma posterior ressecção endoscópica [214].

A EMC é um novo método de imagem que alia observação endoscópica e microscópica, ou seja, permite, durante o mesmo procedimento, complementar a avaliação endoscópica com a caracterização microscópica dos tecidos. É, de certa forma, uma endoscopia com biopsia virtual e histologia em tempo real, cuja avaliação microscópica inclui não só a caracterização estrutural mas também a apreciação de processos dinâmicos, tais como a perfusão e a permeabilidade microvascular. Trata-se, portanto, duma técnica com óbvias potencialidades de aplicação nas situações mencionadas nos dois parágrafos anteriores [178,212-215].

Nesta técnica, um laser emite uma energia de excitação com um comprimento de onda de 488nm (região azul do espectro), com uma potência máxima à superfície do tecido $\leq 1\text{mW}$, valor que não produz lesão celular [216,217]. O tecido alvo liberta uma luz que segue o trajecto inverso ao da energia de excitação, sendo filtrada por um diafragma que rejeita a luz emitida pelas áreas exteriores ao foco [216,217]. A luz filtrada é captada por um foto-detector que transforma os sinais luminosos em sinais eléctricos que são registados pelo computador e convertidos numa imagem bidimensional em escala de cinzentos que corresponde ao plano focado (o brilho da imagem produzida é proporcional à intensidade da energia detectada) [216,217]. Deste modo, o sistema de iluminação e o de detecção encontram-se focados no mesmo ponto o que justifica o sufixo da designação da técnica: confocal (focados no mesmo ponto) [216,217].

Existem dois sistemas de EMC: um integrado na extremidade de endoscópicos que, de resto, incluem os elementos convencionais (eCLE; Pentax, Tokyo, Japan) e outro através de sondas que são introduzidas pelo canal de trabalho de endoscópicos convencionais (pCLE; Cellvizio, Mauna Kea Technologies, Paris, France) [206,217].

No sistema de EMC integrado em endoscópio a profundidade máxima atingida é de $250\mu\text{m}$, o que corresponde à espessura habitual da mucosa [211,218,219]. O controlo da profundidade dos planos de captação das imagens é efectuado através de dois botões localizados junto aos comandos do endoscópio, obtendo-se a primeira aquisição à superfície e as seguintes em planos sucessivamente mais profundos, a intervalos de $35\mu\text{m}$ [220]. Cada aquisição (“corte”) corresponde a uma espessura de $7\mu\text{m}$ (resolução axial) e tem uma resolução lateral (distância mínima detectável entre dois pontos) de $0,7\mu\text{m}$ [218,219]. As imagens adquiridas são digitalizadas por um *scan* com uma taxa de captação de 0,8 frames/seg (1024×1024 pixels) ou 1,6 frames/seg (1024×512 pixels), obtendo-se micrografias bidimensionais [218,219]. Produzem-se, em média, 3 a 6 imagens de cada área de captação, procedimento que demora entre 5 a 10 segundos, isto é, menos do que o tempo necessário para efectuar uma biopsia. O aparelho de EMC é manuseado do mesmo modo que um endoscópio convencional, tem um diâmetro de 12,8mm (ligeiramente superior ao diâmetro de endoscópicos convencionais que varia entre 9,0-11,1 mm) e na sua extremidade distal, além dos elementos convencionais, existe uma saliência correspondente à janela de imagem confocal [221,222]. O canal de trabalho do aparelho encontra-se em posição adjacente à da janela de endomicroscopia permitindo, deste modo, a realização de biopsias dirigidas [212,213,220]. O campo de visão da EMC é aproximadamente de $0,5 \times 0,5\text{mm}$ enquanto uma biopsia obtém fragmentos com dimensões médias de $2 \times 2\text{mm}$. Não obstante, no caso do tecido obtido por

biopsia apenas algumas secções são efectivamente examinadas ao microscópio enquanto na EMC é avaliada uma maior extensão da amostra obtida. Assim, em termos globais, o número de criptas examinadas por cada fragmento de biopsia e por cada área de captação com EMC é semelhante [178].

No sistema de EMC por sonda a profundidade máxima que se pode avaliar é menor e, além disso, é fixa (não ajustável), ainda que diferentes sondas (com diâmetros que variam de 0,3mm a 4,2mm) permitam estudar profundidades diferentes (40-70; 55-65; 70-130 μm) [223-225]. O campo de visão (240-600 μm^2), a resolução axial (15-20 μm) e a resolução lateral (1,0-3,5 μm) são menores, mas a resolução temporal é superior (12 frames/seg) o que permite, ao contrário do sistema integrado, obter vídeos com registo de elementos funcionais como o fluxo sanguíneo [222,226,227]. Apesar do campo de visão ser, efectivamente, menor que o do sistema integrado, o facto de todas as imagens serem captadas à mesma profundidade e de forma rápida, permitiu desenvolver uma tecnologia (algoritmo computacional) designada de “mosaico” através da qual várias imagens são combinadas para incrementar a superfície abrangida, criando imagens panorâmicas correspondentes a uma área até 4x2mm [223-226]. O sistema de EMC por sonda tem, em comparação com o integrado, a desvantagem de apresentar menor estabilidade mecânica (elemento importante para estabilizar o contacto com a mucosa e obter imagens de melhor qualidade) mas, por outro lado, tem a vantagem da portabilidade podendo ser introduzido através do canal de trabalho de qualquer endoscópio, o que permite tomar a decisão de utilizar a técnica durante o procedimento e, além disso, acoplá-la a outras tecnologias como a alta-definição, o *Narrow Band Imaging (NBI)*, o *Fuji Intelligent Color Enhancement (FICE)* ou o *i-Scan* [211,228]. No que concerne a preços, a aquisição do sistema integrado é consideravelmente mais dispendiosa, mas, por seu turno, o sistema por sonda tem associados maiores custos de manutenção e apresenta uma menor longevidade [222,228].

Na tabela 7.2 encontram-se detalhadas, em delineamento comparativo, as características técnicas dos dois sistemas de EMC.

Tabela 7.2. Aspectos técnicos dos dois sistemas de EMC (eCLE e pCLE)

	eCLE	pCLE
Diâmetro exterior (mm)	12,8	0,3; 1,0; 2,6; 2,7; 4,2*
Comprimento (cm)	120; 180	300; 400*
Campo de visão	475 x 475 μm	240; 320; 600 μm^2 *
Resolução espacial lateral (μm)	0,7	1,0; 3,5*
Resolução espacial axial (μm)	7	15-20
Resolução temporal (frames/seg)	0,8-1,6	12
Magnificação	X1000	X1000
Profundidade da imagem (μm)	0-250 (dinâmica)	40-70; 55-65; 70-130 (fixa)*

* depende das várias sondas

Em termos de desempenho diagnóstico, nomeadamente na distinção entre lesões neoplásicas e não neoplásicas, ambos os sistemas revelaram excelente acurácia, mas, ainda assim, com vantagem significativa do sistema integrado de EMC, não só em termos de especificidade mas também de sensibilidade, tanto nas avaliações do tracto digestivo alto como nos estudos dirigidos ao cólon [228,229].

A tecnologia de EMC que temos disponível e que usámos nos trabalhos que suportam esta tese é a do sistema integrado em colonoscópio (Pentax EC-3870CIFK).

7.3.2. Contrastes

A autofluorescência dos tecidos não é suficiente para produzir imagens com contraste adequado entre as diversas estruturas, pelo que a optimização da técnica implica a utilização de agentes de contraste [230].

A fluoresceína (fluoresceína sódica; 5 a 10mL de solução a 10%) é o contraste mais frequentemente usado ainda que, na verdade, a sua utilização clínica só se encontre formalmente aprovada para a angiografia da retina [231]. Não obstante, existe uma ampla utilização *off-label* deste agente no âmbito da EMC [227,232]. A fluoresceína é administrada por via endovenosa e liga-se fortemente à albumina salientando o padrão vascular [219,233]. A parte restante, não ligada à albumina, atravessa os capilares sendo captada, num processo pH dependente, pelo citoplasma e pela matriz extracelular [219,233]. As células calciformes e as células neoplásicas, dadas as propriedades ácidas, evidenciam escassa captação do contraste e, por isso, surgem a negro [225]. O contraste evidencia-se em poucos segundos (até 20 segundos) após a administração e mantém-se por cerca de 30 minutos [224]. Na figura 7.1 encontram-se duas imagens de EMC, uma delas antes e outra depois da injeção de fluoresceína. Na imagem pós administração de contraste detalham-se as várias estruturas (Figura 7.1).

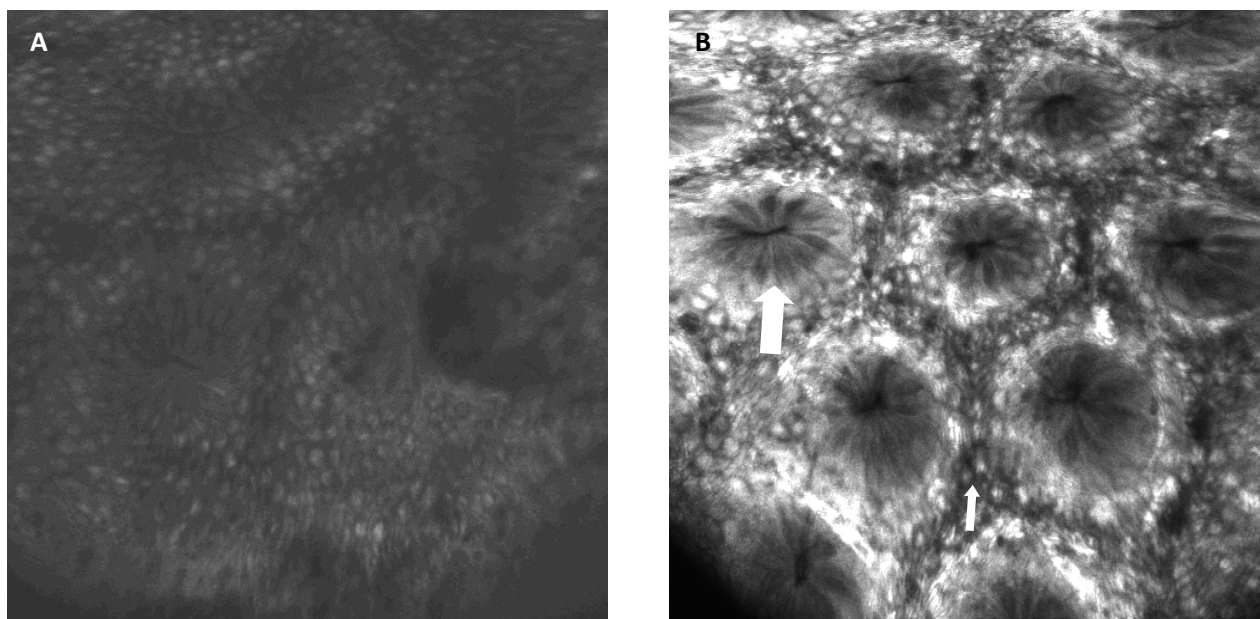


Figura 7.1. A – Imagem de EMC antes de administração de fluoresceína. B – Imagem de EMC após administração de fluoresceína: encontram-se assinalados a lâmina própria (seta pequena) e uma cripta (seta grande); na cripta a parte negra central corresponde ao lúmen e à sua volta existem células escuras (células caliciformes) e células mais claras (células epiteliais colunares).

A fluoresceína é um agente muito seguro cujos efeitos laterais mais comuns incluem a tonalidade amarelada da pele e o escurecimento da urina, ambos transitórios, resolvendo-se o primeiro em algumas horas e o segundo em 1-2 dias [215,234]. Um estudo multicêntrico, incluindo 16 centros com protocolos activos de investigação em EMC e envolvendo 2272 exames com utilização de fluoresceína, identificou apenas efeitos secundários ligeiros e somente em 1,4% dos procedimentos, designadamente náuseas, vômitos, hipotensão transitória (sem choque), eritema no local de injeção, exantema e dor epigástrica [235]. Efeitos adversos mais graves, tais como anafilaxia, reacção vasovagal e perturbações cardiorrespiratórias, são extremamente raros e, até à data, não foram reportados no contexto da EMC [225,228,235].

Como a fluoresceína não cora os núcleos, a EMC com este contraste não permite diferenciar entre displasia de baixo e de alto grau, dado que essa distinção depende da avaliação das características nucleares [233,236-238]. Esta é, na verdade, a principal limitação associada à utilização deste agente como contraste na EMC. Como se especifica de seguida, a complementação com aplicação tópica de acriflavina pode ajudar a superar esse problema [239].

A solução de acriflavina (hidroclorato de acriflavina; solução salina a 0,05%) é um contraste tópico que é captado pelos núcleos das células epiteliais superficiais (observação limitada até profundidade de 100 μm) [221,240]. É aplicado através do canal de trabalho, na quantidade 1-2mL por cada zona de observação, cerca de 30 segundos antes de proceder à captação das imagens. Após a coloração inicial não se verifica mudança do padrão de distribuição com o decorrer do tempo. A acriflavina foi originalmente desenvolvida como um

antifúngico incluído em soluções antissépticas de utilização tópica [221]. Apesar de não estarem relatados efeitos nefastos decorrentes da sua utilização clínica na EMC, pelo facto de se ligar ao núcleo e, em particular, ao seu conteúdo genético, a acriflavina é considerado um potencial agente carcinogénico, desincentivando, naturalmente, a sua utilização [215,241]. Uma alternativa é a aplicação tópica de cristal violeta que ao contrastar francamente o citoplasma permite, de forma indirecta, apreciar as características nucleares [242].

7.3.3. Utilidade

Como a EMC tem um pequeno campo de visão de alta resolução, as áreas de interesse devem ser previamente identificadas através da observação endoscópica (com ou sem cromoscopia) e só depois caracterizadas pela EMC [212,213]. A técnica serve, assim, não para identificar lesões mas sim para as caracterizar, ou seja, para aumentar a especificidade da observação endoscópica [178].

O objectivo subjacente à EMC não é a substituição da avaliação histológica mas antes reduzir o número de biopsias efectuadas através da realização de colheitas dirigidas aumentando, simultaneamente, a proporção de fragmentos com patologia que se enviam para avaliação pelo Anátomo-Patologista [223]. O elevado valor preditivo negativo da técnica suporta esta estratégia, tornando redundante a caracterização histológica de áreas cujo aspecto endomicroscópico se revele normal [243]. O emergir da EMC criou a expectativa de que a sua agremiação à endoscopia possa produzir um incremento da capacidade diagnóstica e possibilitar a redução do número de biopsias necessárias [225].

A sedimentação e ancoramento práticos desta técnica permitirão ainda abolir, em algumas situações, o atraso e diferimento de decisões que permanecem reféns do resultado histológico [221].

A DII, dado o carácter crónico recidivante, o risco de degeneração associado à doença de longa evolução e a crescente importância atribuída à cicatrização da mucosa com factor de avaliação de resposta e de predição de manutenção dessa resposta à terapêutica, emerge como umas das principais áreas de aplicação e desenvolvimento desta técnica [244-247].

7.3.4. Limitações

Em termos técnicos o actual sistema e método de aplicação da EMC encerra duas importantes limitações. Uma delas prende-se com a profundidade de avaliação que está limitada a um máximo de 250µm, o que equivale, sensivelmente, à espessura da mucosa, ou seja, não permite avaliar a existência de infiltração da submucosa (neoplasia invasiva) e, por isso, não possibilita a definição da ressecabilidade das lesões [212]. A outra diz respeito ao facto da fluoresceína, o contraste mais frequentemente utilizado, não corar os núcleos e, por esse motivo, não permitir distinguir entre displasia de baixo e de alto grau [233,236-238].

No que concerne ao manuseio e aplicação da técnica propriamente dita, a respectiva aprendizagem bem como a clara definição das variabilidades intra e inter-observador são duas importantes questões que têm de ser revolidas antes da EMC poder abandonar os actuais nichos investigacionais.

Uma reserva original associada à EMC e suportada pelos resultados de alguns trabalhos diz respeito à curva de aprendizagem da técnica e, conseqüentemente, à influência da experiência do operador nos resultados obtidos [228,233,248,249]. Não obstante, vários trabalhos recentes têm vindo a demonstrar que tanto a capacidade de interpretação das imagens de EMC bem como a capacidade de obtenção dessas mesmas imagens com boa qualidade podem ser aprendidas com rapidez mesmo por operadores inexperientes [226,250-253]. Na interpretação das imagens foram reportadas acurácias diagnósticas superiores a 80% após sessões de treino de apenas duas horas e no que diz respeito à obtenção de imagens de EMC foi descrita uma melhoria significativa do desempenho após os três primeiros exames [226,250,252,253]. Não se encontra, contudo, definido com clareza o processo e as etapas que devem sustentar a aprendizagem da técnica. Ainda assim, com suporte de recomendação de perito, é comum considerar um percurso com 4 etapas: 1- Aprendizagem de conceitos histológicos básicos; 2- Cursos de formação em EMC com avaliação de imagens *offline*, nomeadamente treino para reconhecer e caracterizar a mucosa normal e, posteriormente, identificação de diferentes patologias (essencialmente neoplasia e inflamação); 3 – Aplicação prática da técnica sob supervisão de perito; 4 – Aplicação prática da técnica de forma autónoma mas com confrontação histológica [219,222,223,233,254].

A variabilidade intra e inter-observador da EMC é outra questão fulcral, suscitada pela novidade e aparente complexidade da técnica, mas também pela conhecida e reconhecida variabilidade inter-observador entre Anátomo-Patologistas gastrointestinais na interpretação de displasia [11,113]. Este assunto foi, entretanto, explorado em vários trabalhos que apontam, na sua maioria, para bons valores de concordância tanto intra-observador (valor de $\kappa = 0,68$ a $0,84$) como inter-observador (valor de $\kappa = 0,72$ a $0,95$), mesmo para operadores sem ampla experiência com a técnica [222,251,255,256].

Não obstante os encorajadores resultados mencionados anteriormente no que se refere à curva de aprendizagem e à aferição das variabilidades intra e inter-observador da EMC, importa salientar dois elementos cuja consideração deve ser integrada na discussão deste assunto. Um deles diz respeito ao cenário estudado, nomeadamente se as imagens foram avaliadas *offline* ou em *real-time*, uma questão com óbvio e comprovado efeito no desempenho [257]. O facto da esmagadora maioria dos trabalhos referidos envolver avaliações *offline* e, por isso, com a previsível interferência da selecção de imagens e da ausência da pressão duma decisão *on table*, aconselha uma interpretação cautelosa dos resultados. Acresce a importância da definição do contexto clínico analisado, já que a inflamação, condição frequente na CU, pode interferir com a reprodutibilidade e a acurácia de identificação de neoplasia através de EMC, à semelhança do que acontece na avaliação histológica [40,42].

Por último, existem alguns elementos legais e operacionais que precisam de ser explorados e esclarecidos antes de se definir e sedimentar o lugar da EMC no armamentário diagnóstico. O equipamento de EMC tem um custo elevado, a aplicação da técnica prolonga o procedimento (em média cerca de 30 minutos), os resultados promissores são provenientes, invariavelmente, de centros de referência e, não menos importante, o custo-benefício da sua utilização não se encontra estabelecido [213,215,216]. Acresce que a implementação prática da EMC enfrenta algumas reservas médico-legais, nomeadamente a tomada de decisões como a realização ou não de biopsias ou a remoção ou não de lesões com base nos resultados da avaliação da EMC sem confirmação histológica, conduta que ainda não tem, na verdade, suporte nas recomendações práticas [204,206,216].

As questões anteriormente elencadas não colocam em causa o potencial da técnica nem devem obstar à prossecução da sua exploração e validação, mas sublinham a actual inexistência de evidência suficiente para resgatar para a prática diária uma ferramenta que a investigação tem revelado fascinante.

7.3.5. Identificação de neoplasia através de endomicroscopia confocal

Para identificação de neoplasia através do sistema de EMC eCLE (o que dispomos e que usámos nos trabalhos que suportam esta tese) foram desenvolvidos e validados três sistemas de avaliação/classificação: o original e mais amplamente utilizado é o de Mainz/Kiesslich e os outros dois, desenvolvidos posteriormente, são o de Sanduleanu e de Xie/Qilu [238,239,258]. Destes sistemas o de Sanduleanu é o único que propõe características distintivas entre displasia de baixo e de alto grau, com base nas características nucleares salientadas pela utilização da acriflavina como agente de contraste [239]. Os critérios endomicroscópicos de identificação de neoplasia dos diversos sistemas encontram-se minudenciados no quadro 7.2.

Quadro 7.2. Sistemas de avaliação e classificação endomicroscópica de neoplasia

Sistema de classificação	Critérios endomicroscópicos sugestivos de neoplasia
Mainz/Kiesslich [238]	<ul style="list-style-type: none"> • Arquitetura das criptas: epitélio irregular; depleção de criptas e de células caliciformes. • Arquitetura celular irregular e depleção de mucina. • Arquitetura dos vasos: capilares dilatados e distorcidos, com distribuição irregular e extravasamento de fluoresceína.
Sanduleanu [239]	<ul style="list-style-type: none"> • Arquitetura geral alterada: desde ligeira irregularidade de criptas, passando por eventual transformação vilosa ou aglomeração mais ou menos complexa de criptas com aumento da relação criptas/estroma, até alteração completa da morfologia com destruição das criptas. • Alterações ligeiras a moderadas do padrão vascular: vasos dilatados e irregulares; neoangiogénese e extravasamento de fluoresceína. • Características citonucleares: maturação epitelial superficial incompleta ou ausente; atipia citonuclear (ligeira – núcleos basais e perda da polaridade celular com pseudoestratificação; severa – núcleos de localização mais apical, alargados, arredondados e depleção de células caliciformes). • Ilhas de células malignas.
Xie/Qilu [258]	<ul style="list-style-type: none"> • Depleção de células caliciformes: epitélio das criptas homogeneamente escuro. • Arquitetura vilosa: substituição das criptas normais por epitélio com arquitetura vilosa. • Alterações microvasculares: microvasos com calibre e densidade aumentados e extravasamento irregular de fluoresceína.

Recentemente foi publicado um trabalho que avaliou, comparativamente, a acurácia e a concordância das três classificações endomicroscópicas de neoplasia [252]. Os sistemas de Mainz/Kiesslich, de Sanduleanu e de Xie/Qilu revelaram, respectivamente, acurácia de 84%, 81% e 87%, sensibilidade de 85%, 79% e 85% e especificidade de 83%, 84% e 89% ($p > 0,05$). Em termos de concordância da avaliação pelos diferentes sistemas, o valor de κ foi de 0,74 entre endoscopistas com experiência em EMC e de 0,79 entre endoscopistas não familiarizados com a técnica [252].

No nosso trabalho utilizámos o sistema de classificação de Mainz/ Kiesslich [238].

7.3.6. Aplicação da EMC no rastreio da DII

Tal como foi mencionado anteriormente, a utilização da EMC no rastreio em geral e na vigilância da DII em particular, não serve para salientar lesões ou áreas suspeitas, mas antes para as caracterizar depois de terem sido detectadas durante a avaliação endoscópica com ou sem cromoscopia.

O primeiro, mais importante e mais citado estudo de aplicação da EMC neste contexto foi realizado pelo grupo liderado por Kiesslich e publicado em 2007 [178]. Nesse trabalho foram incluídos, randomizados e analisados 153 doentes, dos quais 73 realizaram colonoscopia convencional com biopsias ou polipectomia de lesões identificadas além de biopsias aleatórias nos 4 quadrantes a cada 10cm, enquanto nos restantes 80 doentes as lesões circunscritas salientadas por cromoendoscopia com azul de metileno foram avaliadas por EMC (com sistema integrado em endoscópio – eCLE) antes de serem alvo de biopsia ou polipectomia [178]. No grupo que efectuou cromoendoscopia o número de NIE detectadas foi significativamente maior (19 vs. 4, $p = 0,005$) e, simultaneamente, o número médio de biopsias realizadas foi significativamente menor (3,9 vs. 42, $p < 0,05$) [178]. Acresce que se apenas tivessem sido biopsadas as áreas com aspecto suspeito na EMC o número médio de biopsias efectuadas por doente seria de 0,78 [178]. O desempenho da EMC na predição do diagnóstico de NIE revelou: sensibilidade = 94,7%, especificidade = 98,3%, acurácia = 97,8%, valor preditivo negativo = 99,1% e valor preditivo positivo = 90% [178].

Posteriormente, três estudos confirmaram o bom desempenho da EMC na predição do diagnóstico de NIE na DII, ainda que com acurácias diagnósticas menores que as relatadas no trabalho original de Kiesslich e usando amostras mais pequenas [199,243,259]. Os detalhes desses estudos encontram-se explanados na tabela 7.3.

Tabela 7.3. Estudos* de avaliação do desempenho da EMC na predição do diagnóstico de NIE na DII

	Nº doentes avaliados	Sistema de EMC	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	VPP	VPN
van den Broek F.J.C e col. [259]	22	pCLE	65%	82%	81%	-	-
Hlavaty T e col. [199]	30	eCLE	100%	98,4%	-	66,7%	100%
Rispo A e col. [243]	51	pCLE	100%	90%	-	83%	100%

* para além do estudo original de Kiesslich R.

VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo

Em dois desses trabalhos a performance da EMC no diagnóstico de NIE foi comparada com a da cromoendoscopia (cromoendoscopia virtual por *NBI* num dos trabalhos e cromoendoscopia com índigo carmim no outro), não se detectando diferenças significativas de acurácia [199,259]. Conclusão semelhante se obteve quando se incluíram nessa comparação os estudos de identificação de neoplasia fora do contexto da DII [228]. Importa contudo salientar o pequeno número de doentes incluídos nesses trabalhos e que, naturalmente, a ausência de diferença significativa poderá ter resultado das limitações impostas pelo tamanho da amostra [228].

Ainda no contexto da avaliação de lesões cólicas detectadas em doentes com DII, existe evidência de que ambos os sistemas de EMC (eCLE e pCLE) têm uma boa acurácia (da ordem dos 97%) na distinção entre lesões *adenoma-like mass* (ALM) e DALM [260,261].

7.3.7. Outras aplicações da EMC na DII ou com potencial aplicabilidade na DII

As duas principais áreas de utilidade da histologia na DII são a identificação e avaliação de alterações neoplásicas e inflamatórias. No que se refere à inflamação, a avaliação histológica serve, essencialmente, dois propósitos: auxiliar na definição do diagnóstico e identificar/graduar a inflamação, esta última especialmente importante em doentes sem actividade clínica e endoscópica, situação em que a existência de inflamação histológica se associa a aumento do risco de recidiva [208,262-265].

A EMC revelou, tanto na CU como na DC, uma boa correlação com a histologia, não só na identificação da inflamação mas também na avaliação e graduação dessa inflamação [266-268]. Como a EMC não permite distinguir diferentes tipos de células inflamatórias, como os neutrófilos ou os linfócitos, a avaliação da actividade inflamatória é feita através de parâmetros indirectos, nomeadamente a arquitectura das criptas, a arquitectura dos vasos e o extravasamento de fluoresceína [265,269]. Usando esses critérios e ancorados na

boa correlação com os achados histológicos, a EMC foi testada, com sucesso, em contexto clínico: revelou ser útil no diagnóstico da DII e na distinção entre CU e DC; demonstrou valor preditivo de recidiva em doentes clínica e endoscopicamente em remissão mas que mantinham alterações inflamatórias na avaliação por EMC [265-268,270,271].

Ainda no âmbito da avaliação morfológica, a EMC revelou utilidade em outras duas áreas da DII. A colite microscópica, tanto linfocítica como colagenosa, crescentemente considerada um elemento do espectro da DII, pode ser diagnosticada através de EMC, técnica que permite efectuar biopsias dirigidas em detrimento da clássica recomendação de realização de biopsias aleatórias, estratégia originalmente desenvolvida por se tratar duma patologia com distribuição segmentar e sem tradução endoscópica [272,273]. A avaliação da bolsa ileo-anal, em doentes submetidos a proctolomia, representa a outra área em que a EMC revelou utilidade, demonstrando uma excelente correlação com os achados histológicos [274].

Para além da avaliação morfológica anteriormente descrita, a EMC permite a avaliação de alguns fenómenos funcionais *in vivo*, abrindo uma janela de informação e exploração inacessível à histologia convencional. Neste contexto, vários trabalhos demonstraram que a avaliação do íleon pela EMC permite identificar a existência de desprendimento de células (*cell shedding*) e consequente desenvolvimento de fendas epiteliais (*gaps*), traduzindo quebras na barreira mucosa, sendo esses fenómenos mais comuns em doentes com DII do que em controlos e, ainda mais interessante, que a densidade desses fenómenos em doentes com DII tem relação não apenas com o risco de recidiva mas até com a probabilidade de hospitalização e com a necessidade de cirurgia [269,275-277]. Em termos conceptuais, a debilidade da barreira mucosa é vista como um elemento que facilita o contacto das bactérias intestinais com o sistema imune, fenómeno que se acredita ser importante na origem da DII. Esta convicção foi recentemente abonada não só pela identificação de bactérias intramucosas através de EMC mas também e sobretudo porque o número dessas bactérias é significativamente maior em doentes com DII do que em controlos sem essa patologia [278]. O enfraquecimento da barreira mucosa, traduzido pelo desprendimento de células e aparecimento de fendas, foi também descrito recentemente em avaliações endomicroscópicas da mucosa duodenal, sendo evidente em níveis significativamente superiores em doentes com DII (tanto DC como CU) em comparação com controlos [279]. No âmbito da DII, a exploração funcional pela EMC agrega fascinantes potencialidades, desde a exploração fisiopatológica até à tradução clínica, aproximando de forma sedutora essas duas áreas do conhecimento que fazendo sentido juntas se encontram muitas vezes demasiado distantes.

À apreciação morfológica e funcional seguiu-se, inevitavelmente, o interesse de aplicar a EMC na avaliação molecular. Embora o princípio subjacente seja semelhante ao da imunohistoquímica, a avaliação *in vivo* faculta um conjunto mais alargado de potenciais aplicações. O conceito envolve a marcação com fluoresceína de moléculas dirigidas a determinantes específicos do tecido alvo, usando a observação por EMC para diagnóstico, predição de resposta terapêutica e/ou avaliação dessa mesma resposta [240,280]. Um dos cenários mais atraentes e já explorado com sucesso diz respeito à marcação com fluoresceína de moléculas

dirigidas a determinantes neoplásicos mais ou menos específicos (como o factor de crescimento vascular endotelial ou o receptor do factor de crescimento epitelial) [281-284]. No âmbito da predição de resposta terapêutica foi publicado recentemente um trabalho que envolveu 25 doentes com DC [285]. Nesse estudo, marcaram-se com fluoresceína anticorpos dirigidos contra o receptor do TNF α e verificou-se que quanto maior a fluorescência detectada por EMC mais rápida e mais sustentada era a resposta aos fármacos anti-TNF α , existindo mesmo uma relação directa com a probabilidade de ocorrência de cicatrização da mucosa [285].

7.3.8. Avaliação/interpretação auxiliada por computador

A utilização de sistemas computacionais como auxiliares na avaliação e na interpretação de exames complementares de diagnóstico visa dois objectivos fundamentais: por um lado incrementar e uniformizar, tanto quanto possível, a acurácia diagnóstica e, por outro, abreviar o tempo despendido pelos operadores. Esses sistemas baseiam-se, geralmente, em técnicas de reconhecimento de padrões, tecnologia correntemente usada em visão por computador para os mais diversos fins, que vão da detecção e localização de objectos, ao reconhecimento de sítios e lugares, passando pela interpretação de acções humanas [286-290]. Essa tecnologia já foi igualmente desenvolvida e testada com relativo sucesso em vários cenários clínicos, nomeadamente na detecção de pólipos em vídeos endoscópicos, na identificação dessas mesmas lesões na colonografia por TC e na classificação automática de imagens obtidas por *NBI* [291-293]. O reconhecimento de padrões também já foi aplicado com êxito a imagens de microscopia confocal no contexto de diversos estudos celulares [294,295]. No âmbito da EMC estão a emergir alguns estudos com resultados interessantes, envolvendo a aplicação de sistemas computacionais na avaliação de vídeos de EMC obtidos através de sonda (pCLE), em contextos clínicos diferentes da DII [234,296,297]. No que diz respeito à avaliação de imagens de EMC obtidas por sistema integrado em endoscópico (eCLE) e, especificamente, no cenário da DII, a técnica de reconhecimento de padrões ainda não foi explorada. Trata-se, contudo, duma área com elevado potencial de aplicação da tecnologia, se atendermos a que é previsível que um dos obstáculos à utilização da EMC residirá no prolongamento do tempo do exame relacionado com a interpretação das numerosas imagens obtidas, elemento difícil de diluir mesmo após treino alargado.

7.3.9. Inovações técnicas

Estão em desenvolvimento alguns aperfeiçoamentos técnicos no sistema de endomicroscopia que visam, essencialmente, melhorar a resolução microscópica, aumentar o campo de visão e incrementar a profundidade dos planos estudados [298-301].

7.4. OUTRAS TECNOLOGIAS

Nesta secção discutem-se várias tecnologias que têm vindo a ser desenvolvidas e cuja aplicação no rastreio da DII, já testada nalguns casos e noutros apenas avocando potencial, poderá ser considerada em dois níveis da acção diagnóstica: um deles é a identificação de lesões sendo o outro a sua caracterização, ou seja, a predição do resultado histológico, nomeadamente a classificação das lesões em neoplásicas e não neoplásicas.

7.4.1. Colonoscopia óptica de alta definição

A resolução da colonoscopia óptica de alta definição varia entre 850 mil até mais de 1 milhão de pixéis enquanto na colonoscopia óptica *standard* oscila entre 100 mil e 400 mil pixéis [302]. É importante salientar a diferença entre resolução e magnificação: a resolução diz respeito à definição da imagem e é medida pelo número de pixéis enquanto na magnificação existe apenas uma ampliação das imagens (de 6x até 150x) sem interferência na resolução, ou seja, sem incremento da densidade de pixéis [222].

No que diz respeito à identificação de lesões displásicas em doentes com DII de longa evolução, Subramanian e col. compararam o desempenho da colonoscopia de alta definição com a da colonoscopia *standard* numa coorte retrospectiva de doentes com CU ou com DC (209 colonoscopias no grupo da alta definição e 160 colonoscopias no grupo da resolução *standard*) [303]. O sistema de alta definição revelou um desempenho significativamente melhor, tanto em termos de detecção global de displasia (2,21; IC 95%: 1,09-4,45) como na detecção de displasia em biopsias dirigidas (2,99; IC 95%: 1,16-7,79) [303]. Estes resultados, sendo interessantes, precisam de ser confirmados em estudos prospectivos randomizados. Além disso, é necessário desenvolver trabalhos que comparem a colonoscopia de alta definição com essa mesma tecnologia acoplada a cromoscopia, para esclarecer se, neste novo contexto, a utilização de corante continua a representar acréscimo de valor diagnóstico.

7.4.2. NBI

O *NBI* é uma tecnologia que se baseia na utilização de filtros para restringir o espectro da luz emitida a comprimentos de onda que são preferencialmente absorvidos pela hemoglobina (faixa azul e verde do espectro) permitindo, dessa forma, salientar as estruturas vasculares [222,298,304,305].

Três estudos randomizados compararam o desempenho do *NBI* com o da colonoscopia óptica no rastreio de doentes com DII de longa evolução [181,306,307]. Independentemente da geração de *NBI* utilizada e da definição da colonoscopia óptica (*standard* ou alta definição), não se detectaram diferenças entre os dois métodos no que diz respeito à detecção de displasia [181,306,307]. No mesmo contexto clínico, outros dois estudos randomizados compararam o *NBI* com a cromoendoscopia, não detectando diferenças entre os métodos na detecção de displasia, tanto na análise por doente como por número de lesões [308,309]. No

grupo de doentes rastreados com *NBI* o tempo despendido com o exame foi significativamente menor, mas, num desses trabalhos, verificou-se maior número de falsos positivos e, mais preocupante, maior percentagem de lesões não detectadas (31,8% vs. 13,6%) [308,309].

Quatro estudos avaliaram a performance do *NBI* na distinção entre lesões neoplásicas e não neoplásicas em doentes com CU de longa evolução [182,306,310,311]. Um caso clínico e um estudo piloto evidenciaram que a tortuosidade e o aumento da intensidade do padrão vascular se associavam a probabilidade aumentada de natureza neoplásica [310,311]. Não obstante, dois pequenos estudos randomizados revelaram um desempenho modesto do *NBI* na predição histológica, tanto em termos de sensibilidade como de especificidade [182,306]. Estes resultados contrastam com a boa acurácia da técnica na avaliação de lesões cólicas esporádicas, contexto em que o seu desempenho se revelou semelhante ao da cromoendoscopia convencional [312-314]. Esta discrepância resultará, pelo menos em parte, das alterações vasculares associadas à DII, mesmo quando clínica e endoscopicamente em remissão, circunstância que poderá interferir na acurácia do *NBI* que se baseia no padrão vascular para efectuar a caracterização das lesões [189]. Ainda assim, um estudo liderado por Watanabe demonstrou uma acurácia interessante do *NBI* na distinção entre lesões *ALM* e *DALM* em doentes com CU [315].

Para além do preço não despreciando, a técnica encerra outras limitações [316]. A acção de filtragem de luz subjacente à tecnologia determina uma intensidade luminosa menor que a da colonoscopia convencional, condicionando alguma limitação de observação, sobretudo à distância [134,222]. Por outro lado a caracterização das lesões, ao contrário da cromoendoscopia convencional, não se baseia no aspecto das criptas, mas antes no padrão vascular, pelo que a aplicação da técnica tem associada uma curva de aprendizagem adicional [317].

7.4.3. Fuji Intelligent Chromoendoscopy Enhancement (FICE) e i-Scan

Os sistemas de cromoendoscopia virtual *FICE* (Fujinon, Tokyo, Japan) e *i-Scan* (Pentax, Tokyo, Japan), ao contrário do *NBI*, não se baseiam na filtragem da luz emitida pelo aparelho, mas antes num algoritmo computacional que modifica as imagens ópticas após estas terem sido capturadas [222,318]. Esse sistema computacional permite decompor os diversos componentes da luz de retorno e, dessa forma, seleccionando diferentes comprimentos de onda é possível obter imagens com diferentes contrastes, salientando preferencialmente a superfície epitelial ou realçando predominantemente a estrutura vascular [220].

Apesar do óbvio potencial e do atractivo modo de funcionamento, o desempenho destas técnicas na identificação e/ou caracterização de lesões cólicas na DII ainda não foi explorado. Não obstante, começam a emergir alguns dados interessantes da sua aplicação tanto na identificação como na caracterização de lesões cólicas esporádicas [249,319].

7.4.4. Fluorescência endoscópica

Na fluorescência endoscópica a mucosa é exposta a uma luz com comprimento de onda curto (faixa azul do espectro) e, em resposta, é emitida pelos tecidos uma luz de comprimento de onda mais longo, cuja intensidade vai depender das propriedades, naturais ou induzidas, do tecido alvo [189,222]. A técnica pode basear-se apenas nas diferenças endógenas dos tecidos, nomeadamente no seu conteúdo em fluoróforos (autofluorescência) ou, em alternativa, no uso de agentes fotosensibilizadores mais ou menos específicos [127,229].

O primeiro trabalho envolvendo a aplicação da fluorescência endoscópica no rastreamento de doentes com CU de longa evolução foi publicado em 2003 [320]. Nesse estudo, liderado por Messmann, foram incluídos 37 doentes e utilizou-se o ácido 5-aminolevulínico, administrado por via oral e tópica, como fotossensibilizador (o ácido 5-aminolevulínico é convertido intracelularmente no fluoróforo protoporfirina IX, acumulando-se preferencialmente nas células neoplásicas), detectando-se displasia em 12 doentes, designadamente em 42 fragmentos de um total de 481 biopsias efectuadas [320]. A fluorescência endoscópica, especialmente com a aplicação tópica do fotossensibilizador, revelou níveis de acurácia interessantes na identificação de displasia, particularmente sensibilidade (87%-100%) e valor preditivo negativo elevados (98%-100%), mas com especificidade (51%-62%) e valor preditivo positivo (13%-14%) relativamente baixos [320]. Estes resultados encorajadores não foram confirmados num estudo publicado três anos mais tarde [321]. Nesse trabalho, 52 doentes com DII do cólon de longa evolução foram rastreados através de colonoscopia convencional e, também, por fluorescência usando o ácido 5-aminolevulínico administrado por via sistémica como fotossensibilizador [321]. Detectaram-se apenas duas lesões displásicas, ambas consideradas inocentes na avaliação pela fluorescência endoscópica [321].

Na autofluorescência, as desigualdades no espectro da luz emitida pelo tecido normal e pelo neoplásico parecem resultar das diferenças proporcionais do conteúdo celular, nomeadamente das mitocôndrias e dos lisossomas, bem como de alguns componentes tecidulares como a hemoglobina e o colagénio [189,229,322]. Nas imagens pseudocoloridas obtidas, a mucosa normal aparece a verde enquanto o tecido neoplásico assume tonalidade arroxeada [222,229]. Existem três estudos que pesquisaram a utilização desta técnica no rastreamento de neoplasia do cólon na DII [182,323,324]. Um deles é um estudo piloto que demonstrou que as lesões exofíticas com baixa autofluorescência possuíam uma probabilidade de terem natureza neoplásica significativamente superior à das lesões com autofluorescência elevada (45,0% vs. 13,3%) [323]. Noutro trabalho, 50 doentes com CU foram prospectivamente submetidos a rastreamento de neoplasia do cólon através de colonoscopia convencional e de autofluorescência, sendo a ordem de realização desses exames (primeiro colonoscopia ou primeiro autofluorescência) determinada por randomização [182]. Nos 25 doentes que realizaram primeiro avaliação por autofluorescência detectaram-se 10 lesões displásicas, não havendo nenhum achado adicional na colonoscopia convencional [182]. No grupo de doentes que efectuou colonoscopia convencional em primeiro lugar detectaram-se 3 lesões displásicas, às quais se adicionaram

outras 3 apenas descobertas na avaliação por autofluorescência [182]. Concluíram os autores que a proporção de lesões não detectadas pela colonoscopia convencional era significativamente superior à da autofluorescência ($p = 0,036$) [182]. O último estudo, publicado recentemente, analisou o impacto, imediato e a longo prazo, da avaliação do cólon por autofluorescência, nomeadamente em termos de risco de detecção, actual ou futura, de displasia [324]. Nesse trabalho, que incluiu 41 doentes com CU, a técnica identificou neoplasia em 10, dos quais 8 foram submetidos a colectomia com confirmação do diagnóstico [324]. Os 31 doentes em que a avaliação por autofluorescência se revelou negativa (sem lesões displásicas) foram depois incluídos em programa de rastreio com colonoscopia convencional a cada 2 anos, detectando-se neoplasia em apenas 2 casos (6%) após um seguimento médio global de 7,8 anos [324]. Com base nestes resultados, os autores concluíram que a autofluorescência evidencia alta sensibilidade e elevado valor preditivo positivo na detecção de neoplasia em doentes com CU [324].

As limitações da fluorescência endoscópica incluem o investimento necessário para adquirir a tecnologia e a curva de aprendizagem associada à sua aplicação e interpretação [189]. Acresce que as alterações da autofluorescência não são exclusivas dos tecidos neoplásicos, podendo ocorrer também na inflamação, o que pode minorar a especificidade da técnica [325]. Do mesmo modo, uma preparação intestinal inadequada pode embargar a autofluorescência dos tecidos, aumentando a probabilidade de resultados falsos positivos [323].

Actualmente o único sistema de autofluorescência disponível comercialmente está integrado num endoscópico trimodal, designação que se deve às três modalidades diagnósticas congregadas nesse aparelho: imagem óptica convencional, autofluorescência e *NBI* (Evis Lucera Spectrum; Olympus Medical Systems Corp, Tokyo, Japan) [222].

7.4.5. Endocitoscopia

A endocitoscopia (Olympus, Tokyo, Japan) é uma adaptação da microscopia óptica que permite a realização intraluminal de microscopia de contacto com magnificação da superfície da mucosa até 1400x, campo de visão até 700x600 μ m e obtenção de 30 frames/seg [326,327]. Tal como a EMC, a endocitoscopia existe em dois sistemas: integrada em endoscópio (magnificação até 580x) e em sondas que podem ser introduzidas através do canal de trabalho de qualquer endoscópio (magnificação até 1400x) [222,328,329].

Antes da avaliação endocitoscópica é necessário aplicar um corante absortivo, nomeadamente cristal violeta ou azul de toluidina para corar o citoplasma ou azul de metileno para delimitação dos núcleos [327,328]. A avaliação das imagens de endocitoscopia baseia-se na arquitectura geral (estrutura epitelial), características celulares (tamanho e arranjo das células) e padrão vascular (tamanho e tortuosidade dos vasos) [226]. Adicionalmente, a endocitoscopia permite a avaliação de características citológicas como a densidade celular, o tamanho e forma dos núcleos e a relação núcleo-citoplasma [226].

Existem poucos dados relativamente à utilização da endocitoscopia na DII. Na apreciação da actividade inflamatória, a endocitoscopia revelou uma boa correlação com a avaliação histológica e, ainda, uma interessante capacidade discriminativa dos diferentes tipos de células inflamatórias [330,331]. No que concerne à identificação de displasia, um pequeno estudo piloto sugeriu um bom desempenho na predição do diagnóstico histológico, dados que precisam de ser consubstanciados por investigação adicional [332].

Actualmente a endocitoscopia não se encontra comercialmente disponível na Europa nem nos Estados Unidos. A sua utilidade tem sido avaliada predominantemente no Japão, nomeadamente no estudo de pólipos e de carcinomas iniciais [329]. Tem existido, na realidade, pouco interesse na investigação em endocitoscopia, provavelmente pelo facto da técnica apresentar algumas desvantagens em relação à EMC: necessidade de aplicação tópica de corantes, avaliação limitada à superfície da mucosa e menor resolução (tanto axial como lateral) [222].

7.5. RECOMENDAÇÕES DE RASTREIO DE NEOPLASIA DO CÓLON NA DII

7.5.1. Elementos Gerais

O rastreio deve ser realizado, sempre que possível, com a doença em remissão [201,204,333,334]. A qualidade da preparação intestinal é um elemento crucial para que a avaliação se possa efectuar com segurança e acuidade [204].

De seguida, no texto e na tabela 7.4, especificam-se as recomendações relativas ao rastreio de neoplasia do cólon na DII, nomeadamente no que se refere ao seu início, intervalo e método de vigilância. Nos doentes com CEP, dado o risco de CCR especialmente elevado, essas recomendações não se aplicam, devendo iniciar-se o rastreio imediatamente após o diagnóstico, mantendo-o com periodicidade anual [201,204,333]. Nesses doentes a vigilância intensiva deve manter-se mesmo após eventual transplante hepático [47,201].

7.5.2. Início do Rastreio

Independentemente da extensão conhecida da doença, deve efectuar-se colonoscopia 6-10 anos após o início dos sintomas, incluindo realização de pelo menos duas biopsias em cada segmento para definição precisa da amplitude de atingimento do cólon (tabela 7.4) [201,204,333]. Os doentes com CU esquerda/extensa ou com colite de Crohn envolvendo pelo menos um terço do cólon têm indicação para inclusão em programas de rastreio [201,204,333]. Os doentes com proctite ulcerosa ou com colite de Crohn atingindo menos de um terço do cólon devem seguir a recomendações de rastreio da população geral [201,204,333,334].

Nessa avaliação é efectuada também, com base em factores clínicos e endoscópicos, uma categorização do risco de CCR que servirá de orientação na definição dos intervalos de rastreio [201,204,333].

7.5.3. Intervalos de Rastreio

Ao contrário das *guidelines* antigas que recomendavam a mesma periodicidade de vigilância para a maioria dos doentes, a generalidade das recomendações mais recentes reflecte nos intervalos de rastreio os factores de risco de neoplasia do cólon [172,200,201,204,333,335].

Nas *guidelines* da *European Crohn's and Colitis Organization (ECCO)* sugere-se colonoscopia cada 1-2 anos nos doentes de risco elevado e cada 3-4 anos nos de baixo risco [204]. Os factores de risco avaliados são a pancolite, a inflamação endoscópica e/ou histológica, os pseudopólipos e a história familiar de CCR, considerando-se de alto risco os doentes com três ou mais desses elementos e de baixo risco os restantes [204]. Se em duas colonoscopias consecutivas não for detectada NIE ou CCR e não existir inflamação endoscópica nem histológica, as avaliações podem passar a ser efectuadas com periodicidade de 3-4 anos [204].

A *British Society of Gastroenterology (BSG)* aconselha rastreio com intervalos de 1 ano, 3 anos e 5 anos para doentes de alto risco, risco intermédio e baixo risco, respectivamente. A categorização de risco é efectuada de acordo com os factores mencionados no quadro 7.3 [201].

Quadro 7.3. Categorização do risco de neoplasia do cólon de doentes com DII de acordo com as recomendações da BSG [201]

Baixo risco	Risco intermédio	Risco elevado
Colite extensa* sem actividade endoscópica/histológica	Colite extensa* com actividade endoscópica/histológica ligeira	Colite extensa* com actividade endoscópica/histológica moderada/grave
ou	ou	ou
Colite esquerda	Pseudopólipos	Estenose cólica nos últimos 5 anos
ou	ou	ou
Colite de Crohn de <50% do cólon	História familiar de CCR em familiar de primeiro grau \geq 50 anos	Displasia nos últimos 5 anos tendo recusado cirurgia
		ou
		CEP/transplante por CEP
		ou
		História familiar de CCR em familiar de primeiro grau < 50 anos

* incluindo colite de Crohn de \geq 50% do cólon

A *American Gastroenterological Association (AGA)* recomenda rastreio cada 1-2 anos, com espaçamento para 1-3 anos após duas colonoscopias consecutivas sem detecção de NIE [333]. Dentro desses intervalos a opção por um esquema mais um menos intensivo deverá ter em linha de conta a existência de factores de risco, designadamente: história familiar de CCR em familiar de primeiro grau, inflamação endoscópica e/ou histológica mantidas, cólon curto/tubular e múltiplos pseudopólipos [333]. Na doença com mais de 20 anos de evolução, o encurtamento do intervalo de rastreio, nomeadamente para 1-2 anos, deve ser considerado para os doentes com factores de risco [333].

O *American College of Gastroenterology (ACG)* mantém a recomendação de realização de colonoscopia de rastreio cada 1-2 anos independentemente da existência ou não de factores de risco adicionais para CCR [334].

Na tabela 7.4 encontra-se um sumário das diferentes recomendações sobre o intervalo de rastreio.

7.5.4. Método de Rastreio

Nas recomendações europeias a cromoendoscopia com biopsias dirigidas é considerada o método preferencial de rastreio, reservando-se a colonoscopia convencional, incluindo biopsias aleatórias, para as situações em que, por inexperiência ou limitações técnicas, a utilização de corante não é possível [201,204]. Nas recomendações americanas a colonoscopia convencional com protocolo de biopsias aleatórias seriadas mantém-se como método de primeira linha, sendo a cromoendoscopia considerada uma alternativa válida pela AGA, enquanto o ACG, embora reconheça que a utilização de corante possa realçar lesões planas e ser útil em algumas situações específicas (por exemplo doentes com displasia em mucosa plana que recusam cirurgia), não assume formalmente a técnica como uma alternativa de rastreio [333,334].

Os restantes métodos e técnicas são considerados ferramentas investigacionais, actualmente sem indicação formal para utilização na prática clínica [204,333].

Na tabela 7.4 encontram-se sintetizadas as diferentes recomendações relativas aos métodos de rastreio.

Tabela 7.4. Sumário das diferentes recomendações de rastreio de neoplasia do cólon em doentes com DII

Guidelines (ano)	Início da vigilância	Intervalo de vigilância	Método preferencial de rastreio	Método alternativo
BSG [201] (2010)	10 anos	Risco elevado: 1 ano Risco intermédio: 3 anos Risco baixo: 5 anos	Cromoendoscopia	Colonoscopia convencional com biopsias aleatórias
AGA [333] (2010)	≤ 8 anos	1-2 anos. Passa a 1-3 anos depois de 2 colonoscopias consecutivas sem NIE	Colonoscopia convencional com biopsias aleatórias	Cromoendoscopia
ACG [334] (2010)	8-10 anos	1-2 anos	Colonoscopia convencional com biopsias aleatórias	-
ECCO [204] (2012)	6-8 anos	Risco elevado: 1-2 anos Baixo risco: 3-4 anos	Cromoendoscopia	Colonoscopia convencional com biopsias aleatórias

7.5.5. Perspectivas

A categorização dos doentes de acordo com os factores de risco de neoplasia do cólon é, lógica e naturalmente, um elemento que deve influenciar a estratégia de rastreio. Essa circunstância, que já se encontra reflectida nos intervalos de vigilância sugeridos na maioria das recomendações mais recentes, poderá igualmente ter impacto não só na necessidade e na data de início do rastreio mas também na definição da(s) técnica(s) endoscópica(s) a utilizar. A investigação e esclarecimento destas questões são fundamentais

para aprimorar a estratégia de vigilância e, desse modo, fomentar uma maior adesão dos doentes aos programas de rastreio e garantir uma melhor gestão e alocação de recursos.

7.6. IMPACTO DO RASTREIO DE CCR EM DOENTES COM DII

O rastreio de CCR em geral e nos doentes com DII em particular, visa a prevenção ou diagnóstico precoce da patologia, pretendendo-se, em última análise, atenuar a sua incidência, diminuir a mortalidade, aumentar a sobrevida e alcançar esses objectivos com uma estratégia dotada de um perfil de custo-benefício tão favorável quanto possível.

7.6.1. Impacto clínico – mortalidade e sobrevida

A aferição efectiva e objectiva do impacto clínico da realização de rastreio de CCR em doentes com DII, nomeadamente através de estudos randomizados, implicaria a inclusão de um número considerável de doentes e seguimento por tempo prolongado (várias décadas), mas, mais importante, é obstaculizada por naturais e incontornáveis questões éticas. Assim, a informação existente deriva, inevitavelmente, de estudos observacionais.

Em 1990 uma equipa liderada por Lashner efectuou um estudo caso-controlo envolvendo 186 doentes com CU extensa com ≥ 8 anos de evolução, dos quais 91 estavam integrados em programa de rastreio de CCR [336]. A mortalidade relacionada com CCR foi de 4,4% no grupo rastreado e de 2,1% nos doentes que não realizavam vigilância (RR = 2,09; IC 95%: 0,39-11,12) [336]. Nos doentes alvo de rastreio a colectomia foi significativamente menos comum (36,3% vs. 53,7%, $p < 0,05$) e efectuada em média 4 anos mais tarde [336].

Volvidos três anos, Choi e col. avaliaram 41 doentes com CCR desenvolvido em contexto de CU e concluíram que nos doentes incluídos em programa de rastreio (19 doentes) o diagnóstico foi efectuado em estádios mais precoces (Dukes A/B: 78,9% vs. 40,9%, $p = 0,039$) e a sobrevida aos 5 anos era maior (77,2% vs. 36,3%, $p = 0,026$) [337].

Em 1998 o grupo de Karlén comparou 40 doentes com CU falecidos por CCR com um grupo controlo de 102 doentes também com CU, emparelhados em termos de idade, sexo, extensão e duração da doença, mas sem o mesmo desfecho [338]. Os autores verificaram que 2 doentes dos casos (5,0%) e 18 doentes dos controlos (17,6%) tinham histórico de realização de pelo menos uma colonoscopia (RR = 0,29; IC 95%: 0,06-1,31) [338]. Duas ou mais colonoscopias tinham sido efectuadas em 12 controlos (11,8%) e em apenas 1 caso (2,5%), ou seja, sugerindo um efeito de protecção directamente relacionado com o grau de exposição ao rastreio [338].

Uma revisão sistemática Cochrane baseada na análise dos três estudos mencionados anteriormente, concluiu pela ausência de evidência clara de que o rastreio de CCR através de colonoscopia em doentes com colite extensa se traduza no prolongamento da sobrevida [44]. Não obstante, os autores salientaram a existência de evidência de associação da vigilância endoscópica com um diagnóstico mais precoce da doença, ou seja, em estádios menos avançados, tendo esses doentes um prognóstico melhor [44]. Deste modo, consideraram haver evidência indirecta de que o rastreio se traduz na redução do risco de morte por CCR em doentes com DII [44].

Mais recentemente, em 2009, Lutgens MW e col. avaliaram 149 doentes com CCR associado a DII, dos quais 23 tinham histórico de realização de colonoscopia de rastreio antes do diagnóstico de neoplasia [339]. Nos doentes incluídos em rastreio o diagnóstico em estádios mais iniciais foi significativamente mais comum ($p = 0,004$) e, do mesmo modo, o seu prognóstico foi, de forma estatisticamente significativa, melhor, tanto em termos de sobrevida aos 5 anos (100% vs. 74%; $p = 0,042$) como no que se refere à taxa de mortalidade (4,3% vs. 23,0%; $p = 0,004$) [339].

7.6.2. Impacto económico – custo-benefício

Para além do impacto clínico, os programas de rastreio têm de ser igualmente escrutinados no que diz respeito ao seu custo-benefício. Nesse contexto, apesar dos dados serem escassos e até, por vezes, resultado de extrapolação, o rastreio de CCR em doentes com DII arroga um perfil de custo-benefício que é considerado favorável, não só quando comparado com a sigmoidoscopia flexível como método de rastreio da população de risco padrão, mas também quando confrontado com outras estratégias de vigilância amplamente aceites, como sejam a mamografia e a citologia do colo do útero [44,340-344].

Não existem estudos comparativos do custo-benefício de diferentes estratégias de rastreio, nomeadamente da cromoendoscopia *versus* colonoscopia convencional com protocolo de biopsias aleatórias seriadas. Da mesma forma, técnicas mais recentes e sofisticadas como a EMC, que sustentam potencial de predição histológica e, dessa forma, ostentam a ambição de diminuir consideravelmente o número de biopsias necessárias, ainda não são suportadas por dados de custo-benefício objectivos.

7.6.3. Limitações ao impacto do rastreio

É importante salientar e reconhecer as limitações dos programas de rastreio, nomeadamente que o CCR avançado pode ocorrer apesar da vigilância endoscópica e que o impacto do rastreio é limitado não apenas pela adesão dos doentes mas também pelo seu grau de aceitação das resoluções terapêuticas, em especial no que se refere à proctocolectomia [9,336,337,345-347].

CAPÍTULO 8. CLASSIFICAÇÃO E TRATAMENTO DA NEOPLASIA DO CÓLON NA CU

Os pólipos detectados proximalmente à área de atingimento pela DII podem ser assumidos como adenomas esporádicos e receber o tratamento respectivo, incluindo ressecção endoscópica [348,349]. As lesões com características particulares e necessidade de abordagem peculiar referem-se àquelas que se localizam no seio de área atingida pela DII. Neste contexto, a primeira importante divisão diz respeito à sua visibilidade endoscópica/macrocópica.

8.1. LESÕES ENDOSCOPICAMENTE/MACROSCOPICAMENTE NÃO VISÍVEIS

As lesões endoscopicamente/macrocopicamente não visíveis eram anteriormente designadas de displasia em mucosa plana, termo que deve ser evitado uma vez que também é utilizado para denominar lesões endoscopicamente visíveis mas com elevação mínima (<2,5mm), podendo, assim, criar ambiguidade de interpretação [350-352]. Classicamente, a detecção de displasia em biopsias aleatórias, ou seja, de displasia endoscopicamente/macrocopicamente não visível, constituía uma indicação formal e inequívoca para colectomia. Actualmente a abordagem é menos rígida e depende, entre outras coisas, do grau de displasia em causa.

Perante a detecção de displasia em biopsias aleatórias deve ser ponderada, antes de mais, a repetição da colonoscopia por um operador com experiência em cromoendoscopia para verificar se a displasia se torna, através desse método, endoscopicamente aparente e potencialmente ressecável por essa via [134]. Uma vez confirmada a invisibilidade endoscópica/macrocópica da displasia, a abordagem vai depender do grau da displasia detectada.

No caso de displasia de alto grau, atendendo a que o risco de CCR síncrono é de 40% a 70% e o de CCR metácrono de 25% a 30%, está indicada a realização de colectomia [9,139,142,353,354].

Tratando-se de displasia de baixo grau a decisão torna-se menos linear, fruto da disparidade dos dados existentes sobre a sua história natural. Quando se analisam diferentes estudos e diferentes tempos de seguimento encontram-se descritas taxas de progressão de displasia de baixo grau para displasia de alto grau ou CCR altamente variáveis: 19% (3 de 16) têm CCR em colectomia imediata, 34% (26 em 88) têm CCR em colectomia aos 12 meses, 50% (9 de 18) progridem para lesão mais avançada (displasia de alto grau ou CCR) após uma média de 32 meses, 15% (7 de 46) progridem para CCR aos 5 anos, 10% (3 de 29) progridem para displasia de alto grau ou CCR aos 10 anos [139,153,355-357]. Nos estudos com informação sobre a taxa de progressão de displasia de baixo grau para displasia de alto grau ou CCR aos 5 anos, os resultados oscilaram entre os 16% e os 54%, sendo discordantes os dados sobre se o risco de progressão associado à displasia de baixo grau multifocal é ou não mais elevado que o da unifocal [9,153,358-361]. Numa meta-análise, a displasia de baixo grau não visível foi associada a um risco 9 vezes superior de CCR e 12 vezes superior de displasia de

alto grau ou CCR em comparação com doentes com DII sem displasia [360]. Nesse mesmo trabalho, o valor preditivo positivo para CCR da displasia de baixo grau foi de 22% [360]. Estudos mais recentes revelaram taxas de progressão da displasia de baixo grau para CCR de 2% a 10% aos 10 anos, ou seja, significativamente mais baixas que as relatadas previamente [113,362]. Tendo estes dados como suporte, perante o diagnóstico de displasia de baixo grau endoscopicamente/macrosopicamente não visível devem discutir-se com o doente duas possibilidades de abordagem: colectomia ou intensificação da vigilância endoscópica [202,333,334]. Optando-se por intensificação da vigilância, a próxima colonoscopia deve ser efectuada dentro de 3 a 6 meses [169]. Caso não seja detectada displasia, os próximos exames devem ser efectuados a cada 6 meses [54,113]. Se for detectada novamente displasia, ainda que apenas de baixo grau, deverá ser ponderada a referência para colectomia [169]. Embora seja discutível e não suportado por evidência sólida, a displasia de baixo grau multifocal é, geralmente, considerada um argumento para escolher a opção cirúrgica [113].

Quando a avaliação histológica das biopsias aleatórias revela um resultado indefinido para displasia deve intensificar-se o programa de vigilância, nomeadamente com realização de colonoscopia dentro de 3 a 6 meses [54].

8.2. LESÕES ENDOSCOPICAMENTE/MACROSCOPICAMENTE VISÍVEIS

Originalmente, todas as lesões endoscopicamente aparentes em áreas de atingimento pela DII eram designadas *DALM* e, pelo risco de albergarem ou coexistirem com carcinoma, eram consideradas uma indicação formal para colectomia [136,351,352]. Actualmente, essas lesões endoscopicamente/macrosopicamente visíveis são divididas em duas categorias: *ALM* e *DALM*.

O termo *ALM* aplica-se a lesões endoscopicamente similares a um adenoma esporádico, sésseis ou pediculadas, com bordos bem definidos e sem displasia na mucosa circundante (devem ser feitas 4 biopsias na mucosa circundante) [207,363]. A ressecção endoscópica assume-se, actualmente, como a terapêutica recomendada para estas lesões, na sequência da acumulação de evidência de que essa estratégia se associa a um bom prognóstico, isto é, sem risco aumentado de desenvolvimento de CCR [164,202,333,334,348,349,352,364-367]. Odze e col. publicaram os dados de 18 doentes com CU que foram alvo de remoção de uma ou mais lesões *ALM* e que continuaram em programa de vigilância endoscópica, tendo sido detectado CCR em apenas 1 doente (após 7,5 anos) que era, na verdade, um doente de alto risco, na medida em que tinha história de transplante hepático por CEP [364]. Num trabalho liderado por Rubin, 48 doentes com DII submetidos a ressecção endoscópica de lesões tipo *ALM*, incluindo 2 doentes com displasia de alto grau e um com CCR não invasivo, foram mantidos em vigilância endoscópica, não se detectando CCR nem displasia em biopsias aleatórias após um seguimento de 4,1 anos [349]. Na experiência de Vieth e col., de 87 doentes com CU e com história de lesão *ALM* sancionada endoscopicamente, 2 doentes foram diagnosticados com CCR não invasivo em exames endoscópicos sequentes, após um seguimento médio de 4,4

anos [365]. Depois da remoção endoscópica deve efectuar-se colonoscopia de controlo dentro de 6 meses e, caso não seja detectada displasia, os próximos exames endoscópicos devem realizados com os intervalos convencionais [169,364].

O termo *DALM* fica reservado para as lesões com aspecto irregular, dissemelhante dum típico adenoma esporádico, ou que, independentemente do aspecto endoscópico, têm displasia em mucosa circundante endoscopicamente normal [207]. A colectomia é, por via de regra, o tratamento recomendado, sendo o CCR detectado na peça operatória em até 50% dos casos [42,169,366,369]. A ressecção endoscópica, descrita e bem sucedida em alguns casos, poderá ser uma opção terapêutica num número limitado de doentes [164,370-372]. Blonski e col. reportaram dados relativos a 6 doentes submetidos a remoção endoscópica de lesões tipo *DALM* com displasia de alto grau, que foram mantidos em vigilância endoscópica sem detecção de recorrência de displasia após um seguimento médio de 6 anos [372]. A ressecção endoscópica deste tipo de lesões é tecnicamente difícil, não apenas pelas suas características morfológicas mas também porque alterações inflamatórias e/ou cicatriciais dificultam, amiúde, a injeção submucosa e consequente elevação das lesões [134]. A possibilidade de remoção endoscópica só deve ser considerada quando se consegue uma boa demarcação dos bordos da lesão, nomeadamente com cromoscopia, e não existem sinais endoscópicos suspeitos de invasão submucosa, designadamente padrão de criptas marcadamente irregular, depressão mucosa, convergência radial de pregas, deformação com a insuflação-desinsuflação ou falência de elevação da lesão através de injeção submucosa [207]. À remoção endoscópica deve seguir-se uma intensificação da vigilância, cuja periodicidade adequada não se encontra estabelecida.

8.3. DISPLASIA EM DOENTES COM PSEUDOPÓLIPOS

O diagnóstico de displasia em doentes com número significativo de pseudopólipos é considerada uma indicação, mais ou menos formal, para colectomia, porque essas sequelas pós-inflamatórias dificultam a observação endoscópica e, desse modo, os doentes podem albergar lesões mais avançadas que tenham passado despercebidas, além de que uma eventual estratégia de manutenção ou intensificação da vigilância teria acuidade limitada [134].

8.4. IMPACTO DAS NOVAS TÉCNICAS

Os avanços na tecnologia endoscópica, incluindo a cromoendoscopia e, mais recentemente, a alta definição, além de melhorarem as capacidades diagnósticas, incrementaram o âmbito da intervenção endoscópica terapêutica, ao permitirem identificar e/ou delimitar lesões outrora mais ou menos inconspícuas.

8.5. INDICAÇÕES PARA COLECTOMIA

Em resumo, no âmbito das lesões neoplásicas da CU, constituem indicação para colectomia: displasia de alto grau endoscopicamente/macrosscopicamente não visível, displasia de baixo grau endoscopicamente/macrosscopicamente não visível multifocal ou recidivante, lesão endoscopicamente/macrosscopicamente visível não passível de ressecção endoscópica, carcinoma invasivo e displasia em contexto de pseudopólipos numerosos.

8.6. HISTOLOGIA

A displasia define-se pela transformação neoplásica do epitélio sem invasão da lâmina própria [42].

A detecção e caracterização da displasia encerram várias limitações, incluindo variabilidade intra e inter-observador não despididas [42,43]. Tanto em estudos prospectivos como retrospectivos, a concordância inter-observador na avaliação da displasia variou entre 42% e 72% [357,358,373-377]. Essa concordância é, como seria expectável, mais intensa nos dois extremos do espectro histológico da displasia (sem displasia e displasia de alto grau) e menor nas categorias intermédias (indefinido para displasia e displasia de baixo grau) [2,110]. Outra importante limitação da avaliação histológica da displasia reside no facto bem conhecido e reconhecido de que é difícil fazer a sua distinção de alterações inflamatórias e/ou regenerativas, circunstância que está na base da recomendação de realização do rastreio preferencialmente com a doença inactiva [40,42]. À luz destas limitações, as *guidelines* internacionais recomendam energicamente que qualquer diagnóstico de displasia seja confirmado por um segundo Anátomo-Patologista com experiência na área gastrointestinal [169,335,378].

Não existem critérios endoscópicos, histológicos e imunohistoquímicos que permitam, de forma clara e inequívoca, fazer a distinção entre adenoma esporádico, *DALM* e *ALM* [364]. Assim, na tentativa de minimizar, tanto quanto possível, a ambiguidade da terminologia, o termo NIE foi sugerido e, em seguida, utilizado para designar todo o tipo de lesões neoplásicas detectadas em doentes com DII [4,379]. A graduação histológica das lesões neoplásicas inclui, de acordo com a classificação de Viena, as seguintes categorias: negativo para neoplasia, indefinido para neoplasia, NIE de baixo grau, NIE de alto grau e neoplasia invasiva [379].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Crohn B, Rosenberg H. The sigmoidoscopic picture of ulcerative colitis (non-specific). *Am J Med Sci.* 1925;170:220–228.
2. Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2004;126:1634-1648.
3. Vagefi PA, Longo WE. Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Colorectal Cancer.* 2005;4:313-319.
4. Harpaz N, Ward SC, Mescoli C, et al. Precancerous lesions in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013;27:257-267.
5. Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18:1-5.
6. Ekobom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med.* 1990;323:1228-1233.
7. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 2001;48:526-535.
8. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, et al. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer.* 2001;91:854-862.
9. Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, et al. Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 2006;130:1030-1038.
10. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, et al. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12:205-211.
11. Dyson JK, Rutter MD. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J Gastroenterol.* 2012;18:3839-3848.
12. Jess T, Loftus EV Jr, Velayos FS, et al. Risk of intestinal cancer in inflammatory bowel disease: a population-based study from olmsted county, Minnesota. *Gastroenterology.* 2006;130:1039-1046.
13. Winther KV, Jess T, Langholz E, et al. Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004;2:1088-1095.
14. Söderlund S, Brandt L, Lapidus A, et al. Decreasing time-trends of colorectal cancer in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2009;136:1561-1567.
15. Jess T, Simonsen J, Jørgensen KT, et al. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology.* 2012;143:375-381.
16. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10:639-645.

17. Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ, et al. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:789-799.
18. Lutgens MW, Vleggaar FP, Schipper ME, et al. High frequency of early colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2008;57:1246-1251.
19. Heuschen UA, Hinz U, Allemeyer EH, Stern J, et al. Backwash ileitis is strongly associated with colorectal carcinoma in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2001;120:841-847.
20. Haskell H, Andrews CW Jr, Reddy SI, et al. Pathologic features and clinical significance of "backwash" ileitis in ulcerative colitis. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:1472-1481.
21. Smith MP, Loe RH. Sclerosing cholangitis; review of recent case reports and associated diseases and four new cases. *Am J Surg*. 1965;110:239-246.
22. Farraye FA, Odze RD, Eaden J, et al. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2010;138:746-774
23. Broomé U, Lindberg G, Löfberg R. Primary sclerosing cholangitis in ulcerative colitis -a risk factor for the development of dysplasia and DNA aneuploidy? *Gastroenterology*. 1992;102:1877-1880.
24. Broomé U, Löfberg R, Veress B, et al. Primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: evidence for increased neoplastic potential. *Hepatology*. 1995;22:1404-1408.
25. Kornfeld D, Ekbohm A, Ihre T. Is there an excess risk for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis and concomitant primary sclerosing cholangitis? A population based study. *Gut*. 1997;41:522-525.
26. D'Haens GR, Lashner BA, Hanauer SB. Pericholangitis and sclerosing Cholangitis are risk factors for dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1993;88:1174-1178.
27. Brentnall TA, Haggitt RC, Rabinovitch PS, et al. Risk and natural history of colonic neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1996;110:331-338.
28. Marchesa P, Lashner BA, Lavery IC, et al. The risk of cancer and dysplasia among ulcerative colitis patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 1997;92:1285-1288.
29. Shetty K, Rybicki L, Brzezinski A, et al. The risk for cancer or dysplasia in ulcerative colitis patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:1643-1649.
30. Aitola P, Mattila J, Matikainen M. Liver involvement in patients operated for ulcerative colitis, with special reference to the association of cholangitis with colorectal dysplasia and carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2000;15:167-171.
31. Loftus EV Jr, Sandborn WJ, Tremaine WJ, et al. Risk of colorectal neoplasia in patients with primary Sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*. 1996;110:432-440.
32. Nuako KW, Ahlquist DA, Sandborn WJ, et al. Primary sclerosing cholangitis and colorectal carcinoma in patients with chronic ulcerative colitis: a case-control study. *Cancer*. 1998;82:822-826.
33. Soetikno RM, Lin OS, Heidenreich PA, et al. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc*. 2002;56:48-54.

34. Loftus EV Jr, Aguilar HI, Sandborn WJ, et al. Risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis following orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 1998;27:685-690.
35. Higashi H, Yanaga K, Marsh JW, et al. Development of colon cancer after liver transplantation for primary sclerosing Cholangitis associated with ulcerative colitis. *Hepatology*. 1990;11:477-480.
36. Bleday R, Lee E, Jessurun J, et al. Increased risk of early colorectal neoplasms after hepatic transplant in patients with inflammatory bowel disease. *Dis Colon Rectum*. 1993;36:908-912.
37. Vera A, Gunson BK, Ussatoff V, et al. Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease after liver transplantation for primary Sclerosing cholangitis. *Transplantation*. 2003;75:1983-1988.
38. Lindberg BU, Broomé U, Persson B. Proximal colorectal dysplasia or cancer in ulcerative colitis. The impact of primary sclerosing cholangitis and sulfasalazine: results from a 20-year surveillance study. *Dis Colon Rectum*. 2001;44:77-85.
39. Claessen MM, Lutgens MW, van Buuren HR, et al. More right-sided IBD-associated colorectal cancer in patients with primary sclerosing cholangitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:1331-1336.
40. Odze RD. Pathology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35:533-552.
41. Ullman TA. Dysplasia and colorectal cancer in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36:S75-8; discussion S94-6.
42. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol*. 1983;14:931-968.
43. Judge TA, Lewis JD, Lichtenstein GR. Colonic dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2002;12:495-523.
44. Collins PD, Mpofo C, Watson AJ, et al. Strategies for detecting colon cancer and/or dysplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;19:CD000279.
45. Harpaz N. Neoplastic precursor lesions related to the development of cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2007;36:901-926
46. Marion JF, Waye JD, Present DH, et al. Chromoendoscopy Study Group at Mount Sinai School of Medicine. Chromoendoscopy-targeted biopsies are superior to standard colonoscopic surveillance for detecting dysplasia in inflammatory bowel disease patients: a prospective endoscopic trial. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:2342-2349.
47. Efthymiou M, Taylor AC, Kamm MA. Cancer surveillance strategies in ulcerative colitis: the need for modernization. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1800-1813.
48. Nuako KW, Ahlquist DA, Mahoney DW, et al. Familial predisposition for colorectal cancer in chronic ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology*. 1998;115:1079-1083.
49. Askling J, Dickman PW, Karlén P, et al. Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2001;120:1356-1362.
50. Velayos FS, Loftus EV Jr, Jess T, et al. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: A case-control study. *Gastroenterology*. 2006;130:1941-1949.

51. Greenstein AJ, Sachar DB, Smith H, et al. Cancer in universal and left-sided ulcerative colitis: factors determining risk. *Gastroenterology*. 1979;77:290-294.
52. Basseri RJ, Basseri B, Vassilaki ME, et al. Colorectal cancer screening and surveillance in Crohn's colitis. *J Crohns Colitis*. 2012;6:824-829.
53. Guagnozzi D, Lucendo AJ. Colorectal cancer surveillance in patients with inflammatory bowel disease: What is new? *World J Gastrointest Endosc*. 2012;4:108-116.
54. Ahmadi A, Polyak S, Draganov PV. Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: the search continues. *World J Gastroenterol*. 2009;15:61-66.
55. Karvellas CJ, Fedorak RN, Hanson J, et al. Increased risk of colorectal cancer in ulcerative colitis patients diagnosed after 40 years of age. *Can J Gastroenterol*. 2007;21:443-446.
56. Baars JE, Kuipers EJ, van Haastert M, et al. Age at diagnosis of inflammatory bowel disease influences early development of colorectal cancer in inflammatory bowel disease patients: a nationwide, long-term survey. *J Gastroenterol*. 2012;47:1308-1322.
57. Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2004;126:451-459.
58. Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. *Gastroenterology*. 2007;133:1099-1105.
59. Rubin DT, Huo D, Kinnucan JA, et al. Inflammation is an independent risk factor for colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11:1601-1608.
60. Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, et al. Cancer surveillance in longstanding ulcerative colitis: endoscopic appearances help predict cancer risk. *Gut*. 2004;53:1813-1816.
61. Baars JE, Looman CW, Steyerberg EW, et al. The risk of inflammatory bowel disease-related colorectal carcinoma is limited: results from a nationwide nested case-control study. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:319-328.
62. Kelly JK, Gabos S. The pathogenesis of inflammatory polyps. *Dis Colon Rectum*. 1987;30:251-254.
63. Gumaste V, Sachar DB, Greenstein AJ. Benign and malignant colorectal strictures in ulcerative colitis. *Gut*. 1992;33:938-941.
64. Reiser JR, Waye JD, Janowitz HD, et al. Adenocarcinoma in strictures of ulcerative colitis without antecedent dysplasia by colonoscopy. *Am J Gastroenterol*. 1994;89:119-122.
65. Munkholm P, Loftus EV Jr, Reinacher-Schick A, et al. Prevention of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: value of screening and 5-aminosalicylates. *Digestion*. 2006;73:11-19.
66. Bantel H, Berg C, Vieth M, et al. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:3452-3457.
67. Kaiser GC, Yan F, Polk DB. Mesalamine blocks tumor necrosis factor growth inhibition and nuclear factor kappaB activation in mouse colonocytes. *Gastroenterology*. 1999;116:602-609.

68. Pinczowski D, Ekblom A, Baron J, et al. Risk factors for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology*. 1994;107:117-120.
69. Eaden J, Abrams K, Ekblom A, et al. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000;14:145-153.
70. Bernstein CN, Blanchard JF, Metge C, et al. Does the use of 5-aminosalicylates in inflammatory bowel disease prevent the development of colorectal cancer? *Am J Gastroenterol*. 2003;98:2784-2788.
71. Velayos FS, Terdiman JP, Walsh JM. Effect of 5-aminosalicylate use on colorectal cancer and dysplasia risk: a systematic review and metaanalysis of observational studies. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:1345-1353.
72. Rubin DT, LoSavio A, Yadron N, et al. Aminosalicilate therapy in the prevention of dysplasia and colorectal cancer in ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:1346-1350.
73. van Staa TP, Card T, Logan RF, et al. 5-Aminosalicylate use and colorectal cancer risk in inflammatory bowel disease: a large epidemiological study. *Gut*. 2005;54:1573-1578.
74. Terdiman JP, Steinbuch M, Blumentals WA, et al. 5-Aminosalicylic acid therapy and the risk of colorectal cancer among patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:367-371
75. Ullman T, Croog V, Harpaz N, et al. Progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: effect of 5-aminosalicylic acid. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6:1225-1230.
76. Beaugerie L. Inflammatory bowel disease therapies and cancer risk: where are we and where are we going? *Gut*. 2012;61:476-483.
77. Sebastian S, Hernández V, Myrelid P, et al. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: results of the 3rd ECCO pathogenesis scientific workshop (I). *J Crohns Colitis*. 2014;8:5-18.
78. de Boer NK, Wong DR, Jharap B, et al. Dose-dependent influence of 5-aminosalicylates on thiopurine metabolism. *Am J Gastroenterol*. 2007;102:2747-2753.
79. Tung BY, Emond MJ, Haggitt RC, et al. Ursodiol use is associated with lower prevalence of colonic neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Ann Intern Med*. 2001;134:89-95.
80. Pardi DS, Loftus EV Jr, Kremers WK, et al. Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*. 2003;124:889-893.
81. Wolf JM, Rybicki LA, Lashner BA. The impact of ursodeoxycholic acid on cancer, dysplasia and mortality in ulcerative colitis patients with primary Sclerosing cholangitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22:783-788.
82. Eaton JE, Silveira MG, Pardi DS, et al. High-dose ursodeoxycholic acid is associated with the development of colorectal neoplasia in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:1638-1645.
83. Lindström L, Boberg KM, Wikman O, et al. High dose ursodeoxycholic acid in primary Sclerosing cholangitis does not prevent colorectal neoplasia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35:451-457.
84. Jørgensen KK, Lindström L, Cvančarova M, et al. Colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing Cholangitis undergoing liver transplantation: a Nordic multicenter study. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47:1021-1029.

- 85.** Rudolph G, Gotthardt DN, Kloeters-Plachky P, et al. In PSC with colitis treated with UDCA, most colonic carcinomas develop in the first years after the start of treatment. *Dig Dis Sci.* 2011;56:3624-3630.
- 86.** Ashraf I, Choudhary A, Arif M, et al. Ursodeoxycholic acid in patients with ulcerative colitis and primary Sclerosing cholangitis for prevention of colon cancer: a meta-analysis. *Indian J Gastroenterol.* 2012;31:69-74.
- 87.** Sjöqvist U, Tribukait B, Ost A, et al. Ursodeoxycholic acid treatment in IBD-patients with colorectal dysplasia and/or DNA-aneuploidy: a prospective, double-blind, randomized controlled pilot study. *Anticancer Res.* 2004;24:3121-3127.
- 88.** Matula S, Croog V, Itzkowitz S, et al. Chemoprevention of colorectal neoplasia in ulcerative colitis: the effect of 6-mercaptopurine. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:1015-1021.
- 89.** Connell WR, Kamm MA, Dickson M, et al. Long-term neoplasia risk after azathioprine treatment in inflammatory bowel disease. *Lancet.* 1994;343:1249-1252.
- 90.** van Schaik FD, van Oijen MG, Smeets HM, et al. Thiopurines prevent advanced colorectal neoplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2012;61:235-240.
- 91.** Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:875-884.
- 92.** Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med.* 1998;129:517-524.
- 93.** Kim YI, Pogribny IP, Basnakian AG, et al. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:46-52.
- 94.** Phelip JM, Ducros V, Faucheron JL, et al. Association of hyperhomocysteinemia and folate deficiency with colon tumors in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14:242-248.
- 95.** Lashner BA. Red blood cell folate is associated with the development of dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1993;119:549-554.
- 96.** Biasco G, Zannoni U, Paganelli GM, et al. Folic acid supplementation and cell kinetics of rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:469-471.
- 97.** Lashner BA, Heidenreich PA, Su GL, et al. Effect of folate supplementation on the incidence of dysplasia and cancer in chronic ulcerative colitis. A case-control study. *Gastroenterology.* 1989;97:255-259.
- 98.** Lashner BA, Provencher KS, Seidner DL, et al. The effect of folic acid supplementation on the risk for cancer or dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1997;112:29-32.
- 99.** Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005;352:2184-2192.
- 100.** Vinogradova Y, Hippisley-Cox J, Coupland C, et al. Risk of colorectal cancer in patients prescribed statins, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and cyclooxygenase-2 inhibitors: nested case-control study. *Gastroenterology.* 2007;133:393-402.
- 101.** Bonovas S, Filioussi K, Flordellis CS, et al. Statins and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 18 studies involving more than 1.5 million patients. *J Clin Oncol.* 2007;25:3462-3468.

- 102.** Ali RA, Dooley C, Comber H, et al. Clinical features, treatment, and survival of patients with colorectal cancer with or without inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9:584-589.
- 103.** Westbrook AM, Szakmary A, Schiestl RH. Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: lessons learned from mouse models. *Mutat Res*. 2010;705:40-59.
- 104.** Goel GA, Kandiel A, Achkar JP, et al. Molecular pathways underlying IBD-associated colorectal neoplasia: therapeutic implications. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:719-730.
- 105.** McConnell BB, Yang VW. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2009;5:69-74.
- 106.** Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441:431-436.
- 107.** Maeda S, Omata M. Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci*. 2008;99:836-842.
- 108.** Rubin DC, Shaker A, Levin MS. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Front Immunol*. 2012;3:107.
- 109.** Salcedo R, Worschech A, Cardone M, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med*. 2010;207:1625-1636.
- 110.** Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14:378-389.
- 111.** Itzkowitz S. Colon carcinogenesis in inflammatory bowel disease: applying molecular genetics to clinical practice. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36:S70-74; discussion S94-96.
- 112.** Willenbacher 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;154:1825-1830.
- 113.** Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, et al. Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2011;4:53-61.
- 114.** Willenbacher RF, Zelman SJ, Ferrell LD, et al. Chromosomal alterations in ulcerative colitis-related neoplastic progression. *Gastroenterology*. 1997;113:791-801.
- 115.** Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP, et al. Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res*. 1996;56:1237-1240.
- 116.** Yin J, Harpaz N, Tong Y, et al. p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. *Gastroenterology*. 1993;104:1633-1639.
- 117.** Chaubert P, Benhattar J, Saraga E, et al. K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis. *Am J Pathol*. 1994;144:767-775.
- 118.** Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319:525-532.
- 119.** Burmer GC, Levine DS, Kulander BG, et al. c-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon carcinoma. *Gastroenterology*. 1990;99:416-420.
- 120.** Itzkowitz SH. Inflammatory bowel disease and cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 1997;26:129-139.

- 121.** Kulaylat MN, Dayton MT. Ulcerative colitis and cancer. *J Surg Oncol*. 2010;101:706-712.
- 122.** Suzuki H, Harpaz N, Tarmin L, et al. Microsatellite instability in ulcerative colitis-associated colorectal dysplasias and cancers. *Cancer Res*. 1994;54:4841-4844.
- 123.** 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.
- 124.** Issa JP, Ahuja N, Toyota M, et al. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res*. 2001;61:3573-3577.
- 125.** Pekow J, Dougherty U, Huang Y, et al. Gene signature distinguishes patients with chronic ulcerative colitis harboring remote neoplastic lesions. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:461-470.
- 126.** Watanabe T, Kobunai T, Toda E, et al. Gene expression signature and the prediction of ulcerative colitis-associated colorectal cancer by DNA microarray. *Clin Cancer Res*. 2007;13:415-420.
- 127.** Sinagra E, Tomasello G, Raimondo D, et al. Advanced endoscopic imaging for surveillance for dysplasia and colorectal cancer in inflammatory bowel disease: could the pathologist be further helped? *Saudi J Gastroenterol*. 2014;20:26-38.
- 128.** Löfberg R, Broström O, Karlén P, et al. DNA aneuploidy in ulcerative colitis: reproducibility, topographic distribution, and relation to dysplasia. *Gastroenterology*. 1992;102:1149-1154.
- 129.** Melville DM, Jass JR, Shepherd NA, et al. Dysplasia and deoxyribonucleic acid aneuploidy in the assessment of precancerous changes in chronic ulcerative colitis. Observer variation and correlations. *Gastroenterology*. 1988;95:668-675.
- 130.** Löfberg R, Broström O, Karlén P, et al. Colonoscopic surveillance in long-standing total ulcerative colitis--a 15-year follow-up study. *Gastroenterology*. 1990;99:1021-1031.
- 131.** Löfberg R, Broström O, Karlén P, et al. Carcinoma and DNA aneuploidy in Crohn's colitis--a histological and flow cytometric study. *Gut*. 1991;32:900-904.
- 132.** Kisiel JB, Yab TC, Nazer Hussain FT, et al. Stool DNA testing for the detection of colorectal neoplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37:546-554.
- 133.** Kisiel JB, Ahlquist DA. Stool DNA testing for cancer surveillance in inflammatory bowel disease: an early view. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013;6:371-380.
- 134.** Rutter MD, Riddell RH. Colorectal dysplasia in inflammatory bowel disease: a clinicopathologic perspective. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12:359-367.
- 135.** Harpaz N, Talbot IC. Colorectal cancer in idiopathic inflammatory bowel disease. *Semin Diagn Pathol*. 1996;13:339-357.
- 136.** Butt JH, Konishi F, Morson BC, et al. Macroscopic lesions in dysplasia and carcinoma complicating ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 1983;28:18-26.
- 137.** Shinozaki M, Watanabe T, Kubota Y, et al. High proliferative activity is associated with dysplasia in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum*. 2000;43:S34-39.

138. Tytgat GN, Dhir V, Gopinath N. Endoscopic appearance of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Eur J Cancer*. 1995;31A:1174-1177.
139. Bernstein CN, Shanahan F, Weinstein WM. Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? *Lancet*. 1994;343:71-74.
140. Schneider A, Stolte M. Clinical and pathomorphological findings in patients with colorectal carcinoma complicating ulcerative colitis. *Z Gastroenterol*. 1993;31:192-197.
141. von Herbay A, Herfarth C, Otto HF. Cancer and dysplasia in ulcerative colitis: a histologic study of 301 surgical specimen. *Z Gastroenterol*. 1994;32:382-388.
142. Connell WR, Talbot IC, Harpaz N, et al. Clinicopathological characteristics of colorectal carcinoma complicating ulcerative colitis. *Gut*. 1994;35:1419-1423.
143. Riegler G, Bossa F, Caserta L, et al. Colorectal cancer and high grade dysplasia complicating ulcerative colitis in Italy. A retrospective co-operative IG-IBD study. *Dig Liver Dis*. 2003;35:628-634.
144. Choi PM, Zelig MP. Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention. *Gut*. 1994;35:950-954.
145. Delaunoy T, Limburg PJ, Goldberg RM, et al. Colorectal cancer prognosis among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:335-342.
146. Mir-Madjlessi SH, Farmer RG, Easley KA, et al. Colorectal and extracolonic malignancy in ulcerative colitis. *Cancer*. 1986;58:1569-1574.
147. Lennard-Jones JE, Melville DM, Morson BC, et al. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut*. 1990;31:800-806.
148. Mescoli C, Albertoni L, D'incá R, et al. Dysplasia in inflammatory Bowel diseases. *Dig Liver Dis*. 2013;45:186-194.
149. Rubio CA, Befrits R. Colorectal adenocarcinoma in Crohn's disease: a retrospective histologic study. *Dis Colon Rectum*. 1997;40:1072-1078.
150. van der Woude CJ, Kleibeuker JH, Jansen PL, et al. Chronic inflammation, apoptosis and (pre-)malignant lesions in the gastro-intestinal tract. *Apoptosis*. 2004;9:123-130.
151. Zisman TL, Rubin DT. Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14:2662-2669.
152. Itzkowitz SH. Molecular biology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2006;35:553-571.
153. Ullman T, Croog V, Harpaz N, et al. Progression of flat low-grade dysplasia to advanced neoplasia in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2003;125:1311-1319.
154. Ullman T, Odze R, Farraye FA. Diagnosis and management of dysplasia in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:630-638.
155. Jensen AB, Larsen M, Gislum M, et al. Survival after colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a nationwide population-based Danish study. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:1283-1287.

- 156.** Brackmann S, Aamodt G, Andersen SN, et al. Widespread but not localized neoplasia in inflammatory bowel disease worsens the prognosis of colorectal cancer. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:474-481.
- 157.** Peyrin-Biroulet L, Lepage C, Jooste V, et al. Colorectal cancer in inflammatory bowel diseases: a population-based study (1976-2008). *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:2247-2251.
- 158.** Herrinton LJ, Liu L, Levin TR, et al. Incidence and mortality of colorectal adenocarcinoma in persons with inflammatory bowel disease from 1998 to 2010. *Gastroenterology.* 2012;143:382-389.
- 159.** Hrabec JE, Byrn JC, Button AM, et al. A matched case-control study of IBD-associated colorectal cancer: IBD portends worse outcome. *J Surg Oncol.* 2014;109:117-121.
- 160.** Rhodes JM, Campbell BJ. Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends Mol Med.* 2002;8:10-16.
- 161.** Bansal P, Sonnenberg A. Risk factors of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 1996;91:44-48.
- 162.** Morson BC, Pang LS. Rectal biopsy as an aid to cancer control in ulcerative colitis. *Gut.* 1967;8:423-434.
- 163.** Ransohoff DF, Riddell RH, Levin B. Ulcerative colitis and colonic cancer. Problems in assessing the diagnostic usefulness of mucosal dysplasia. *Dis Colon Rectum.* 1985;28:383-388.
- 164.** Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, et al. Most dysplasia in ulcerative colitis is visible at colonoscopy. *Gastrointest Endosc.* 2004;60:334-339.
- 165.** Rubin DT, Rothe JA, Hetzel JT, et al. Are dysplasia and colorectal cancer endoscopically visible in patients with ulcerative colitis? *Gastrointest Endosc.* 2007;65:998-1004.
- 166.** Blonski W, Kundu R, Lewis J, et al. Is dysplasia visible during surveillance colonoscopy in patients with ulcerative colitis? *Scand J Gastroenterol.* 2008;43:698-703.
- 167.** Kornbluth A, Sachar DB. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1371-1385.
- 168.** Rubin CE, Haggitt RC, Burmer GC, et al. DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1992;103:1611-1620.
- 169.** 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;11:314-321.
- 170.** Woolrich AJ, DaSilva MD, Korelitz BI. Surveillance in the routine management of ulcerative colitis: the predictive value of low-grade dysplasia. *Gastroenterology.* 1992;103:431-438.
- 171.** Choi PM. Predominance of rectosigmoid neoplasia in ulcerative colitis and its implication on cancer surveillance. *Gastroenterology.* 1993;104:666-667.
- 172.** Eaden JA, Mayberry JF. British Society for Gastroenterology; Association of Coloproctology for Great Britain and Ireland. Guidelines for screening and surveillance of asymptomatic colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2002;51:10-12.

- 173.** Kaltz B, Bokemeyer B, Hoffmann J, et al. Surveillance colonoscopy in ulcerative colitis patients in Germany. *Z Gastroenterol*. 2007;45:325-331.
- 174.** Obrador A, Ginard D, Barranco L. Review article: colorectal cancer surveillance in ulcerative colitis - what should we be doing? *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:56-63.
- 175.** Eaden JA, Ward BA, Mayberry JF. How gastroenterologists screen for colonic cancer in ulcerative colitis: an analysis of performance. *Gastrointest Endosc*. 2000;51:123-128.
- 176.** Geary RB, Wakeman CJ, Barclay ML, et al. Surveillance for dysplasia in patients with inflammatory bowel disease: a national survey of colonoscopic practice in New Zealand. *Dis Colon Rectum*. 2004;47:314-322.
- 177.** Matsumoto T, Nakamura S, Jo Y, et al. Chromoscopy might improve diagnostic accuracy in cancer surveillance for ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:1827-1833.
- 178.** Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, et al. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2007;132:874-882.
- 179.** Rutter MD, Saunders BP, Schofield G, et al. Pancolonic indigo carmine dye spraying for the detection of dysplasia in ulcerative colitis. *Gut*. 2004;53:256-260.
- 180.** 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;124:880-888.
- 181.** Dekker E, van den Broek FJ, Reitsma JB, et al. Narrow-band imaging compared with conventional colonoscopy for the detection of dysplasia in patients with longstanding ulcerative colitis. *Endoscopy*. 2007;39:216-221.
- 182.** van den Broek FJ, Fockens P, van Eeden S, et al. Endoscopic tri-modal imaging for surveillance in ulcerative colitis: randomised comparison of high-resolution endoscopy and autofluorescence imaging for neoplasia detection; and evaluation of narrow-band imaging for classification of lesions. *Gut*. 2008;57:1083-1089.
- 183.** Hurlstone DP, Kiesslich R, Thomson M, et al. Confocal chromoscopic endomicroscopy is superior to chromoscopy alone for the detection and characterisation of intraepithelial neoplasia in chronic ulcerative colitis. *Gut*. 2008;57:196-204.
- 184.** Shivakumar BM, Kumar BL, Bhat G, et al. Molecular alterations in colitis-associated colorectal neoplasia: study from a low prevalence area using magnifying chromo colonoscopy. *J Crohns Colitis*. 2012;6:647-654.
- 185.** Carr-Locke DL, Al-Kawas FH, Branch MS, et al. Technology status evaluation report: endoscopic tissue staining and tattooing. *Gastrointest Endosc*. 1996;43:652-657.
- 186.** Fennerty MB. Tissue staining. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 1994;4:297-311.
- 187.** Kiesslich R, Neurath MF. Chromoendoscopy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2012;41:291-302.
- 188.** Kiesslich R, Galle PR, Neurath MF. Endoscopic surveillance in ulcerative colitis: smart biopsies do it better. *Gastroenterology*. 2007;133:742-745.
- 189.** Naymagon S, Marion JF. Surveillance in inflammatory bowel disease: chromoendoscopy and digital mucosal enhancement. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2013;23:679-694.

- 190.** Subramanian V, Mannath J, Ragunath K, et al. Meta-analysis: the diagnostic yield of chromoendoscopy for detecting dysplasia in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33:304-312.
- 191.** Hardie LJ, Olliver JR, Wild CP, et al. Chromoendoscopy with methylene blue and the risk of DNA damage. *Gastroenterology.* 2004;126:623.
- 192.** Davies J, Burke D, Olliver JR, et al. Methylene blue but not indigo carmine causes DNA damage to colonocytes in vitro and in vivo at concentrations used in clinical chromoendoscopy. *Gut.* 2007;56:155-156.
- 193.** Nass JP, Connolly SE. Current status of chromoendoscopy and narrow band imaging in colonoscopy. *Clin Colon Rectal Surg.* 2010;23:21-30.
- 194.** Kiesslich R, Neurath MF. Chromoendoscopy with methylene blue and the risk of DNA damage: Reply. *Gastroenterology.* 2004;126:623-624.
- 195.** Kudo S, Tamura S, Nakajima T, et al. Diagnosis of colorectal tumorous lesions by magnifying endoscopy. *Gastrointest Endosc.* 1996;44:8-14.
- 196.** Kiesslich R, Neurath MF. Chromoendoscopy: an evolving standard in surveillance for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:695-696.
- 197.** Hurlstone DP, Sanders DS, Lobo AJ, et al. Indigo carmine-assisted high-magnification chromoscopic colonoscopy for the detection and characterisation of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis: a prospective evaluation. *Endoscopy.* 2005;37:1186-1192.
- 198.** Günther U, Kusch D, Heller F, et al. Surveillance colonoscopy in patients with inflammatory bowel disease: comparison of random biopsy vs. targeted biopsy protocols. *Int J Colorectal Dis.* 2011;26:667-672.
- 199.** Hlavaty T, Huorka M, Koller T, et al. Colorectal cancer screening in patients with ulcerative and Crohn's colitis with use of colonoscopy, chromoendoscopy and confocal endomicroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23:680-689.
- 200.** Biancone L, Michetti P, Travis S, et al. European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO). European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Special situations. *J Crohns Colitis.* 2008;2:63-92.
- 201.** Elsadani NN, East JE, Walters JR. New 2010 British Society of Gastroenterology colitis surveillance guidelines: costs and surveillance intervals. *Gut.* 2011;60:282-283.
- 202.** Cairns SR, Scholefield JH, Steele RJ, et al. British Society of Gastroenterology; Association of Coloproctology for Great Britain and Ireland. Guidelines for colorectal cancer screening and surveillance in moderate and high risk groups (update from 2002). *Gut.* 2010;59:666-689.
- 203.** Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, et al. Federal Committee of Physicians and Health Insurers. S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII). *Z Gastroenterol.* 2010;48:65-136.
- 204.** Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B, et al. European Crohn's and Colitis Organisation. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations. *J Crohns Colitis.* 2013;7:1-33.

- 205.** Neumann H, Neurath MF, Mudter J. New endoscopic approaches in IBD. *World J Gastroenterol.* 2011;17:63-68.
- 206.** Bessissow T, Bisschops R. Advanced endoscopic imaging for dysplasia surveillance in ulcerative colitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;7:57-67.
- 207.** Murthy SK, Kiesslich R. Evolving endoscopic strategies for detection and treatment of neoplastic lesions in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc.* 2013;77:351-359.
- 208.** Kamiński MF, Hassan C, Bisschops R, et al. Advanced imaging for detection and differentiation of colorectal neoplasia: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy.* 2014;46:435-449.
- 209.** Lukas M. Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis.* 2010;28:619-624.
- 210.** East JE. Colonoscopic Cancer Surveillance in Inflammatory Bowel Disease: What's New Beyond Random Biopsy? *Clin Endosc.* 2012;45:274-277.
- 211.** Iacucci M, Panaccione R, Ghosh S. Advances in novel diagnostic endoscopic imaging techniques in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:873-880.
- 212.** Kiesslich R, Goetz M, Neurath MF. Virtual histology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2008;22:883-897.
- 213.** Polglase AL, McLaren WJ, Skinner SA, et al. A fluorescence confocal endomicroscope for in vivo microscopy of the upper- and the lower-GI tract. *Gastrointest Endosc.* 2005;62:686-695.
- 214.** Hurlstone DP, Cross SS, Drew K, et al. An evaluation of colorectal endoscopic mucosal resection using high-magnification chromoscopic colonoscopy: a prospective study of 1000 colonoscopies. *Endoscopy.* 2004;36:491-498.
- 215.** Kiesslich R, Neurath MF. Endomicroscopy is born--do we still need the pathologist? *Gastrointest Endosc.* 2007;66:150-153.
- 216.** De Palma GD, Rispo A. Confocal laser endomicroscopy in inflammatory Bowel diseases: dream or reality? *World J Gastroenterol.* 2013;19:5593-5597.
- 217.** De Palma GD, Wallace MB, Giovannini M. Confocal laser endomicroscopy. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:216209.
- 218.** Hoffman A, Goetz M, Vieth M, et al. Confocal laser endomicroscopy: technical status and current indications. *Endoscopy.* 2006;38:1275-1283.
- 219.** Kiesslich R, Galle PR, Neurath MF (eds). *Atlas of Endomicroscopy.* Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007.
- 220.** Kiesslich R. Chromoendoscopy: what is its true value for ulcerative colitis surveillance? *Dig Dis.* 2010;28:445-451.
- 221.** Gheonea DI, Saftoiu A, Ciurea T, et al. Confocal laser endomicroscopy of the colon. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2010;19:207-211.
- 222.** Coda S, Thillainayagam AV. State of the art in advanced endoscopic imaging for the detection and evaluation of dysplasia and early cancer of the gastrointestinal tract. *Clin Exp Gastroenterol.* 2014;7:133-150.

- 223.** Goetz M, Watson A, Kiesslich R. Confocal laser endomicroscopy in gastrointestinal diseases. *J Biophotonics*. 2011;4:498-508.
- 224.** Jabbour JM, Saldua MA, Bixler JN, et al. Confocal endomicroscopy: instrumentation and medical applications. *Ann Biomed Eng*. 2012;40:378-397.
- 225.** Salvatori F, Siciliano S, Maione F, et al. Confocal Laser Endomicroscopy in the Study of Colonic Mucosa in IBD Patients: A Review. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:525098.
- 226.** Neumann H, Kiesslich R. Endomicroscopy and endocytoscopy in IBD. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2013;23:695-705.
- 227.** Arya AV, Yan BM. Ultra high magnification endoscopy: Is seeing really believing? *World J Gastrointest Endosc*. 2012;4:462-471.
- 228.** Su P, Liu Y, Lin S, et al. Efficacy of confocal laser endomicroscopy for discriminating colorectal neoplasms from non-neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2013;15:e1-12.
- 229.** Goetz M. Real-time histology in colonoscopy. *Gastroenterol Clin North Am*. 2013;42:567-575.
- 230.** Pierce MC, Javier DJ, Richards-Kortum R. Optical contrast agents and imaging systems for detection and diagnosis of cancer. *Int J Cancer*. 2008;123:1979-1990.
- 231.** Mandava N, Reichel E, Guyer D. *Fluoresceine and ICG Angiography*. 2nd ed. St. Louis, Missouri: Mosby; 2004.
- 232.** Paull PE, Hyatt BJ, Wassef W, et al. Confocal laser endomicroscopy: a primer for pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135:1343-1348.
- 233.** De Palma GD. Confocal laser endomicroscopy in the "in vivo" histological diagnosis of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*. 2009;15:5770-5775.
- 234.** André B, Vercauteren T, Buchner AM, et al. Software for automated classification of probe-based confocal laser endomicroscopy videos of colorectal polyps. *World J Gastroenterol*. 2012;18:5560-5569.
- 235.** Wallace MB, Meining A, Canto MI, et al. The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31:548-552.
- 236.** Smith LA, Tiffin N, Thomson M, et al. Chromoscopic endomicroscopy: in vivo cellular resolution imaging of the colorectum. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:1009-1023.
- 237.** Liu H, Li YQ, Yu T, et al. Confocal endomicroscopy for in vivo detection of microvascular architecture in normal and malignant lesions of upper gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:56-61.
- 238.** Kiesslich R, Burg J, Vieth M, et al. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology*. 2004;127:706-713.
- 239.** Sanduleanu S, Driessen A, Gomez-Garcia E, et al. In vivo diagnosis and classification of colorectal neoplasia by chromoendoscopy-guided confocal laser endomicroscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8:371-378.
- 240.** Gheonea DI, Cârțână T, Ciurea T, et al. Confocal laser endomicroscopy and immunoendoscopy for real-time assessment of vascularization in gastrointestinal malignancies. *World J Gastroenterol*. 2011;17:21-27.

241. DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Fluorescence and spectral imaging. *ScientificWorldJournal*. 2007;7:2046-2071.
242. Goetz M, Toermer T, Vieth M, et al. Simultaneous confocal laser endomicroscopy and chromoendoscopy with topical cresyl violet. *Gastrointest Endosc*. 2009;70:959-968.
243. Rispo A, Castiglione F, Staibano S, et al. Diagnostic accuracy of confocal laser endomicroscopy in diagnosing dysplasia in patients affected by long-standing ulcerative colitis. *World J Gastrointest Endosc*. 2012;4:414-420.
244. Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol*. 2008;14:3937-3947.
245. D'Haens G, Noman M, Baert F, et al. Endoscopic healing after infliximab treatment for Crohn's disease provides a longer time to relapse. *Gastroenterology*. 2002;122: A100.
246. Allez M, Lemann M, Bonnet J, et al. Long term outcome of patients with active Crohn's disease exhibiting extensive and deep ulcerations at colonoscopy. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:947-953.
247. Rutgeerts P, Malchow H, Vatn MH, et al. Mucosal healing in Crohn's disease patients is associated with reduction in hospitalizations and surgeries. *Gastroenterology*. 2002;123: A43.
248. De Palma GD, Staibano S, Siciliano S, et al. In vivo characterisation of superficial colorectal neoplastic lesions with high-resolution probe-based confocal laser endomicroscopy in combination with video-mosaicing: a feasibility study to enhance routine endoscopy. *Dig Liver Dis*. 2010;42:791-797.
249. Buchner AM, Shahid MW, Heckman MG, et al. Comparison of probe-based confocal laser endomicroscopy with virtual chromoendoscopy for classification of colon polyps. *Gastroenterology*. 2010;138:834-842.
250. Buchner AM, Gomez V, Heckman MG, et al. The learning curve of in vivo probe-based confocal laser endomicroscopy for prediction of colorectal neoplasia. *Gastrointest Endosc*. 2011;73:556-560.
251. Hoffman A, Rey JW, Mueller L, et al. Analysis of interobserver variability for endomicroscopy of the gastrointestinal tract. *Dig Liver Dis*. 2014;46:140-145.
252. Yuan XM, Li Z, Ji R, et al. Minimal influence of expertise on the evaluation of colorectal neoplastic lesions by confocal laser endomicroscopy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29:91-95.
253. Neumann H, Vieth M, Atreya R, et al. Prospective evaluation of the learning curve of confocal laser endomicroscopy in patients with IBD. *Histol Histopathol*. 2011;26:867-872.
254. Nguyen NQ, Leong RW. Current application of confocal endomicroscopy in gastrointestinal disorders. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:1483-1491.
255. Liu C, Li CQ, Zuo XL, et al. Confocal laser endomicroscopy for the diagnosis of colorectal cancer in vivo. *J Dig Dis*. 2013;14:259-265.
256. Kuiper T, Kiesslich R, Ponsioen C, et al. The learning curve, accuracy, and interobserver agreement of endoscope-based confocal laser endomicroscopy for the differentiation of colorectal lesions. *Gastrointest Endosc*. 2012;75:1211-1217.

- 257.** Shahid MW, Buchner AM, Raimondo M, et al. Accuracy of real-time vs. blinded offline diagnosis of neoplastic colorectal polyps using probe-based confocal laser endomicroscopy: a pilot study. *Endoscopy*. 2012;44:343-348.
- 258.** Xie XJ, Li CQ, Zuo XL, et al. Differentiation of colonic polyps by confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy*. 2011;43:87-93.
- 259.** van den Broek FJ, van Es JA, van Eeden S, et al. Pilot study of probe-based confocal laser Endomicroscopy during colonoscopic surveillance of patients with longstanding ulcerative colitis. *Endoscopy*. 2011;43:116-122.
- 260.** Hurlstone DP, Thomson M, Brown S, et al. Confocal endomicroscopy in ulcerative colitis: differentiating dysplasia-associated lesional mass and adenoma-like mass. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5:1235-1241.
- 261.** De Palma GD, Staibano S, Siciliano S, et al. In-vivo characterization of DALM in ulcerative colitis with high-resolution probe-based confocal laser endomicroscopy. *World J Gastroenterol*. 2011;17:677-680.
- 262.** Wright R, Truelove SR. Serial rectal biopsy in ulcerative colitis during the course of a controlled therapeutic trial of various diets. *Am J Dig Dis*. 1966;11:847-857.
- 263.** Riley SA, Mani V, Goodman MJ, et al. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut*. 1991;32:174-178.
- 264.** Barkin JA, Sussman DA, Abreu MT. Chromoendoscopy and Advanced Imaging Technologies for Surveillance of Patients with IBD. *Gastroenterol Hepatol*. 2012;8:796-802.
- 265.** Li CQ, Liu J, Ji R, et al. Use of confocal laser endomicroscopy to predict relapse of ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:45.
- 266.** Watanabe O, Ando T, Maeda O, et al. Confocal endomicroscopy in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:S286-90.
- 267.** Li CQ, Xie XJ, Yu T, et al. Classification of inflammation activity in ulcerative colitis by confocal laser endomicroscopy. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1391-1396.
- 268.** Neumann H, Vieth M, Atreya R, et al. Assessment of Crohn's disease activity by confocal laser endomicroscopy. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18:2261-2269.
- 269.** Liu JJ, Madsen KL, Boulanger P, et al. Mind the gaps: confocal endomicroscopy showed increased density of small bowel epithelial gaps in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45:240-245.
- 270.** Moussata D, Senouci L, Chauvenet M, et al. Can endomicroscopy predict relapse in patients with inflammatory bowel disease (IBD)? Presented at Digestive Disease Week; May 19–22, 2012; San Diego, California. Abstract 22.
- 271.** Buda A, Hatem G, Neumann H, et al. Confocal laser endomicroscopy for prediction of disease relapse in ulcerative colitis: A pilot study. *J Crohns Colitis*. 2014;8:304-311.
- 272.** Neumann H, Grauer M, Vieth M, et al. In vivo diagnosis of lymphocytic colitis by confocal laser endomicroscopy. *Gut*. 2013;62:333-334.
- 273.** Kiesslich R, Hoffman A, Goetz M, et al. In vivo diagnosis of collagenous colitis by confocal endomicroscopy. *Gut*. 2006;55:591-592.

274. Trovato C, Sonzogni A, Fiori G, et al. Confocal laser endomicroscopy for the detection of mucosal changes in ileal pouch after restorative proctocolectomy. *Dig Liver Dis.* 2009;41:578-585.
275. Kiesslich R, Duckworth CA, Moussata D, et al. Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2012;61:1146-1153.
276. Liu JJ, Wong K, Thiesen AL, et al. Increased epithelial gaps in the small intestines of patients with inflammatory bowel disease: density matters. *Gastrointest Endosc.* 2011;73:1174-1180.
277. Turcotte JF, Wong K, Mah SJ, et al. Increased epithelial gaps in the small intestine are predictive of hospitalization and surgery in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 2012;3:e19.
278. Moussata D, Goetz M, Gloeckner A, et al. Confocal laser endomicroscopy is a new imaging modality for recognition of intramucosal bacteria in inflammatory bowel disease in vivo. *Gut.* 2011;60:26-33.
279. Lim LG, Neumann J, Hansen T, et al. Confocal endomicroscopy identifies loss of local barrier function in the duodenum of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2014;20:892-900.
280. Hoetker MS, Goetz M. Molecular imaging in endoscopy. *United European Gastroenterol J.* 2013;1:84-92.
281. Goetz M, Ziebart A, Foersch S, et al. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology.* 2010;138:435-446.
282. Hsiung PL, Hardy J, Friedland S, et al. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. *Nat Med.* 2008;14:454-458.
283. Liu J, Zuo X, Li C, et al. In vivo molecular imaging of epidermal growth factor receptor in patients with colorectal neoplasia using confocal laser endomicroscopy. *Cancer Lett.* 2013 Apr 28;330:200-207.
284. Foersch S, Kiesslich R, Waldner MJ, et al. Molecular imaging of VEGF in gastrointestinal cancer in vivo using confocal laser endomicroscopy. *Gut.* 2010;59:1046-1055.
285. Atreya R, Neumann H, Neufert C, et al. In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. *Nat Med.* 2014;20:313-318.
286. Duda R, Hart P, Stock D. *Pattern Classification* (2nd Edition), Wiley- Interscience, 2000.
287. Bishop C. *Pattern Recognition and Machine Learning*, Springer, 2007.
288. David G. Lowe. *Distinctive image features from scale-invariant keypoints*. International Journal of Computer Vision, 60, 2 (2004).
289. Liebelt J, Schmidt C, Schertler K. *Viewpoint-Independent Object Class Detection using 3D Feature Maps*. Computer Vision and Pattern Recognition, 2008. CVPR 2008. IEEE Conference on. Volume, Issue, 23-28 June 2008 Page(s):1-8.
290. Sminchisescu C, Kanaujia A., Li Z, Metaxas D. *Conditional models for human motion recognition*. Technical Report CSRG-517, University of Toronto, March 2005.
291. Iakovidis DK, Maroulis DE, Karkanis SA. An intelligent system for automatic detection of gastrointestinal adenomas in video endoscopy. *Comput Biol Med.* 2006;36:1084-1103.
292. Näppi JJ, Frimmel H, Dachman AH, et al. Computerized detection of colorectal masses in CT colonography based on fuzzy merging and wall-thickening analysis. *Med Phys.* 2004;31:860-872.

- 293.** Takemura Y, Yoshida S, Tanaka S, et al. Computer-aided system for predicting the histology of colorectal tumors by using narrow-band imaging magnifying colonoscopy (with video). *Gastrointest Endosc.* 2012;75:179-185.
- 294.** Danckaert A, Gonzalez-Couto E, Bollondi L, et al. Automated recognition of intracellular organelles in confocal microscope images. *Traffic.* 2002;3:66-73.
- 295.** Ortiz de Solórzano C, García Rodríguez E, Jones A, et al. Segmentation of confocal microscope images of cell nuclei in thick tissue sections. *J Microsc.* 1999;193:212-226.
- 296.** Andre B, Vercauteren T, Buchner AM, et al. Learning semantic and visual similarity for endomicroscopy video retrieval. *IEEE Trans Med Imaging.* 2012;31:1276-1288.
- 297.** André B, Vercauteren T, Buchner AM, et al. Retrieval evaluation and distance learning from perceived similarity between endomicroscopy videos. *Med Image Comput Comput Assist Interv.* 2011;14:297-304.
- 298.** Kwon YS, Cho YS, Yoon TJ, et al. Recent advances in targeted endoscopic imaging: Early detection of gastrointestinal neoplasms. *World J Gastrointest Endosc.* 2012;4:57-64.
- 299.** Bisschops R. Technicalities of colonoscopy: endoscopic microscopy - where are we heading? *Dig Dis.* 2011;29:46-52.
- 300.** Carignan CS, Yagi Y. Optical endomicroscopy and the road to real-time, in vivo pathology: present and future. *Diagn Pathol.* 2012;7:98.
- 301.** Chun HJ, Kim ES, Cho BR. Scope and limitation of label-free multiphoton microscopy and probe-labeled two-photon microscopy for the endomicroscopic diagnosis. *Scanning.* 2013 Dec 24.
- 302.** Mårvik R, Langø T. High-definition television in medicine. *Surg Endosc.* 2006;20:349-350.
- 303.** Subramanian V, Ramappa V, Telakis E, et al. Comparison of high definition with standard white light endoscopy for detection of dysplastic lesions during surveillance colonoscopy in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:350-355.
- 304.** Matsumoto T, Kudo T, Iida M. *The significance of NBI observation for inflammatory bowel diseases.* In: Cohen J, editor. *Comprehensive atlas of high resolution endoscopy and narrowband imaging.* Oxford (United Kingdom): Blackwell Publishing; 2008. p. 149–60.
- 305.** Kuznetsov K, Lambert R, Rey JF. Narrow-band imaging: potential and limitations. *Endoscopy.* 2006;38:76-81.
- 306.** van den Broek FJ, Fockens P, van Eeden S, et al. Narrow-band imaging versus high-definition endoscopy for the diagnosis of neoplasia in ulcerative colitis. *Endoscopy.* 2011;43:108-115.
- 307.** Ignjatovic A, East JE, Subramanian V, et al. Narrow band imaging for detection of dysplasia in colitis: a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol.* 2012;107:885-890.
- 308.** Pellisé M, López-Cerón M, Rodríguez de Miguel C, et al. Narrow-band imaging as an alternative to chromoendoscopy for the detection of dysplasia in long-standing inflammatory bowel disease: a prospective, randomized, crossover study. *Gastrointest Endosc.* 2011;74:840-848.

- 309.** Bisschops R, Bessissow T, Baert FJ, et al. Chromo-endoscopy versus narrow band imaging in ulcerative colitis: a prospective randomized controlled trial. Presented at Digestive Disease Week; May 19–22, 2012; San Diego, California. Abstract 506.
- 310.** East JE, Suzuki N, von Herbay A, et al. Narrow band imaging with magnification for dysplasia detection and pit pattern assessment in ulcerative colitis surveillance: a case with multiple dysplasia associated lesions or masses. *Gut*. 2006;55:1432-1435.
- 311.** Matsumoto T, Kudo T, Jo Y, Esaki M, et al. Magnifying colonoscopy with narrow band imaging system for the diagnosis of dysplasia in ulcerative colitis: a pilot study. *Gastrointest Endosc*. 2007;66:957-965.
- 312.** Chiu HM, Chang CY, Chen CC, et al. A prospective comparative study of narrow-band imaging, chromoendoscopy, and conventional colonoscopy in the diagnosis of colorectal neoplasia. *Gut*. 2007;56:373-379.
- 313.** Rastogi A, Early DS, Gupta N, et al. Randomized, controlled trial of standard-definition white-light, high-definition white-light, and narrow-band imaging colonoscopy for the detection of colon polyps and prediction of polyp histology. *Gastrointest Endosc*. 2011;74:593-602.
- 314.** Wada Y, Kashida H, Kudo SE, et al. Diagnostic accuracy of pit pattern and vascular pattern analyses in colorectal lesions. *Dig Endosc*. 2010;22:192-199.
- 315.** Watanabe K, Sogawa M, Yamagami H, et al. Endoscopic differential diagnosis between ulcerative colitis-associated neoplasia and sporadic neoplasia in surveillance colonoscopy using narrow band imaging. *Dig Endosc*. 2011;23:143-149.
- 316.** ASGE Technology Committee, Song LM, Adler DG, et al. Narrow band imaging and multiband imaging. *Gastrointest Endosc*. 2008;67:581-589.
- 317.** Adler A, Pohl H, Papanikolaou IS, et al. A prospective randomised study on narrow-band imaging versus conventional colonoscopy for adenoma detection: does narrow-band imaging induce a learning effect? *Gut*. 2008;57:59-64.
- 318.** Sauk J, Hoffman A, Anandasabapathy S, et al. High-definition and filter-aided colonoscopy. *Gastroenterol Clin North Am*. 2010;39:859-881.
- 319.** Hoffman A, Kagel C, Goetz M, et al. Recognition and characterization of small colonic neoplasia with high-definition colonoscopy using i-Scan is as precise as chromoendoscopy. *Dig Liver Dis*. 2010;42:45-50.
- 320.** Messmann H, Endlicher E, Freunek G, et al. Fluorescence endoscopy for the detection of low and high grade dysplasia in ulcerative colitis using systemic or local 5-aminolaevulinic acid sensitisation. *Gut*. 2003;52:1003-1007.
- 321.** Ochsenkühn T, Tillack C, Stepp H, et al. Low frequency of colorectal dysplasia in patients with long-standing inflammatory bowel disease colitis: detection by fluorescence endoscopy. *Endoscopy*. 2006;38:477-482.
- 322.** Filip M, Iordache S, Săftoiu A, et al. Autofluorescence imaging and magnification endoscopy. *World J Gastroenterol*. 2011;17:9-14.
- 323.** Matsumoto T, Nakamura S, Moriyama T, et al. Autofluorescence imaging colonoscopy for the detection of dysplastic lesions in ulcerative colitis: a pilot study. *Colorectal Dis*. 2010;12:291-297.

- 324.** Fusco V, Ebert B, Weber-Eibel J, et al. Cancer prevention in ulcerative colitis: long-term outcome following fluorescence-guided colonoscopy. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:489-495.
- 325.** van den Broek FJ, van Soest EJ, Naber AH, et al. Combining autofluorescence imaging and narrow-band imaging for the differentiation of adenomas from non-neoplastic colonic polyps among experienced and non-experienced endoscopists. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:1498-1507.
- 326.** Neumann H, Fuchs FS, Vieth M, et al. Review article: in vivo imaging by endocytoscopy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33:1183-1193.
- 327.** ASGE Technology Committee, Kwon RS, Wong Kee Song LM, et al. Endocytoscopy. *Gastrointest Endosc.* 2009;70:610-613.
- 328.** Sasajima K, Kudo SE, Inoue H, et al. Real-time in vivo virtual histology of colorectal lesions when using the endocytoscopy system. *Gastrointest Endosc.* 2006;63:1010-1017.
- 329.** Kudo SE, Wakamura K, Ikehara N, et al. Diagnosis of colorectal lesions with a novel endocytoscopic classification - a pilot study. *Endoscopy.* 2011;43:869-875.
- 330.** Bessho R, Kanai T, Hosoe N, et al. Correlation between endocytoscopy and conventional histopathology in microstructural features of ulcerative colitis. *J Gastroenterol.* 2011;46:1197-1202.
- 331.** Neumann H, Vieth M, Neurath MF, et al. Endocytoscopy allows accurate in vivo differentiation of mucosal inflammatory cells in IBD: a pilot study. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:356-362.
- 332.** Matsushima K, Isomoto H, Uehara R, et al. Clinical significance of endocytoscopic findings in ulcerative colitis. Presented at Digestive Disease Week; May 19–22, 2012; San Diego, California. Abstract 505.
- 333.** Farraye FA, Odze RD, Eaden J, et al. AGA Institute Medical Position Panel on Diagnosis and Management of Colorectal Neoplasia in Inflammatory Bowel Disease. AGA medical position statement on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2010;138:738-745.
- 334.** Kornbluth A, Sachar DB. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:501-523.
- 335.** Winawer S, Fletcher R, Rex D, et al. Gastrointestinal Consortium Panel. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology.* 2003;124:544-560.
- 336.** Lashner BA, Kane SV, Hanauer SB. Colon cancer surveillance in chronic ulcerative colitis: historical cohort study. *Am J Gastroenterol.* 1990;85:1083-1087.
- 337.** Choi PM, Nugent FW, Schoetz DJ Jr, et al. Colonoscopic surveillance reduces mortality from colorectal cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1993;105:418-424.
- 338.** Karlén P, Kornfeld D, Broström O, et al. Is colonoscopic surveillance reducing colorectal cancer mortality in ulcerative colitis? A population based case control study. *Gut.* 1998;42:711-714.
- 339.** Lutgens MW, Oldenburg B, Siersema PD, et al. Colonoscopic surveillance improves survival after colorectal cancer diagnosis in inflammatory bowel disease. *Br J Cancer.* 2009;101:1671-1675.

340. Vemulapalli R, Lance P. Cancer surveillance in ulcerative colitis: more of the same or progress? *Gastroenterology*. 1994;107:1196-1199.
341. Provenzale D, Wong JB, Onken JE, et al. Performing a cost-effectiveness analysis: surveillance of patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1998;93:872-880.
342. Miller AB. Implementation of colon cancer screening: techniques, costs, and barriers. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008;37:83-95.
343. van der Maas PJ, de Koning HJ, van Ineveld BM, et al. The cost-effectiveness of breast cancer screening. *Int J Cancer*. 1989;43:1055-1060.
344. Eddy DM. Screening for cervical cancer. *Ann Intern Med*. 1990;113:214-226.
345. Lennard-Jones JE. Cancer risk in ulcerative colitis: surveillance or surgery. *Br J Surg*. 1985;72:84-86.
346. 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;316:1654-1658.
347. Axon AT. Cancer surveillance in ulcerative colitis--a time for reappraisal. *Gut*. 1994;35:587-589.
348. Engelsgjerd M, Farraye FA, Odze RD. Polypectomy may be adequate treatment for adenoma-like dysplastic lesions in chronic ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1999;117:1288-1294;discussion 1488-1491.
349. Rubin PH, Friedman S, Harpaz N, et al. Colonoscopic polypectomy in chronic colitis: conservative management after endoscopic resection of dysplastic polyps. *Gastroenterology*. 1999;117:1295-1300.
350. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002. *Gastrointest Endosc*. 2003;58:S3-43.
351. Blackstone MO, Riddell RH, Rogers BH, et al. Dysplasia-associated lesion or mass (DALM) detected by colonoscopy in long-standing ulcerative colitis: an indication for colectomy. *Gastroenterology*. 1981;80:366-374.
352. Odze RD. Adenomas and adenoma-like DALMs in chronic ulcerative colitis: a clinical, pathological, and molecular review. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:1746-1750.
353. Rosenstock E, Farmer RG, Petras R, et al. Surveillance for colonic carcinoma in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1985;89:1342-1346.
354. Taylor BA, Pemberton JH, Carpenter HA, et al. Dysplasia in chronic ulcerative colitis: implications for colonoscopic surveillance. *Dis Colon Rectum*. 1992;35:950-956.
355. Gorfine SR, Bauer JJ, Harris MT, et al. Dysplasia complicating chronic ulcerative colitis: is immediate colectomy warranted? *Dis Colon Rectum*. 2000;43:1575-1581.
356. Ullman TA, Loftus EV Jr, Kakar S, et al. The fate of low grade dysplasia in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:922-927.
357. Lim CH, Dixon MF, Vail A, et al. Ten year follow up of ulcerative colitis patients with and without low grade dysplasia. *Gut*. 2003;52:1127-1132.
358. Connell WR, Lennard-Jones JE, Williams CB, et al. Factors affecting the outcome of endoscopic surveillance for cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1994;107:934-944.

- 359.** Rubio CA, Befrits R, Jaramillo E, et al. Villous and serrated adenomatous growth bordering carcinomas in inflammatory bowel disease. *Anticancer Res.* 2000;20:4761-4764.
- 360.** Thomas T, Abrams KA, Robinson RJ, et al. Meta-analysis: cancer risk of low-grade dysplasia in chronic ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25:657-668.
- 361.** Lindberg B, Persson B, Veress B, et al. Twenty years' colonoscopic surveillance of patients with ulcerative colitis. Detection of dysplastic and malignant transformation. *Scand J Gastroenterol.* 1996;31:1195-1204.
- 362.** Befrits R, Ljung T, Jaramillo E, et al. Low-grade dysplasia in extensive, long-standing inflammatory bowel disease: a follow-up study. *Dis Colon Rectum.* 2002;45:615-620.
- 363.** Bernstein CN. ALMs versus DALMs in ulcerative colitis: polypectomy or colectomy? *Gastroenterology.* 1999;117:1488-1492.
- 364.** Odze RD, Farraye FA, Hecht JL, et al. Long-term follow-up after polypectomy treatment for adenoma-like dysplastic lesions in ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004;2:534-541.
- 365.** Vieth M, Behrens H, Stolte M. Sporadic adenoma in ulcerative colitis: endoscopic resection is an adequate treatment. *Gut.* 2006;55:1151-1155.
- 366.** 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;22:275-284.
- 367.** Kisiel JB, Loftus EV Jr, Harmsen WS, et al. Outcome of sporadic adenomas and adenoma-like dysplasia in patients with ulcerative colitis undergoing polypectomy. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:226-235.
- 368.** Odze RD, Brown CA, Hartmann CJ, et al. Genetic alterations in chronic ulcerative colitis-associated adenoma-like DALMs are similar to non-colitic sporadic adenomas. *Am J Surg Pathol.* 2000;24:1209-1216.
- 369.** Ikeuchi H, Uchino M, Matsuoka H, et al. Surgery for ulcerative colitis in 1,000 patients. *Int J Colorectal Dis.* 2010;25:959-965.
- 370.** Hurlstone DP, Sanders DS, Atkinson R, et al. Endoscopic mucosal resection for flat neoplasia in chronic ulcerative colitis: can we change the endoscopic management paradigm? *Gut.* 2007;56:838-846.
- 371.** Kudo Se, Lambert R, Allen JI, et al. Nonpolypoid neoplastic lesions of the colorectal mucosa. *Gastrointest Endosc.* 2008;68:S3-47.
- 372.** Blonski W, Kundu R, Furth EF, et al. High-grade dysplastic adenoma-like mass lesions are not an indication for colectomy in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43:817-820.
- 373.** Odze RD, Goldblum J, Noffsinger A, et al. Interobserver variability in the diagnosis of ulcerative colitis-associated dysplasia by telepathology. *Mod Pathol.* 2002;15:379-386.
- 374.** Eaden J, Abrams K, McKay H, et al. Inter-observer variation between general and specialist gastrointestinal pathologists when grading dysplasia in ulcerative colitis. *J Pathol.* 2001;194:152-157.
- 375.** Dixon MF, Brown LJ, Gilmour HM, et al. Observer variation in the assessment of dysplasia in ulcerative colitis. *Histopathology.* 1988;13:385-397.
- 376.** Riddell RH. Grading of dysplasia. *Eur J Cancer.* 1995;31A:1169-70.

- 377.** Melville DM, Jass JR, Morson BC, et al. Observer study of the grading of dysplasia in ulcerative colitis: comparison with clinical outcome. *Hum Pathol.* 1989;20:1008-1014.
- 378.** Greenson JK. Dysplasia in inflammatory bowel disease. *Semin Diagn Pathol.* 2002;19:31-37.
- 379.** Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut.* 2000;47:251-255.

SECÇÃO 2

CONTRIBUTO PESSOAL

CAPÍTULO 9

ORIGINAL ARTICLE

Surveillance in Ulcerative Colitis: Is Chromoendoscopy-guided Endomicroscopy Always Better than Conventional Colonoscopy? A Randomized Trial

Paulo Freire, MD,* Pedro Figueiredo, MD, PhD,*[†] Ricardo Cardoso, MD,* Maria M. Donato, PhD,[†] Manuela Ferreira, MD,* Sofia Mendes, MD,* Mário R. Silva, MD,[‡] Augusta Cipriano, MD,[‡] Ana M. Ferreira, MD,* Helena Vasconcelos, MD,[§] Francisco Portela, MD,* and Carlos Sofia, MD, PhD*[†]

Background: Ulcerative colitis (UC) is associated with an increased risk of colorectal cancer. Chromoendoscopy showed superiority to conventional colonoscopy (CC) in surveillance studies including high-risk patients. We aimed to compare chromoendoscopy-guided endomicroscopy (CGE) with CC for intraepithelial neoplasia (IN) detection in patients with longstanding UC without primary sclerosing cholangitis and/or history of IN.

Methods: One hundred sixty-two patients with longstanding (≥ 8 yr) distal/extensive UC and without primary sclerosing cholangitis and/or history of IN were prospectively randomized to undergo CGE (group A) or CC (group B). Seventeen patients were excluded. In group A ($n = 72$), circumscribed lesions highlighted by pan-chromoendoscopy were evaluated by endomicroscopy, and targeted biopsy/polypectomy was performed. In group B ($n = 73$), 4 random biopsies every 10 cm and targeted biopsy/polypectomy of detected lesions were performed.

Results: Thirteen IN, all low grade, were detected: 7 IN in group A and 6 in group B ($P > 0.05$), distributed, respectively, by 6 and 4 patients ($P > 0.05$). Significantly, more biopsies were performed in group B (4.7 ± 4.9 versus 36.0 ± 6.2 , $P < 0.001$), and the per-biopsy yield of IN was higher in group A ($1/48$ versus $1/438$, $P < 0.001$). Examination time was 61.5 ± 15.6 minutes in group A and 40.7 ± 8.7 minutes in group B ($P < 0.001$). The IN detection by endomicroscopy revealed: sensitivity = 85.7%, specificity = 97.9%, positive predictive value = 75.0%, and negative predictive value = 98.9%.

Conclusions: CGE does not improve the detection of IN in the endoscopic screening of patients with longstanding UC without primary sclerosing cholangitis and/or history of IN. CGE takes longer than CC, but it decreases the number of biopsies performed and significantly increases the per-biopsy yield of IN. Endomicroscopy is an accurate tool for IN detection.

(*Inflamm Bowel Dis* 2014;00:1–8)

Key Words: ulcerative colitis, intraepithelial neoplasia, surveillance, chromoendoscopy, confocal laser endomicroscopy

Patients affected by longstanding ulcerative colitis (UC) have an increased risk of developing colorectal cancer (CRC) and are candidates for endoscopic surveillance.^{1,5} Recommended surveillance protocols include multiple nontargeted (“random”) biopsies throughout the colon, based on historical evidence that intraepithelial

neoplasia (IN) mainly occurs in flat mucosa.^{3,7} However, random biopsies are expensive, labor-intensive, distract from scrutinizing of the colon, enclose a low yield for IN and have little acceptance in clinical practice.^{8–18}

Chromoendoscopy with methylene blue or indigo carmine, which can unmask flat lesions, has successfully been applied in this diagnostic field (Table 1).^{19–26} Indeed, since the first study by Kieslich et al,¹⁹ many reports have shown a clear diagnostic gain using the dye spray enhancement, with per-lesion 3- to 4.75-fold increased probability of IN detection in this context.^{21–23} A recently published meta-analysis of chromoendoscopy in IN surveillance in inflammatory bowel disease (IBD) found that the difference in yield between chromoendoscopy and white light endoscopy was 7% on a per-patient analysis, with a number needed to treat of 14.3.²⁷ In view of these results, chromoendoscopy with targeted biopsies is currently strongly endorsed in various international UC surveillance guidelines.^{3–5}

Despite these results and recommendations, chromoendoscopy is not routinely used for IBD–CRC surveillance.^{8,24} This protocol carries additional costs for the equipment needed for dye spraying, and it is time consuming and requires an endoscopist

Received for publication June 9, 2014; Accepted XX, XXXX.

From the *Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal; [†]Center of Gastroenterology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; [‡]Department of Pathology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal; and [§]Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar Leiria-Pombal, Leiria, Portugal.

Supported by research grants awarded by Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/SINTD/60055/2009), Fundação GlaxoSmith Kline das Ciências da Saúde, Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Programa de Estimulo à Investigação, En 2011), and Centro de Estudos Ibéricos.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Reprints: Paulo Freire, MD, Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Praceta Prof. Mota Pinto, 3000-075 Coimbra, Portugal (e-mail: pauloavfreire@gmail.com).

Copyright © 2014 Crohn’s & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1097/MIB.0000000000000176

Published online.

TABLE 1. Studies Comparing Chromoendoscopy with White Light Endoscopy for Surveillance of Patients with Longstanding UC

Author (Reference), yr	Study Design	Dye	Type of CE	Patients, n	Patients with IN, n (%)	Outcome	Increase of Diagnostic Yield
Kiesslich et al ¹⁸	Randomized	MB 0.1%	Pancolonic	165	19 (11.5)	32 versus 10 LIN	3-fold (per lesion)
Matsumoto et al ²⁰	Prospective cohort, tandem colonoscopy	IC 0.2%	Pancolonic	57	12 (21.1)	86% versus 38% sensitivity	Not stated
Rutter et al ²¹	Prospective cohort, tandem colonoscopy	IC 0.1%	Pancolonic	100	7 (7.0)	9 versus 2 LIN	4.5-fold (per lesion)
Hurlstone et al ²²	Prospective cohort	IC 0.5%	Targeted	700	81 (11.6)	69 versus 24 LIN	3-fold (per lesion)
Kiesslich et al ²³	Randomized	MB 0.1%	Pancolonic ^a	153	15 (9.8)	19 versus 4 LIN	4.75-fold (per lesion)
Marion et al ²⁴	Prospective cohort, tandem colonoscopy	MB 0.1%	Pancolonic	102 ^b	19 (18.6)	17 versus 3 patients with LIN	1.5-fold (per patient)
Günther et al ²⁵	Retrospective	IC 0.1%	Pancolonic	150 ^b	8 (5.3)	8 versus 0 patients with LIN	Not stated
Hlavaty et al ²⁶	Prospective cohort	IC 0.4%	Pancolonic ^a	45 ^b	7 (15.6)	7 versus 0 patients with LIN	Not stated

^aCircumscribed lesions unmask by chromoendoscopy were evaluated by endomicroscopy before biopsy/resection.

^bPatients with UC and colonic CD.

MB, methylene blue; IC, indigo carmine; LIN, lesions with intraepithelial neoplasia.

who is familiar with the technique.^{8,24} In addition to these drawbacks, there is a crucial question that has not been answered yet: the diagnostic superiority of chromoendoscopy over conventional colonoscopy (CC) with random biopsies is valid for all patients with longstanding UC or only for those at high CRC risk? Indeed, the above chromoendoscopy surveillance studies came from highly specialized reference centers and focused on patients with high-risk UC, including patients with primary sclerosing cholangitis (PSC) and/or history of IN.^{19–26} Incorporating chromoendoscopy into clinical practice will need to address the utility of this technique in low and average risk patients.

Confocal laser endomicroscopy (CLE) is a newly introduced technology that provides real-time high-resolution imaging of the gastrointestinal mucosa during endoscopy, allowing the visualization of the pathology of the mucosal epithelium with its cellular and subcellular structures.²⁸ Chromoendoscopy can unmask circumscribed lesions, whereas endomicroscopy can be used to histologically characterize stained lesions.²⁹ Kiesslich et al²³ demonstrated that CLE had a high diagnostic accuracy of 97.8% for the detection of IN when directed to these suspicious areas. Furthermore, if only CLE-confirmed lesions would have been biopsied, the mean number of biopsies would have dropped to 0.78 per patient.²³ The value of combining CLE to chromoendoscopy for the detection of IN was confirmed, although with less remarkable diagnostic values, in 4 subsequent studies.^{25,26,30,31} However, data about the use of CLE in detecting IN in UC are still scarce and the promising results derived from still a few experienced centers that applied the technique in selected high-risk patients.

In light of these data, we aimed to compare chromoendoscopy-guided endomicroscopy (CGE) with CC for IN detection in patients with longstanding UC and without PSC and/or history of IN. In addition, we aimed to evaluate the diagnostic accuracy of CLE for the diagnosis of IN in these patients.

METHODS

Study Population

In this prospective randomized controlled trial, conducted between April 2011 and October 2013, consecutive patients with clinically inactive longstanding UC were recruited from the outpatient clinic of 2 Gastroenterology Departments—Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra and Centro Hospitalar Leiria-Pombal (Portugal).

The inclusion criteria consisted of patients aged 18 years or older, with a confirmed diagnosis (based on established clinical, endoscopic, radiological, and histological criteria) of longstanding (≥ 8 yr) left side or extending UC, clinically inactive (Simple Clinical Colitis Activity Index < 3).^{32–35} Exclusion criteria were as follows: unwillingness to consent to the protocol, personal history of IN or CRC, diagnosis of PSC, known allergy to methylene blue or fluorescein, pregnant or nursing women, coagulopathy (prothrombin time $< 50\%$ of control, partial thromboplastin time > 50 sec) or impaired renal function (creatinine level > 1.2 mg/dL). Patients were further excluded from the study analysis if the endoscopic evaluation revealed poor bowel preparation (defined as greater than 10% of mucosal surface obscured) or disease activity (Mayo endoscopic score 2 or 3).³⁶

All patients received a standard bowel preparation (4L polyethylene glycol). Using a computer-aided system, patients were randomized by random numbers at a 1:1 ratio to undergo colonoscopy with CGE (group A) or CC (group B). All colonoscopies were performed by a single experienced endoscopist (P.F.) using Pentax EC-3870CIFK (endomicroscopy function only used in group A), under propofol-induced sedation or conscious sedation with intravenous midazolam if required. The aforementioned endoscopist has extensive practice in UC surveillance, including use of chromoendoscopy, and has appropriate training in endomicroscopy.

Lesions were classified morphologically according to the Paris classification (PC).³⁷ The examination time and the number of biopsies performed were documented. Detailed phenotypic characteristics, including demographic data and clinical parameters, were obtained with a standardized questionnaire filled out by reviewing the medical charts and a patient interview at the time of enrollment. Phenotypic characteristics were classified according to the recently published second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of UC.^{3,38,39} Disease extent was defined as the furthest extent of inflammation, either microscopically or macroscopically.⁴⁰

Primary and Secondary Analyses

The primary outcome analysis was the number of IN detected, considering the a priori hypothesis that colonoscopy with CGE might allow to diagnose a significantly higher a number of INs than CC. Chromoscopy was used to unmask circumscribed lesions, and the accuracy of endomicroscopy to predict histologic findings was evaluated. Secondary analyses were comparison of the examination time, the number of biopsies performed, and the per-biopsy yield of IN.

Group A: Colonoscopy with CGE

After advancing the colonoscope to the cecum, staining of the entire colon was performed using methylene blue 0.1% delivered through a radial dye spray catheter (Endo-Flex 47226-G) following the SURFACE guidelines.⁴¹ Excess dye was removed by suction and staining was considered adequate when the tiny glandular duct openings of the mucosa (pits) were clearly visible. The mucosa was then scrutinized, and any abnormalities (circumscribed lesions) were evaluated by endomicroscopy and afterward biopsied or removed. Endomicroscopy or histological evaluation was not performed in areas other than the circumscribed lesions revealed by chromoendoscopy. Five milliliters of 10% sodium fluorescein were injected intravenously as a contrasting agent before CLE image acquisition. Circumscribed lesions were graded for the presence of IN according Mainz–Kiesslich endoscopic confocal pattern classification.²³

Group B: CC

At cecal extubation, sequential 4 quadrantic biopsies were taken at 10-cm intervals in addition to targeted biopsies or resection of abnormal-appearing colonic mucosa. Each set of

quadrantic biopsies were processed in individual formalin pots with the distance in centimeter from the anal verge documented. Biopsy/resected specimens from targeted areas were processed in separate specimen formalin pots.

Pathology

Biopsy samples were processed and stained by using standard methods and were subsequently evaluated by 1 of 2 experienced gastrointestinal histopathologists (M.R.S. and A.C.) who was blinded to the endoscopic findings. No differentiation was made between adenomas and dysplasia associated lesions in this study, with the term IN being used according to the Vienna classification.⁴² Any specimens exhibiting IN were reviewed by the other pathologist, and in the event of interobserver disagreement, a consensus was reached.

Statistical Analysis

Continuous variables were summarized using mean values and standard deviation, and categorical variables were expressed as frequency and percentage. Standard tests were used to compare mean values and proportions: Student's *t* test or Wilcoxon rank-sum test for continuous variables and Mann–Whitney U test, Chi-Square or Fisher's exact test for categorical variables, when appropriate.

Only *P*-values <0.05 were considered significant, and all *P*-values presented are two-tailed. The data were analyzed using the IBM SPSS Statistics (IBM Co., Armonk, NY) computer software for Windows (Version 20.0).

Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were calculated from 2 × 2 tables according to standard formulas. For CC, a neoplasia risk of 10% in the specific patient population was assumed in agreement with preceding reports.^{19,21–23,43,44} Previous studies showed that chromoendoscopy increases the diagnostic yield of neoplasia between 1.5- and 4.75-fold as compared with CC.^{19–26} Using an intermediate value of 3.5, the calculated sample size for this study was 114 patients (57 per group).

Ethical Considerations

This study was approved by the local Ethics Committee (HUC-29-09), and written informed consent was obtained from all participants before enrollment into the study, in accordance with the Declaration of Helsinki.

RESULTS

A total of 223 patients were screened for possible inclusion in this study, 61 of whom were excluded (see CONSORT statement in Fig. 1). A total of 162 patients (men/women: 74/88; mean age at diagnosis of UC, 33.3 ± 13.2 yr old) fulfilled all inclusion criteria and were enrolled in the study (Fig. 1). Patients were randomly assigned at a 1:1 ratio to undergo colonoscopy with CGE (group A) or CC (group B). Seventeen patients had to be excluded from further analysis because of poor bowel

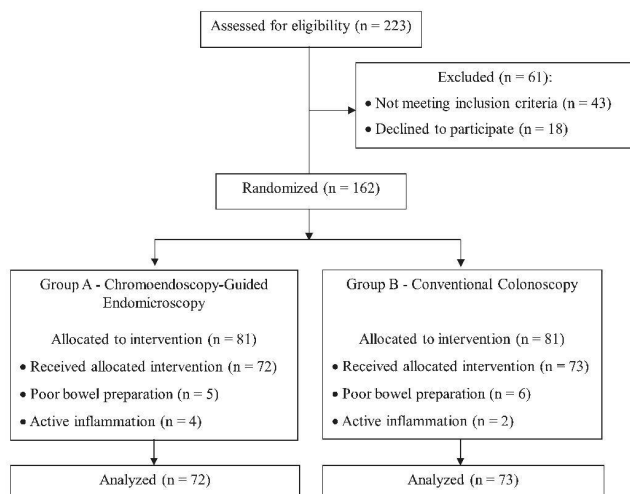


FIGURE 1. Flow diagram of the progress through the phases of the actual randomized trial according to the CONSORT 2010 statement.⁴⁵

preparation (n = 11) or endoscopic activity (n = 6), and 145 patients completed the study protocol (group A, n = 72; group B, n = 73) (Fig. 1).

As shown in Table 2, baseline characteristics such as current age, age at disease diagnosis, disease duration and extension, family history of CRC, presence of pseudopolyps, and maintenance therapy were not significantly different between the 2 groups.

TABLE 2. Patients' Baseline Characteristics

	Group A (CGE)	Group B (CC)	P
Age, yr ^a	49.2 ± 13.5	51.7 ± 15.6	0.301
Age at disease diagnosis, yr ^a	33.6 ± 11.7	33.3 ± 14.6	0.903
Disease duration, yr ^a	16.2 ± 9.8	18.4 ± 8.0	0.144
Extent of disease, n (%)			
Left-sided	43 (59.7)	36 (49.3)	0.208
Extensive	29 (40.3)	37 (50.7)	
Pseudopolyps, n (%)	32 (44.4)	27 (37.0)	0.361
Maintenance therapy, n (%)			
No medication	8 (11.1)	4 (5.5)	0.218
Only 5-ASA (oral or topic)	43 (59.7)	50 (68.5)	0.271
Oral 5-ASA	62 (86.1)	66 (90.4)	0.421
Topic 5-ASA	14 (19.4)	10 (13.7)	0.352
AZA or 6-MP	15 (20.8)	14 (19.2)	0.803
IFX or ADA	8 (11.1)	6 (8.2)	0.556
Smoking, n (%)			
Current smoker	4 (5.6)	9 (12.3)	0.153
Ex-smoker	17 (23.6)	17 (23.3)	0.963
Family history of CRC	11 (15.3)	12 (16.4)	0.848

^aMean ± SD.

5-ASA, 5-aminosalicylic acid; AZA, azathioprine; 6-MP, 6-mercaptopurine; IFX, infliximab; ADA, adalimumab.

Cecum was reached in all examined patients. In group A, a total of 104 circumscribed lesions were identified after panchromoscopy with methylene blue. Their histological evaluation revealed: normal or hyperplastic mucosa in 32 lesions, post-inflammatory or inflammatory polyps in 65 lesions and IN in 7 lesions. Of the 59 endoscopic abnormalities detected in group B, 18 lesions were hyperplastic polyps, 32 were postinflammatory or inflammatory polyps, and 3 were INs.

A total of 13 intraepithelial neoplastic lesions were identified in 10 patients. All lesions were low-grade INs. No high-grade INs or carcinomas were found in any patients evaluated in this study. These included 7 INs in the group A and 6 INs in the group B (P > 0.05), distributed by 6 patients in the group A and 4 in the group B (P > 0.05).

In group A, of the 7 INs detected, 5 were found in polypoid lesions (PC type I; range, 3–10 mm) and 2 in nonpolypoid lesions (PC type II; 25 and 50 mm). Of the 6 INs detected in group B, 2 were polypoid lesions (PC type I; 4 and 6 mm) and 4 were nonpolypoid lesions (PC type II; including 1 nonpolypoid slightly elevated lesion with 30 mm and 3 INs found by random biopsy examinations).

The total number of biopsies taken was 4.7 ± 4.9 in group A and 36.0 ± 6.2 in group B (P < 0.001). The proportion of biopsies with IN (yield of IN) was significantly higher in the CGE guided examinations (yield of 1/48, 2.1% in group A versus 1/438, 0.2% in group B; P < 0.001).

The average examination time was 61.5 ± 15.6 minutes (range, 40–120 min) in group A and 40.7 ± 8.7 minutes (range, 20–60 min) in group B, a difference statistically significant (P < 0.001).

The 104 circumscribed lesions detected in group A were evaluated by CLE before biopsy or resection. The diagnostic accuracy measures of CLE for the detection of IN compared with standard histology were: sensitivity 85.7%, specificity 97.9%, positive predictive value 75.0%, and negative predictive value 98.9% (Table 3). Figure 2 is an example of a nonpolypoid slightly elevated lesion (PC type 0-IIa) detected in the CGE group, with both assessments, by histology and endomicroscopy, agreeing on the diagnosis of IN. There were no adverse events.

DISCUSSION

Patients with longstanding distal/extensive UC are at an increased risk of developing CRC.^{1,2} Therefore, endoscopic surveillance is currently recommended in these individuals.^{3–5}

TABLE 3. Correlation Between Endomicroscopy and Histology in the Assessment of IN in Circumscribed Lesions

Endomicroscopy	Histology	
	Nonneoplastic	IN
Nonneoplastic	95	1
IN	2	6

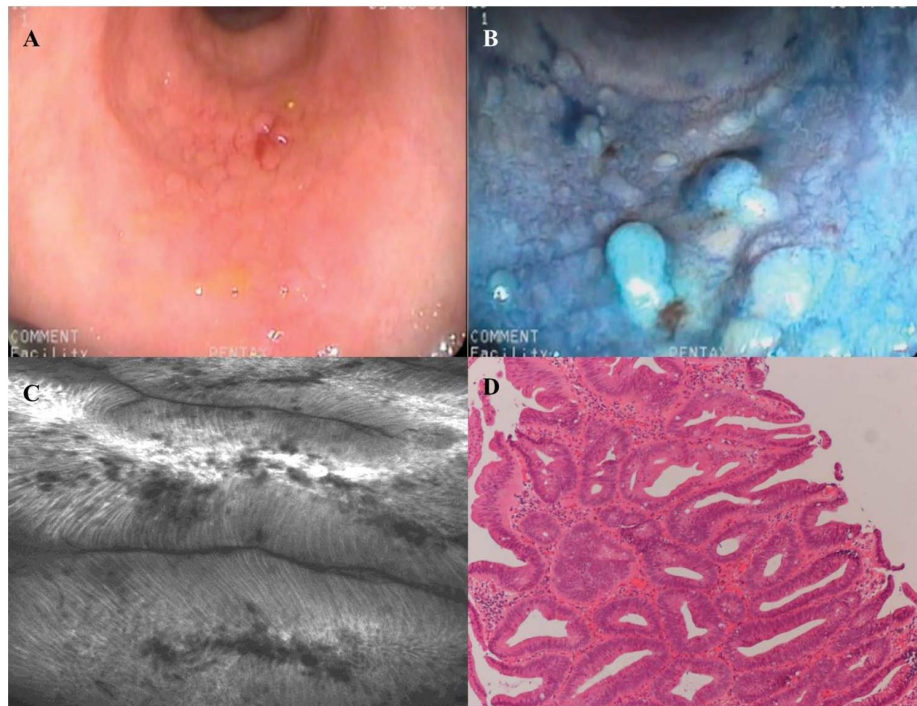


FIGURE 2. Lesion detected during colon screening (A) and highlighted after chromoendoscopy with methylene blue (B). According to the PC, this is a type 0-IIa lesion.³⁷ The evaluations by endomicroscopy (C) and histology (D) agree on the identification of IN.

Historically, it was believed that IN in UC usually occurred in flat lesions, many or most of which were not endoscopically visible.^{6,7} As a result, UC surveillance recommendations include obtaining random nontargeted 4-quadrant biopsies every 10 cm, from the cecum to the rectum, with a minimum of 32 biopsies, in addition to biopsies of suspicious lesions.^{3,5} Random biopsies visualize only 1% of total colonic mucosa surface area, promoting a high sampling error.^{3,9} In addition, the yield of random biopsies to detect IN is low, and this diagnostic approach is expensive, labor-intensive, and distracts from scrutinizing of the colon.¹⁰⁻¹² Consequently, several studies indicate that the majority of gastroenterologists do not follow the international guideline recommendations of taken random biopsies when performing endoscopic surveillance in IBD.¹³⁻¹⁸

Multiple studies, including 1 meta-analysis, have demonstrated that chromoendoscopy enhances our ability to detect IN when compared with standard white light colonoscopic examination with random biopsies (Table 1).¹⁹⁻²⁶ In accordance with these results, chromoendoscopy with targeted biopsies of circumscribed lesions is currently strongly endorsed in various international UC surveillance guidelines.³⁻⁵

Despite these results and recommendations, gastroenterologists have been reluctant to embrace chromoendoscopy, possibly out of concerns regarding cost, procedure time, and lack of experience.^{8,24} Furthermore, the above chromoendoscopy surveillance studies came from highly specialized reference centers that did not exclude very high-risk patients, namely those with PSC and/or history of IN.¹⁹⁻²⁶ Whether chromoendoscopy performs

equally among intermediate or low-risk patients as compared with high-risk patients is currently unknown.

To the best of our knowledge, this is the first prospective randomized study to compare CGE with CC for IN detection in patients with longstanding UC and without PSC and/or history of IN, 2 extensively recognized CRC high-risk factors that require intensive surveillance.^{4,5,46,47}

In the 145 patients analyzed in our study, we found IN in 10 (6.9%). This value is higher than that reported by Günther et al (5.3%), compares well with the results of Rutter et al (7%), but is lower to that reported in all the other studies and surprisingly low when compared with the earliest studies on the incidence of CRC in longstanding UC.^{1,19-26} This difference might result, at least partially, from the exclusion of high-risk patients (with PSC and/or history of IN). In addition, studies on CRC incidence in UC published more recently, especially those reporting general population data, suggest that this risk may probably be lower than previously believed or decreased over time.⁸ However, given the complexity of the endoscopic procedures and the prolonged examination time, the possibility that some lesions might have overlooked can be evoked. Nevertheless, the fact that all examinations were carried out by a single experienced endoscopist, skilled in UC surveillance and with training in endomicroscopy, minimizes this possibility. Furthermore, recently published data by Picco et al⁴⁸ revealed that even endoscopists inexperienced in chromoendoscopy demonstrate good performance in UC surveillance with this technique, namely regarding lesion detection.

Our data suggest that in patients with longstanding UC and without PSC and/or history of IN, CGE does not perform significantly better than CC with random biopsies in detecting IN. These results disagree from the conclusions of all the other studies that compared these 2 techniques in the endoscopic screening of patients with UC, which showed superiority of chromoendoscopy methods in the detection of IN (Table 1).¹⁹⁻²⁶ Nevertheless, one must keep in mind that these studies, unlike ours, did not exclude very high-risk patients, namely those with PSC and/or history of IN.¹⁹⁻²⁶

Regarding morphology of the lesions, in our study, more than half of INs were detected in polypoid lesions (PC type I), differing from the results obtained in the studies of Kiesslich et al, Hurlstone et al, and Gunther et al, that showed greater preponderance of nonpolypoid INs (PC type II).^{19,22,23,25} Nevertheless, our data are consistent with the results reported in 2 prospective endoscopic studies and in 3 large retrospective series.^{21,26,49-51}

In line with the data from the majority of previous studies, we found that the chromoendoscopy targeted method decreases the number of biopsies performed and increases the per-biopsy yield of IN.^{21-24,26}

Regarding the endoscopic examination time, we found that CGE significantly prolonged the procedure. Our results agree with the findings of Hurlstone et al and with the results of a recent published meta-analysis, which revealed that the time for chromoendoscopy was significantly longer than that for CC with random biopsies.^{22,27} However, in the studies conducted by Kiesslich et al, they found that although the average time required for endoscopy was higher in the chromoendoscopy group than in the CC group, these differences were not statistically significant.^{19,23} Nevertheless, it should be noted that in our work, as in the most recent study of Kiesslich et al,²³ part of the examination time in the chromoendoscopy group was spent in confocal endomicroscopy image acquisition.

In our study, endomicroscopy revealed a good performance for differentiating neoplastic from nonneoplastic mucosa, especially a high negative predictive value, confirming the previously reported efficacy of this technique by other groups.^{15,23,26,30} However, given the low number of INs detected, our data should be interpreted with caution. Although our results are encouraging, they are less remarkable than those of Kiesslich et al²³ who reported 94.7% sensitivity, 98.3% specificity, 90% positive predictive value, and 99.1% negative predictive value of CLE for the detection of IN. This difference from our results may be attributed to their greater experience, but may also be a consequence of the fact that we have only identified low-grade INs, and is known that such lesions are more difficult to distinguish from regenerative nonneoplastic tissue, even for pathologists in histological evaluation.^{52,53} In addition, in the Kiesslich trial, 18 of 23 INs were found on flat lesions, whereas in our work, 7 of 13 INs were detected in exophytic lesions, and is well known that polypoid lesions are hard to stabilize for CLE imaging.^{23,26} Nevertheless, the consistently remarkable negative predictive value of this technique might, in the future, enable us to avoid performing

unnecessary biopsies and endoscopic resections if normal crypt architecture is present on endomicroscopic analysis.

This study has some limitations. First, the size of the study population is somewhat small, although it is similar to that of most the other studies (Table 1).¹⁹⁻²⁶ Second, the number of patients with the final diagnosis of IN is quite small, and all the INs detected were of low grade. This is an important issue if we aim to establish useful criteria for the endoscopic/histological surveillance of these patients because it could make the chromoendoscopy performance and the CLE accuracy less remarkable. Nevertheless, these data represent the everyday clinical practice of the institutions involved in this study. Finally, although this is a hospital-based study, it is important to note that, given our country's health policy, the majority of patients with IBD are followed in the hospital setting and, therefore, our results may not be applicable to institutions with different patient populations.

UC has a great amount of heterogeneity, starting in the type and age of presentation, through natural history of disease and ending in the therapeutic requirements.^{54,55} The perception and recognition of this heterogeneity is also reflected in the UC CRC screening, with the most recent recommendations considering different surveillance intervals based on patients risk factors.^{4,5,47} Chromoendoscopy-based surveillance has been increasingly considered the preferred method for IN screening in these patients, based on the results of studies including high-risk patients.¹⁹⁻²⁶ Excluding patients with PSC and/or history of IN, 2 recognized high-risk factors which require more intensive surveillance, our study found no benefit of IN screening with chromoendoscopy over CC.^{4,5,46,47} Our results suggest that the choice of the endoscopic screening method should also be tailored to the patient risk factors, and that in intermediate low-risk patients, the surveillance can be accomplished both with chromoendoscopy as with CC. This approach will enable better management of human and financial resources, may potentiate the cost-effectiveness of the UC surveillance programs, and can improve the allocation of less available and more expensive techniques as chromoendoscopy and endomicroscopy. However, our results need to be validated by other larger, preferably multicentric, studies before that strategy is applied.

In conclusion, our study suggests that CGE does not improve the detection of IN in the endoscopic screening of patients with longstanding UC without PSC and/or history of IN. Furthermore, CGE takes longer than CC, but it decreases the number of biopsies performed and significantly increases the proportion of biopsies with IN. Additionally, CLE is an accurate tool for IN detection, and given its particularly high negative predictive value, it may significantly decrease the number of biopsies taken. In the future, if our results are confirmed, patients with UC should be categorized according to risk factors to individualize IN surveillance programs, not only in terms of when to start them and at what intervals screening should be carried out, but also regarding to what endoscopic methods should be used. This may determine a more efficient use and allocation of resources in the CRC screening of UC patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge all our colleagues who referred cases, the anesthesiologists and the nursing staff for assisting in endoscopic procedures, and the patients for generously participating in the research. The authors are indebted to Carlos Alberto for this expert technical assistance.

REFERENCES

- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48:526–535.
- Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10:639–645.
- Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations. *J Crohns Colitis*. 2013;7:1–33.
- Farraye FA, Odze RD, Eaden J, et al. AGA technical review on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2010;138:746–774.
- Cairns SR, Scholefield JH, Steele RJ, et al. Guidelines for colorectal cancer screening and surveillance in moderate and high risk groups (update from 2002). *Gut*. 2010;59:666–689.
- Ransohoff DF, Riddell RH, Levin B. Ulcerative colitis and colonic cancer. Problems in assessing the diagnostic usefulness of mucosal dysplasia. *Dis Colon Rectum*. 1985;28:383–388.
- Vieth M, Stolte M, Mueller E, et al. Bioptical differential diagnosis of adenomas, dysplasias and carcinomas in patients with ulcerative colitis. *Leber Magen Darm*. 2000;3:125–132.
- Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, et al. Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2011;4:53–61.
- Kandiel A. Colon cancer surveillance strategies in inflammatory bowel disease. *Visible Hum J Endosc*. 2008;7.
- Harewood GC. Economic comparison of current endoscopic practices: Barrett's surveillance vs. ulcerative colitis surveillance vs. biopsy for sprue vs. biopsy for microscopic colitis. *Dig Dis Sci*. 2004;49:1808–1814.
- Goetz M. Colonoscopic surveillance in inflammatory bowel disease: state of the art reduction of biopsies. *Dig Dis*. 2011;29:36–40.
- van den Broek FJ, Stokkers PC, Reitsma JB, et al. Random biopsies taken during colonoscopic surveillance of patients with longstanding ulcerative colitis: low yield and absence of clinical consequences. *Am J Gastroenterol*. 2011.
- Eaden JA, Ward BA, Mayberry JF. How gastroenterologists screen for colonic cancer in ulcerative colitis: an analysis of performance. *Gastrointest Endosc*. 2000;51:123–128.
- Geary RB, Wakeman CJ, Barclay ML, et al. Surveillance for dysplasia in patients with inflammatory bowel disease: a national survey of colonoscopic practice in New Zealand. *Dis Colon Rectum*. 2004;47:314–322.
- Kaltz B, Bokemeyer B, Hoffmann J, et al. Surveillance colonoscopy in ulcerative colitis patients in Germany. *Z Gastroenterol*. 2007;45:325–331.
- Ullman TA, Croog V, Harpaz N, et al. Biopsy specimen numbers in the routine practice of surveillance colonoscopy in ulcerative colitis (UC). *Gastroenterology*. 2004;126:A471.
- Rodriguez SA, Eisen GM. Surveillance and management of dysplasia in ulcerative colitis by U.S. gastroenterologists: in truth, a good performance. *Gastrointest Endosc*. 2007;66:1070.
- van Rijn AF, Fockens P, Siersema PD, et al. Adherence to surveillance guidelines for dysplasia and colorectal carcinoma in ulcerative and Crohn's colitis patients in the Netherlands. *World J Gastroenterol*. 2009;15:226–230.
- 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;124:880–888.
- Matsumoto T, Nakamura S, Jo Y, et al. Chromoscopy might improve diagnostic accuracy in cancer surveillance for ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:1827–1833.
- Rutter MD, Saunders BP, Schofield G, et al. Pancolonic indigo carmine dye spraying for the detection of dysplasia in ulcerative colitis. *Gut*. 2004;53:256–260.
- Hurlstone DP, Sanders DS, Lobo AJ, et al. Indigo carmine-assisted high-magnification chromoscopic colonoscopy for the detection and characterisation of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis: a prospective evaluation. *Endoscopy*. 2005;37:1186–1192.
- Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, et al. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2007;132:874–882.
- Marion JF, Wayne JD, Present DH, et al. Chromoendoscopy-targeted biopsies are superior to standard colonoscopic surveillance for detecting dysplasia in inflammatory bowel disease patients: a prospective endoscopic trial. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:2342–2349.
- Günther U, Kusch D, Heller F, et al. Surveillance colonoscopy in patients with inflammatory bowel disease: comparison of random biopsy vs. targeted biopsy protocols. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26:667–672.
- Hlavaty T, Huorka M, Koller T, et al. Colorectal cancer screening in patients with ulcerative and Crohn's colitis with use of colonoscopy, chromoendoscopy and confocal endomicroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23:680–689.
- Subramanian V, Mannath J, Ragunath K, et al. Meta-analysis: the diagnostic yield of chromoendoscopy for detecting dysplasia in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33:304–312.
- Kiesslich R, Burg J, Vieth M, et al. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology*. 2004;127:706–713.
- Kiesslich R, Galle PR, Neurath MF. Endoscopic surveillance in ulcerative colitis: smart biopsies do it better. *Gastroenterology*. 2007;133:742–745.
- Rispo A, Castiglione F, Staibano S, et al. Diagnostic accuracy of confocal laser endomicroscopy in diagnosing dysplasia in patients affected by longstanding ulcerative colitis. *World J Gastrointest Endosc*. 2012;4:414–420.
- van den Broek FJ, van Es JA, van Eeden S, et al. Pilot study of probe-based confocal laser endomicroscopy during colonoscopic surveillance of patients with longstanding ulcerative colitis. *Endoscopy*. 2011;43:116–122.
- Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1989;170:2–6; discussion 16–19.
- Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2004;126:1518–1532.
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (2). *N Engl J Med*. 1991;325:1008–1016.
- Walmsley RS, Ayres RC, Pounder RE, et al. A simple clinical colitis activity index. *Gut*. 1998;43:29–32.
- Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med*. 1987;317:1625–1629.
- Paris Workshop Participants. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002. *Gastrointest Endosc*. 2003;58:S3–S43. Review.
- Dignass A, Eliakim R, Magro F, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2012;6:965–990.
- Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J Crohns Colitis*. 2012;6:991–1030.
- Greenstein AJ, Sachar DB, Smith H, et al. Cancer in universal and left-sided ulcerative colitis: factors determining risk. *Gastroenterology*. 1979;77:290–294.
- Kiesslich R, Neurath MF. Chromoendoscopy: an evolving standard in surveillance for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10:695–696.
- Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. 2000;47:251–255.
- Hurlstone DP, McAlindon ME, Sanders DS, et al. Further validation of high-magnification chromoscopic-colonoscopy for the detection of intraepithelial neoplasia and colon cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2004;126:376–378.
- Sada M, Igarashi M, Yoshizawa S, et al. Dye spraying and magnifying endoscopy for dysplasia and cancer surveillance in ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum*. 2004;47:1816–1823.
- Schulz KF, Altman DG, Moher D; for the CONSORT Group. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomized trials. *Open Med*. 2010;4:60–68.

46. Soetikno RM, Lin OS, Heidenreich PA, et al. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc.* 2002;56:48–54.
47. Efthymiou M, Taylor AC, Kamm MA. Cancer surveillance strategies in ulcerative colitis: the need for modernization. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:1800–1813.
48. Picco MF, Pasha S, Leighton JA, et al. Procedure time and the determination of polypoid abnormalities with experience: implementation of a chromoendoscopy program for surveillance colonoscopy for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:1913–1920.
49. Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, et al. Most dysplasia in ulcerative colitis is visible at colonoscopy. *Gastrointest Endosc.* 2004;60:334–339.
50. Rubin DT, Rothe JA, Hetzel JT, et al. Are dysplasia and colorectal cancer endoscopically visible in patients with ulcerative colitis? *Gastrointest Endosc.* 2007;65:998–1004.
51. Blonski W, Kundu R, Lewis J, et al. Is dysplasia visible during surveillance colonoscopy in patients with ulcerative colitis? *Scand J Gastroenterol.* 2008;43:698–703.
52. Dixon MF, Brown LJ, Gilmour HM, et al. Observer variation in the assessment of dysplasia in ulcerative colitis. *Histopathology.* 1988;13:385–397.
53. Noffsinger AE, Miller MA, Cusi MV, et al. The pattern of cell proliferation in neoplastic and nonneoplastic lesions of ulcerative colitis. *Cancer.* 1996;78:2307–2312.
54. Haritunians T, Taylor KD, Targan SR, et al. Genetic predictors of medically refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1830–1840.
55. Sjöberg D, Holmström T, Larsson M, et al. Incidence and natural history of ulcerative colitis in the Uppsala Region of Sweden 2005–2009—results from the IBD Cohort of the Uppsala Region (ICURE). *J Crohns Colitis.* 2013;7:e351–e357.

CAPÍTULO 10

Machine Learning in Medical Imaging
Lecture Notes in Computer Science Volume 7588, 2012, pp 144-151

Description and Classification of Confocal Endomicroscopic Images for the Automatic Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease



Sara Couceiro¹, João P. Barreto¹, Paulo Freire², and Pedro Figueiredo²

¹Institute for Systems and Robotics, University of Coimbra, Portugal

²Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal
and Dept. of Gastroenterology, University Hospital of Coimbra, Portugal

Abstract. Confocal Endomicroscopy (CEM) is a newly developed diagnosis tool which provides *in vivo* examination of the gastrointestinal (GI) histological architecture, avoiding the traditional biopsy. The analysis of CEM images is a challenging task for experts, since there isn't a clearly defined taxonomy of the several disease stages. We aim at building an automatic on-the-fly classifier to provide useful clinical advices for diagnosis. In this work, we propose to make a split between two main subsets of our expert-annotated database: *low* and *high probability of pathology*. We focus on segmentation techniques to extract relevant histological structures, and then encode this information in a feature vector used for classification.

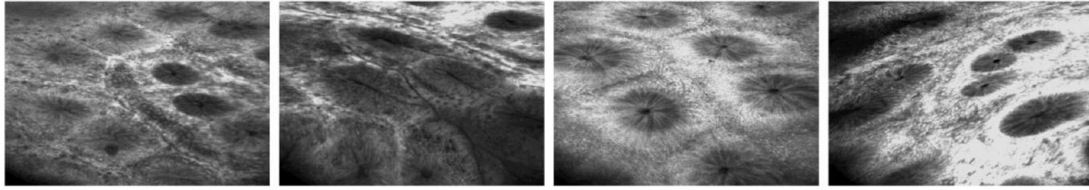
Keywords: Confocal Endomicroscopy, Image Classification, Support Vector Machine

1 Introduction

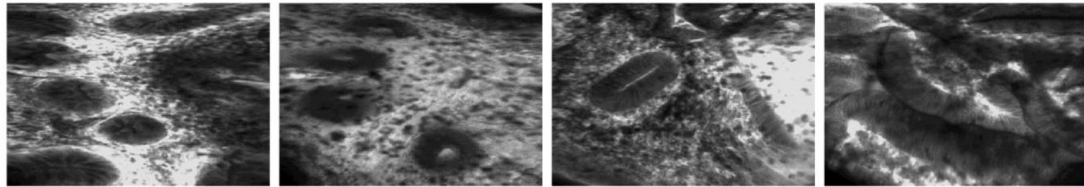
Inflammatory Bowel Disease (IBD) refers to a group of inflammatory conditions of the small intestine and the colon. Since most of the initial symptoms are undervalued by patients, IBD diseases are frequently noted at severe and chronic stages of illness. However, like in every clinical context, the diagnosis at early stages strongly increases the chances of successful treatment.

The common practice for the analysis of the histological architecture of the GI tract consists in removing the suspicious areas detected during endoscopy, and then sending them to lab analysis. Confocal Endomicroscopy (CEM) is a recently developed technique that allows the *in vivo* examination of the intestinal mucosa during ongoing endoscopy [5]. The basis behind this new diagnosis tool is the integration of a mini-confocal microscope with the distal tip of a conventional endoscope. The main advantage of the CEM over the traditional biopsy is the real-time examination of the intestinal histology, avoiding the need of tissue removal with increased risks of infection and bleeding, which require subsequent medical treatment. Unfortunately, since this is a quite recent technique, the taxonomy of CEM images has not yet been clearly defined. Physicians are still

2 Sara Couceiro¹, João P. Barreto¹, Paulo Freire², and Pedro Figueiredo²



(a) data subset 1: *low probability of pathology*



(b) data subset 2: *high probability of pathology*

Fig. 1. Inter and intra class variability.

exploring the complexity of these images and, even for them, their interpretation is still a challenging task [1].

This paper presents exploratory research toward building an on-the-fly automatic classification system to distinguish between two main IBD stages: *low* and *high probability of pathology*. The main challenge in this classification problem is related to the intra and inter class variability. As it is shown in Fig.1, besides the great variability between images from the same class, the differences between the two classes are not clearly evident.

In what concerns the histological architecture of the GI tract, the most evident structures are the intestinal crypts, which are responsible for the ongoing renewal of the epithelial tissue. According to experts feedback, the presence of crypts in the tissue is highly relevant to make a diagnosis. Their number, shape, appearance and distribution over the tissue are determinant to distinguish between the disease stages. Therefore, we focus on segmentation and description of these intestinal structures to detect abnormalities in the tissue.

Due the novelty of the CEM technique, the classification of the CEM images has not been very explored yet. Relevant references can be found in [1, 2], where André *et al* propose a content-based retrieval approach to perform classification of endomicroscopic images from an expert-annotated database. It starts by describing images using bi-scale dense Scale-Invariant Feature Transform (SIFT) features [8], that are quantized into visual words using k-means clustering. The classification is then performed by querying an image database with a histogram of visual words and retrieving the most similar images from the database. This approach requires large amounts of storage space, which may become unfeasible for large database sizes.

Unlike André's works [1, 2], that blindly apply techniques developed for conventional perspective cameras, we build our system based on the physicians interpretation of CEM images. We rely on tissue's histological properties to create

a real-time classification system to assist doctors during endoscopy, while segmenting relevant structures and, therefore, provide helpful guidances for medical imaging analysis.

The paper outline is as follows: Section 2 describes the image segmentation scheme used to locate crypts in the tissue. In section 3, we refer to the chosen approach to face the classification task. Section 4 contains the experiments and discussion. In section 5, we present the actual research conclusions and refer to future work goals.

2 Detection and Segmentation of Crypts in CEM images

Due to the great appearance variability of crypts, their segmentation is not a trivial task. As it can be observed in Fig. 1, crypts are irregular structures with markedly different texture patterns, and contour boundaries that are often poorly defined. In many cases, it is very difficult to accurately locate the exact frontier that separates the interior and exterior areas of a crypt, since there is a soft transition between these two s.

We propose an algorithm for the detection and segmentation of crypts that comprises three main steps, which are further explained in 2.1, 2.2 and 2.3. We start by performing the detection of crypts' centers by searching for local maxima in an energy of image symmetry (Fig.2(a)). Then, in the segmentation stage, we use a canny filter to locate the contours of these structures and fit an ellipse to the edge points (Fig. 2(b)). As we can see from Fig. 2(a) and 2(b), the detection step, not only catches the real centers of the crypts, but also several points that effectively denote symmetric structures in the image, but do not correspond to any crypt. Since there is no obvious solution to immediately discard the false detections, we decided to follow a strategy of overdetection. Centers detector is tuned to catch every high symmetric location, and the segmentation process is fully carried for all the detected keypoints. In the last stage (Fig. 2(c)), we use a binary Support Vector Machine (SVM) discriminator that will decide if each segmented corresponds to a crypt.

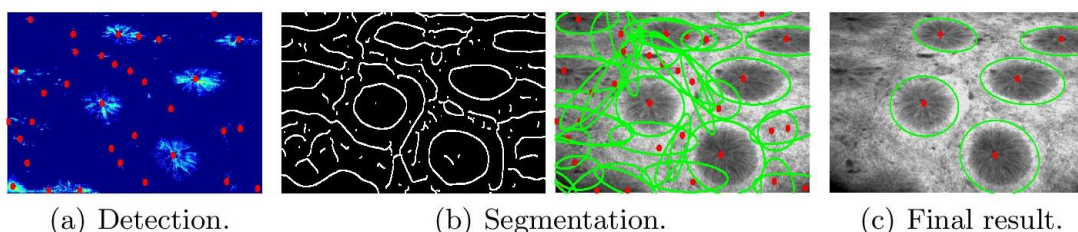


Fig. 2. Detection and Segmentation of Crypts in CEM images.

2.1 Detection of Crypts' Centers based on Symmetry Energy

Despite crypts great variability, their shapes range from circular to elongate, reminding elliptical structures, which are symmetric objects. We rely on this symmetry property of the crypts to identify them in intestinal tissue images. Like in [7], we explore the bilateral symmetry of the local intensity levels of the image signal, by using a frequency-based approach. The extraction of local frequency information is done through a multi-resolution wavelet analysis, by using a bank of filters tuned at different scales. We use log-Gabor wavelets to obtain amplitude and phase information from the image signal [7].

The location of crypts centers is performed by computing local maxima of the symmetry energy (Fig. 3(a)).

2.2 Crypts' Shape Segmentation

Due to the elliptical shape of crypts, the most natural segmentation approach is to find an ellipse around each one of the detected keypoints. This is done by searching for boundary points around the center of the crypt and then fit a conic to them. The algorithm herein described was inspired and adapted from [10].

We first apply a Canny edge detector [3] over the original image signal to extract strong intensity transitions. Since the Canny algorithm relies on image local derivatives, it is highly sensible to noisy image data. To improve the final output of the Canny detector, we blur the image with a Gaussian kernel that is tuned to preserve crypts boundaries and eliminate other (irrelevant) image details. For each detected keypoint, we perform a radial search of boundary points, as proposed in [10]. We consider a searching circular patch in the original image whose center is the detected keypoint, and whose radius is large enough to include the whole crypt. The patch is mapped into a polar image by changing from Cartesian coordinates $\mathbf{x} = (x, y)^T$ to polar coordinates $\chi = (\rho, \theta)^T$. The ρ -dimension is scanned from the left to the right to find positive responses of the Canny filter, as show in Fig.3(b). Fig.3(c) shows the detected transitions mapped back from the polar space to the original Cartesian space. The parameters of the ellipse that best fits the detected edge points are determined using a RANdom SAmple Consensus (RANSAC) [4, 10]. The final result is shown in Fig 3(d).

2.3 Crypts Description and SVM Discriminator

In this step, we aim at building a discriminative local description scheme to encode crypts' appearance that enables a standard SVM classifier to distinguish between crypts and other symmetric structures.

Before the descriptors computation, we perform a normalization step of the segmented s to increase the resilience of the description schemes to image transformations, as shown in Fig.4. We use an affine transformation to map the segmented ellipses to equally sized circumferences. This corresponds to warp the image to a normalized isotropic patch in which the computed descriptors will be affine invariant by construction. This not only allows to normalize the shape

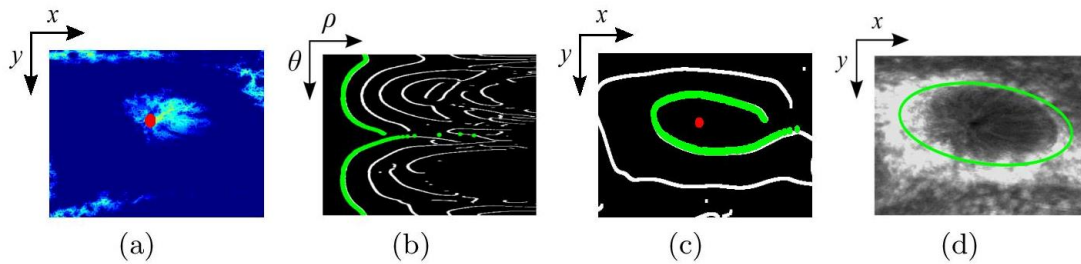


Fig. 3. Detailed steps of the detection and segmentation of a crypt in a CEM image. The search from left to right in the radial image (b) is substantially faster than in the Cartesian image (c).

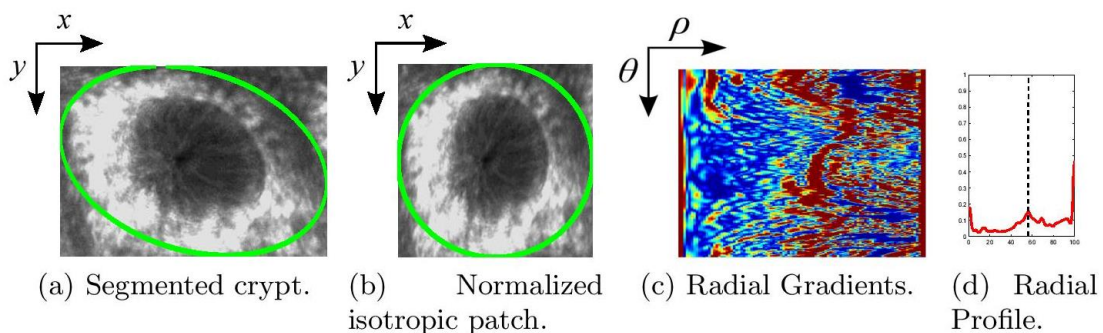


Fig. 4. Normalization step followed by feature extraction.

of crypts, but also to reduce the slant effect that occurs if the endoscope is not positioned perpendicularly to the tissue surface during image acquisition.

We start by trying the SIFT descriptor [8] and texture analysis methods like Histogram Moments, Gray Level Co-occurrence Matrix (GLCM) and Laws Energy [9], which have already been employed in the past in the context of medical image classification. In addition, we experiment with a specifically created radial descriptor, that uses image gradients for capturing small intensity and texture variations between crypts' interior and exterior s. The idea is to identify a transition that might correspond to the boundary of the crypts and, thus, encode the shape of these structures. Such a radial gradient profile is obtained by averaging the gradient magnitude values over 360 degrees around the center of each crypt (Fig.4(c)). The descriptor is normalized using the L2-norm for robustness against image contrast and brightness changes [8]. Fig.4(d) shows the normalized radial profile, in which it is possible to identify a slight peak of magnitude, marked by the dashed line, which corresponds to the boundary of the crypt.

3 Classification

As pointed out by medical experts, the spatial organization of crypts in CEM images is highly discriminative to distinguish between disease stages. Therefore, we propose to split the data into two main subsets: subset 1, in which there is

6 Sara Couceiro¹, João P. Barreto¹, Paulo Freire², and Pedro Figueiredo²

a certain patterned arrangement of crypts, and subset 2, in which the tissue's appearance is closer to a disordered stage. From a medical diagnosis point-of-view, this corresponds to a division between images with low (set 1) and high (set 2) probability of pathology. The diagnosis is accomplished by a standard SVM classifier that decides to which set the input image belongs. The SVM is applied on a feature vector that encodes the number of crypts in each image, provided by the crypts detector, and their arrangement in the tissue (*lattice*), computed using Delaunay Triangulation.

4 Experimental Validation

4.1 Dataset specifications and Cross-Validation Scheme

Our expert-annotated database contains a total of 192 CEM images, collected from 18 patients using a Pentax CEM device with a field-of-view (FOV) of 475 μm . The images are distributed over the two subsets as follows: 88 (46%) belonging to subset 1 and 104 (54%) to subset 2. Both in the SVM discriminator stage of crypts detection and in the binary SVM image classifier, we use the RBF kernel and 10-fold cross-validation to classify the whole dataset. The SVM parameters σ (spread of RBF kernel) and C (regularization term) were adjusted using a two-layer grid-search, as proposed in [6].

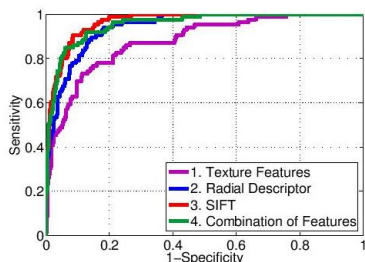
4.2 Evaluation of Crypts Detection and Segmentation

The success of centers detection is evaluated by quantifying the proportion of correctly detected centers. Thus, a local maxima is only accepted as a true detection if it is close enough to a real center. Both in subsets 1 and 2, we achieve high detection recalls (0.99). However, since we follow an overdetection approach, the precision values are very low (0.33 and 0.07 in subsets 1 and 2, respectively).

The success of the segmentation is quantified by metrics that compare the segmentation curves computed from crypts detector with the expert annotations. The criteria used in this comparison is based in the overlap area, the distance between the centers and the difference between the rotation angles. The segmentation algorithm performs quite well in subset 1, with a percentage of correctly segmented crypts of 78%, but falls short in subset 2, in which its performance is only about 42%. This is related to the tissue's appearance of the dataset images. In the first subset, there is a certain patterned arrangement of crypts. Besides, these structures show a more regular shape and their contours have stronger intensity transitions than in subset 2, which improves the canny's response.

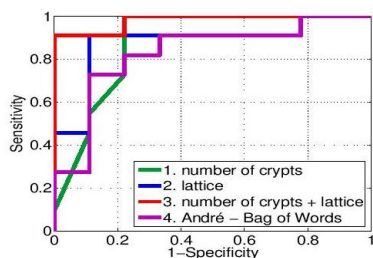
In the SVM discrimination step, we compare the proposed radial gradient descriptor with textures features [9] and the SIFT descriptor [1,2,8]. The results are shown in Fig. 5. Our descriptor clearly outperforms the texture features and has very similar performance to the SIFT descriptor, with the advantage of being much simpler and easier to compute. It is also quite interesting to observe that, when using all the evaluated features, the precision of the detector increases (by reducing the number of spurious detections), but the recall is slightly decreased.

Description and Classification of CEM Images for the Diagnosis of IBD



	ACC	SE	SP	PRC
1	0.80	0.80	0.80	0.37
2	0.86	0.86	0.86	0.47
3	0.89	0.88	0.89	0.55
4	0.92	0.73	0.94	0.67

Fig. 5. SVM Discriminator Scores. The graph shows a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve obtained from one of the 10-fold cross validation rounds and the table shows the values of Accuracy (ACC), Sensitivity (SE), Specificity (SP) and Precision (PRC) computed by averaging the results over the rounds.



	ACC	SE	SP	PRC
1	0.83	0.86	0.80	0.83
2	0.86	0.85	0.88	0.90
3	0.89	0.90	0.88	0.90
4	0.71	0.82	0.58	0.71

Fig. 6. Image Classification Scores. The graph shows a ROC curve obtained from one of the 10-fold cross-validation rounds and the table shows the values of Accuracy (ACC), Sensitivity (SE), Specificity (SP) and Precision (PRC) computed by averaging the results over the rounds.

4.3 Image Classification Evaluation

In the image classification stage, we compare the features we proposed based on experts interpretation of CEM images with SIFT descriptor [1, 2, 8]. The results are shown in Fig. 6. As proposed in [1, 2], we quantize SIFT features into visual words and encode them in image histograms. Then, instead of performing the retrieval, we use these histograms to train the SVM classifier. In the available dataset, our descriptor provides higher scores than André's. We consider this result quite satisfactory, since we are using conceptually simpler features, which reflect experts clinical evaluation of the GI histological appearance.

5 Conclusion

This paper presents preliminary research toward building an on-the-fly CEM image classification system, based on the physicians interpretation of the histological architecture of the GI tract, while segmenting relevant structures in the tissue and, thus, provide useful imaging analysis information. Given the complexity of the classification problem and the small size of the available dataset, we consider the current results encouraging toward further research. The current image classifier's performance shows that the histological appearance of

CEM images provide reliable information to train a discriminative and robust classifier. However, some technical improvements still need to be carried out to improve the crypts detector results. Currently, we are conducting research toward the enhancement of the discriminative power of the features used in the SVM discriminator. We aim at developing specific crypts descriptors to increase the SVM discrimination precision while maintaining high recall rates (Fig. 5). Future research directions will also focus on the improvement of the RANSAC-based segmentation both in terms of computational time and accuracy.

References

1. Barbara André, Tom Vercauteren, Anna M. Buchner, Michael B. Wallace, and Nicholas Ayache. A Smart Atlas for Endomicroscopy using Automated Video Retrieval. *Medical Image Analysis*, 15(4):460–476, 2011.
2. Barbara André, Tom Vercauteren, Aymeric Perchant, Anna M. Buchner, Michael B. Wallace, and Nicholas Ayache. Introducing space and time in local feature-based endomicroscopic image retrieval. In *Proceedings of the First MICCAI international conference on Medical Content-Based Retrieval for Clinical Decision Support*, MCBR-CDS'09, pages 18–30, Berlin, Heidelberg, 2010. Springer-Verlag.
3. J. Canny. A Computational Approach to Edge Detection. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, 8(6):679–698, June 1986.
4. Martin A. Fischler and Robert C. Bolles. Random sample consensus: a paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Commun. ACM*, 24(6):381–395, June 1981.
5. A Hoffman, M Goetz, M Vieth, P R Galle, M F Neurath, and R Kiesslich. Confocal laser endomicroscopy: technical status and current indications. *Endoscopy*, 38(12):1275–83, 2006.
6. Chih-Wei Hsu, Chih-Chung Chang, and Chih-Jen Lin. A practical guide to support vector classification. Technical report, Department of Computer Science, National Taiwan University, 2003.
7. Peter Kovesi. Symmetry and asymmetry from local phase. In *Tenth Australian Joint Conference on Artificial Intelligence*, pages 2–4, 1997.
8. David G. Lowe. Distinctive image features from scale-invariant keypoints. *Int. J. Comput. Vision*, 60(2):91–110, November 2004.
9. R. Manavalan and K. Thangavel. Evaluation of textural feature extraction methods for prostate cancer trus medical images. *International Journal of Computer Applications*, 36(12):33–39, December 2011.
10. Rui Melo, João P. Barreto, and Gabriel Falcao. A new solution for camera calibration and real-time image distortion correction in medical endoscopy-initial technical evaluation. *IEEE Trans. Biomed. Engineering*, 59(3):634–644, 2012.
11. Josef Sivic and Andrew Zisserman. Video google: A text retrieval approach to object matching in videos. In *ICCV*, pages 1470–1477, 2003.

PARTE III

FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES

SECÇÃO 1

REVISÃO DA LITERATURA

ABREVIATURAS POR ORDEM ALFABÉTICA

AAS – Ácido acetilsalicílico

AINE's – Anti-inflamatórios não esteróides

CCR – Cancro colo-rectal

CU – Colite ulcerosa

FCA – Focos de criptas aberrantes

IMC – Índice de massa corporal

IC – Intervalo de confiança

OR – *Odds ratio*

PAF – Polipose adenomatosa familiar

UMA – Unidades maço ano

ROC – *Receiver operating characteristic*

CAPÍTULO 11. FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES COMO PRECURSORES E/OU BIOMARCADORES DE NEOPLASIA DO CÓLON

11.1. ORIGEM E DEFINIÇÃO DOS FOCOS DE CRIPTAS ABERRANTES (FCA)

O epitélio intestinal caracteriza-se por ser um tecido de renovação rápida e frequente cuja homeostase é garantida pelo equilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose [1]. Em criptas normais, uma *stem cell* localizada no fundo das criptas dá origem a todas as células da estrutura, com progressão e diferenciação em sentido apical [2]. A zona proliferativa localiza-se nos dois terços inferiores das criptas, enquanto no terço superior se encontram as células diferenciadas que, no topo da cripta, acabam por sofrer apoptose [3]. Este processo decorre com celeridade, determinando renovação completa das criptas a cada 5 dias [1,4]. Quando, por qualquer motivo, este equilíbrio é perdido, formam-se criptas aberrantes [1,4].

Em termos morfológicos, as criptas aberrantes definem-se como conjuntos de uma ou mais criptas mais largas e discretamente elevadas relativamente às circundantes, apresentando uma camada de células epiteliais espessada, que cora mais intensamente com o azul de metileno que a das criptas adjacentes, existindo, igualmente, um aumento do espaço peri-críptico [5-9]. Recentemente, respondendo à necessidade de tornar a definição mais objectiva, alguns estudos definiram que a saliência das criptas aberrantes deveria ser < 2mm, considerando como pólipos as estruturas em que a elevação fosse superior a esse limite [10-12]. Estas características que definem, por assim dizer, o perfil completo das criptas aberrantes, não foram uniformemente incluídas ou exigidas nas definições usadas nos diferentes estudos [5-9]. Daqui ressalta, desde logo, uma ausência de standardização que dificulta, por vezes, uma interpretação una e integrada de diferentes trabalhos [13].

11.2. ESTUDOS EM MODELO ANIMAL

Em 1987, na sequência da administração de um agente cancerígeno (azoximetano) a ratos, Bird estudou o cólon desses animais através de cromoscopia com azul de metileno e uso de estereomicroscopia e, nesse contexto, descreveu pela primeira vez os FCA [14].

Posteriormente, vários estudos demonstraram a existência duma relação dose-resposta entre os carcinogéneos administrados, tais como azoximetano e dimetil-hidrazina, e o número de FCA induzidos no cólon e recto [15-18]. Simetricamente, a intervenção com dieta rica em fibras ou com fármacos quimiopreventivos como ácido acetilsalicílico (AAS), anti-inflamatórios não esteróides (AINE's), ácido desoxicólico e dissulfiram teve um efeito inibidor sobre os FCA e, também, do desenvolvimento de cancro colo-rectal (CCR) [19-25]. Fitoquímicos específicos incluindo flavonóides e produtos de degradação do glucosinolato, certos ácidos gordos polinsaturados e o ácido gordo de cadeia curta butirato, demonstraram um

efeito supressivo sobre a formação de FCA através da modulação da proliferação celular e da apoptose [26,27]. Por outro lado, a vitamina E e o betacaroteno revelaram um efeito inibitório da progressão dos FCA para CCR [19].

A utilização dos FCA, em vez do CCR, como *end point* em trabalhos desenhados para estudar propriedades quimiopreventivas é uma estratégia muito atractiva porque os FCA, existindo em maior número e desenvolvendo-se mais precocemente do que o CCR, permitem obter resultados quantificáveis num período de tempo mais curto e usando amostras menores. Neste contexto, realizaram-se vários estudos para testar potenciais agentes quimiopreventivos usando os FCA como *end point* [28-32]. Não obstante, o facto dos FCA displásicos serem comuns nos modelos animais mas relativamente raros nos humanos salienta a necessidade de olhar as conclusões desses trabalhos com algumas reservas, já que os resultados obtidos nesses modelos animais podem não ser aplicáveis em humanos [33].

Os estudos de cinética celular proporcionam argumentos suplementares a favor dos FCA como lesão precursora das neoplasias colo-rectais. De facto, verificou-se um aumento da actividade proliferativa média dos FCA colhidos em ratos após administração de azoximetano, sendo três a quatro vezes superior à da mucosa normal adjacente e idêntica à encontrada nas neoplasias benignas e malignas provenientes desses animais [34,35]. Contrariando o que se passa em criptas normais, nas quais a proliferação celular se processa no fundo das criptas, havendo uma perda progressiva desta capacidade à medida que as células migram em direcção à superfície, a proliferação nos FCA encontra-se elevada nos compartimentos mais superficiais [3,36]. A este “status” hiperproliferativo parece associar-se uma resistência à morte celular programada, evidenciada por um índice de apoptose inferior ao detectado em criptas normais [37].

É, no entanto, claro que nem todos os FCA evoluem no sentido de neoplasia. Um estudo de Shpitz e col. mostrou que, apesar de os FCA poderem originar aparecimento de tumores, muitas destas lesões identificadas precocemente no processo de carcinogénese experimental induzida pelo azoximetano não têm qualquer capacidade evolutiva, podendo até regredir [38]. De acordo com este dado está o conhecimento de que as características histológicas dos FCA são variáveis, nomeadamente quando se considera a atipia nuclear, um indicador de displasia, bem como o número de criptas existentes em cada foco, sendo a progressão das lesões tanto mais frequente quanto maior a atipia nuclear e o número de criptas por foco [18]. No mesmo sentido, estudos em modelo murino verificaram que o tamanho dos FCA tem valor preditivo relativamente à incidência de CCR [39,40].

11.2. ESTUDOS HUMANOS

11.2.1. Descrições *ex vivo*

Cerca de 4 anos após a descrição original em animais, os FCA foram descritos pela primeira vez em humanos, nomeadamente em peças de colectomia [41,42]. Vários estudos demonstraram, nesse contexto, uma densidade de FCA significativamente superior nos doentes com CCR em comparação com os controlos [41–43]. Refira-se, contudo, que um estudo revelou uma associação inversa, resultado que deverá, no entanto, ser olhado com cautela dada a reduzida dimensão da amostra incluída nesse trabalho [44].

11.2.2. Primeira descrição *in vivo*

Em 1997, Yokota e col. relataram pela primeira vez a identificação *in vivo* de FCA no cólon de um doente com CCR, através da realização de cromoendoscopia com azul de metileno e utilização de um endoscópio com magnificação [8]. Foi assim aberto o caminho para uma ampla e interessante área de investigação.

11.2.3. Estudos epidemiológicos e caso-controlo de associação entre FCA e neoplasia colo-rectal

Uma equipa liderada por Takayama publicou, em 1998, o primeiro e mais citado estudo nesta área [6]. Este trabalho incluiu 325 doentes, correspondentes a 147 sem lesões cólicas, 130 com adenoma e 48 com CCR, nos quais os FCA foram pesquisados após cromoscopia com azul de metileno e fazendo uso de magnificação endoscópica [6]. A prevalência e a mediana dos FCA foram de 55%, 90% e 100% e de 6,1, 5,0 e 26,5, nos grupos sem lesões, com adenomas e com CCR, respectivamente. Estas diferenças eram significativas em termos estatísticos e mantinham essa mesma significância realizando a análise com estratificação por idades [6].

Com desenho e metodologia semelhantes, Adler e col. estudaram 90 doentes, equitativamente distribuídos por três grupos: sem lesões no cólon, com adenoma e com CCR [9]. Os autores detectaram FCA em 23, 25 e 28 dos doentes de cada um desses grupos, com um número médio de 5,0, 6,9 e 9,9, respectivamente, constatando significado estatístico para a diferença entre o número de FCA no grupo de doentes sem lesões e nos que tinham CCR, resultado igualmente verificado após estratificação de acordo com a idade [9].

Os resultados destes trabalhos, confirmando os indícios suscitados pelos estudos animais, denunciaram os FCA como potencial precursor e/ou biomarcador da clássica sequência adenoma-carcinoma exofíticos [6,9]. Com o enraizamento e aceitação crescentes da existência duma via alternativa de cancerização dita de novo, ou seja, sem o clássico pólipos exofítico a preceder o desenvolvimento de CCR (sequência adenoma-carcinoma planos), Hurlstone hipotetizou que os FCA poderiam ser também um evento precoce e/ou sinalizador dessa via

[5]. Neste contexto, pesquisou FCA num estudo caso-controlo que incluiu 574 doentes sem lesões cólicas, 281 com adenomas planos e 24 com CCR igualmente com fenótipo plano [5]. A prevalência e a mediana de FCA foram de 15%, 82% e 100% e de 1, 9 e 38, nos doentes sem lesões, com adenomas e com CCR, respectivamente, diferenças que assumiram, todas elas, significado estatístico, salientando-se contudo que os resultados não foram estratificados em função da idade [5].

Nos estudos descritos anteriormente, a identificação dos FCA foi realizada sob avaliação endoscópica com magnificação, técnica que não se encontra disseminada e cuja aplicação exige, além de tempo, algum treino, o que de certa forma obstaculiza a difusão da sua aplicação na prática clínica [5,6,9]. Estes preceitos sustentaram o estudo reportado em 2006 por Seike e col., cujo desenho foi sobreponível aos dos anteriores mas com uma alteração metodológica: a identificação dos FCA com cromoendoscopia e visão endoscópica convencional, em substituição da magnificação endoscópica usada sistematicamente até à data [5,6,9,45]. O estudo obteve resultados semelhantes aos dos trabalhos já existentes, ou seja, validando também para a cromoendoscopia com visão endoscópica convencional a conclusão dum número crescente de FCA desde os doentes sem lesões cólicas até aos com CCR, passando por aqueles com adenoma, com diferenças que se revelaram estatisticamente significativas, antes e depois da estratificação etária [5,6,9,45]. A análise multivariada salientou ainda que a ausência de FCA se assumia como o mais forte factor preditivo da inexistência de lesões colo-rectais avançadas [45].

Surgiram, entretanto, alguns estudos com resultados dissonantes, nomeadamente relatando a ausência de relação significativa entre a prevalência/número de FCA e a existência de neoplasia colo-rectal [46, 47]. Um desses trabalhos é um estudo multicêntrico que incluiu 505 doentes (42% sem adenomas, 32% com adenomas não avançados e 25% com adenomas avançados), revelando uma prevalência de FCA de 67%, 69% e 66% e um número médio dessas lesões endoscópicas de 3,1, 3,5 e 3,6, nos grupos de doentes sem adenomas, com adenomas não avançados e com adenomas avançados, respectivamente, diferenças que não alcançaram significado estatístico [46]. Contudo, é preciso salientar que neste trabalho o *status* de adenoma e a consequente definição dos grupos se baseou nos resultados de sigmoidoscopias flexíveis realizadas, em média, 8 anos antes da avaliação dos FCA, pelo que não é possível excluir a contaminação do grupo controlo por doentes com adenoma [46]. O outro estudo, dirigido por Jae Kim, recebeu críticas relativamente à metodologia utilizada, designadamente no que concerne à baixa concentração do corante usado (azul de metileno a 0,05%) bem como à metodologia da concretização da cromoscopia, que foi realizada sob a forma de clister e não por injeção através de cateter intra-endoscópico, questões que poderão ter prejudicado a acuidade da identificação dos FCA e justificar os números surpreendentemente baixos destas lesões endoscópicas reportadas nesse trabalho [47].

Recentemente, a equipa liderada por Sakai retomou a questão e procurou a resposta numa amostra de 861 doentes, dos quais 383 não tinham lesões no cólon, 372 tinham adenomas e os restantes 106 tinham CCR. A prevalência e a média de FCA, nos três grupos respectivos, foi de 64%, 88% e 95% e de 3,6, 6,2 e 10,1, com

as diferenças a assumirem, em modelos ajustados à idade, significância estatística [48]. Estes resultados reanimaram a convicção dos FCA como biomarcador de neoplasia colo-rectal, não eliminando, contudo, de forma liminar nem definitiva o cepticismo que a questão continua a despertar [48].

11.2.4. Relação entre os FCA e a localização de neoplasias colo-rectais

A potencial relação entre a prevalência e o número de FCA com a localização das neoplasias colo-rectais é uma questão suscitada desde o estudo pioneiro de Takayama e col. [6]. Nesse trabalho, dos 130 doentes com adenomas, 16 (12%) não tinham qualquer FCA no recto e, desses, 13 tinham os adenomas localizados no cólon direito. Por seu turno, 109 (96%) dos 114 doentes com adenomas e existência de FCA no recto, tinham os adenomas localizados no cólon esquerdo [6]. Apesar destes resultados indicarem que a avaliação dos FCA no recto tem um valor preditivo mais elevado relativamente à existência de lesões no cólon esquerdo do que do cólon direito, dados resultantes doutros trabalhos revelaram que os FCA avaliados no recto têm também valor preditivo relativamente à existência de lesões no cólon direito [5,6,45].

Também a favor da existência de relação entre a frequência de FCA e a localização das lesões estão os dados dum estudo desenvolvido e publicado pelo nosso centro, em que as neoplasias localizadas no recto se associaram a um número FCA significativamente superior ao das lesões sediadas noutra localização cólica ($p = 0,01$) [49]. Resultados similares foram obtidos quando a mesma análise foi realizada considerando apenas os doentes com adenoma ($p = 0,03$) [49].

Em sentido contrário apontam os resultados do estudo liderado por Sakai, em que a localização dos adenomas e dos CCR não revelou relação significativa com a prevalência nem com o número de FCA rectais [48].

Algo surpreendentes são os resultados de um outro trabalho em que os FCA rectais de maiores dimensões se correlacionaram significativamente com a existência de pólipos hiperplásicos no cólon esquerdo, enquanto os FCA de menores dimensões tinham valor preditivo significativo para a existência de adenomas também no cólon esquerdo. Convém, contudo, salientar que este trabalho encerra algumas limitações metodológicas já especificadas anteriormente [47].

11.2.5. Relação dos FCA com o tamanho e o número de neoplasias colo-rectais

No que concerne ao tamanho, o trabalho levado a cabo pelo nosso centro revelou que os adenomas com ≥ 1 cm se associavam a um número de FCA significativamente superior ao que se verificava nos casos em que os pólipos tinham dimensões menores ($p = 0,02$) [49].

Relativamente ao número de lesões, vários trabalhos apontam no sentido da existência duma correlação entre o número de FCA e a cifra de lesões colo-rectais, ainda que nem sempre a magnitude dessa associação tenha sido suficiente para atingir significado estatístico [5, 6, 45, 49].

11.2.6. Relação dos FCA com a recorrência de neoplasias colo-rectais

Dois trabalhos publicados em 2012 analisaram o valor preditivo dos FCA relativamente à recorrência de adenomas [50,51].

Num desses trabalhos, foi analisada a eventual associação entre o número de FCA avaliado na colonoscopia índice em que havia sido feita polipectomia e o risco de detectar adenomas em colonoscopia de controlo efectuada 3 anos depois [50]. O número de FCA nos doentes com recorrência de adenoma foi significativamente superior ao que se verificou nos doentes que não apresentaram recorrência de adenoma ($7,88 \pm 6,35$ vs. $2,19 \pm 2,95$, $p < 0,001$) [50]. Importa salientar que o significado estatístico dessa diferença se manteve quando se procedeu a análise multivariada, identificando assim o número de FCA como um factor independente de risco da recorrência de adenomas [50]. Através de análise por curva *receiver operating characteristic (ROC)* constatou-se uma área de baixo da curva de 0,836, ou seja, atestando ao número de FCA um bom poder discriminativo do risco de recorrência de adenomas [50]. Ainda pela análise *ROC*, foi definido o número de 6 FCA como *cut-off* mais adequado na predição desse risco, o qual tinha associado sensibilidade = 55%, especificidade = 90,5%, valor preditivo positivo = 84,6% e valor preditivo negativo = 67,9% [50].

No outro estudo, verificou-se que a existência de mais do que 6 FCA era um factor independente de risco para recorrência sob a forma de neoplasia avançada, sublinhando o potencial dos FCA como importantes factores de risco de recorrência de neoplasias colo-rectais, podendo, dessa forma, ajudar a estratificar o risco destes doentes e a aprimorar a programação da vigilância [51].

11.2.7. Local de pesquisa dos FCA

A grande maioria dos estudos incidindo sobre FCA realizaram a respectiva pesquisa apenas a nível do recto [5-7,9,45,48,52,53]. Esta opção sustentou-se nos resultados de trabalhos, tanto em peça cirúrgica como de índole endoscópica, que revelaram que os FCA são mais frequentes no cólon esquerdo e, em especial, no recto, sendo a sua frequência nessa região representativa do número global de FCA presentes na totalidade do cólon [6,54-56]. Esta predilecção pelo cólon distal seria, aliás, de certa forma expectável, se tivermos em mente as frequências de distribuição da localização do CCR [57].

Acresce que a limitação da pesquisa dos FCA ao recto é especialmente atractiva por se tratar duma área mais acessível, com menor peristaltismo, permitindo um procedimento menos demorado e laborioso e, por consequência, garantido uma melhor tolerância e adesão por parte dos doentes, elementos que se revestem

de primordial importância se olharmos para este procedimento como uma potencial estratégia a aplicar no rastreio e/ou seguimento de doentes em larga escala.

Importa, contudo, salientar que um trabalho relativamente recente constatou que a pesquisa de FCA distalmente ao ângulo esplénico permite obter informação mais significativa e representativa do que a mesma avaliação confinada ao recto [47]. Não obstante, para além dos inconvenientes inerentes à extensão da área de pesquisa dos FCA, o estudo em causa foi alvo de várias críticas metodológicas, das quais se destaca o facto da cromoscopia ter sido efectuada por infusão rectal de corante e não pelo método habitual de injeção por via endoscópica [47].

11.3. DIFERENTES TIPOS DE FCA – AVALIAÇÃO ENDOSCÓPICA, HISTOLÓGICA E CORRELAÇÃO ENTRE AMBAS

Do ponto de vista histológico foram propostos vários esquemas de categorização dos FCA, desde uma classificação dicotómica mais simples (hiperplásicos e displásicos), até uma mais complexa composta por 4 categorias (simples, hiperplásicos, displasia moderada e displasia grave), passando por uma intermédia com 3 classes (não hiperplásicos não displásicos, hiperplásicos e displásicos) [5,6,8,13,43,59]. Há, actualmente, uma tendência para adopção preferencial do esquema simplificado de duas categorias que é, aliás, o recomendado pela Organização Mundial de Saúde [60]. A tradução endoscópica dos diferentes tipos histológicos de FCA também se caracteriza por uma multiplicidade de critérios, considerando-se, em termos simplistas e genéricos, que criptas com lúmen arredondado, dilatado ou em fenda são compatíveis com FCA não hiperplásicos, criptas com lúmen em estrela são sugestivas de FCA hiperplásicos e, por último, criptas com epitélio espessado e lúmen comprimido são indicadoras de FCA displásicos [54].

O interesse de proceder à classificação dos diversos tipos histológicos adveio da acumulação de evidência de que os FCA displásicos teriam potencial de degeneração maligna. Esta convicção resultou, essencialmente, de três linhas de constatação: 1 – elevada prevalência e densidade de FCA displásicos em condições pré-cancerosas como a polipose adenomatosa familiar (PAF); 2 - frequência significativamente maior de FCA displásicos em doentes com adenoma ou CCR do que em indivíduos sem essas lesões; 3 – identificação nos FCA displásicos de alterações genéticas reconhecidas como importantes nos estádios mais precoces da carcinogénese colo-rectal [5,6,58,61,62].

Existe uma grande variabilidade no que diz respeito à prevalência de FCA relatada na literatura, com valores que variam entre 18% e 100%, ainda que a maioria dos estudos tenha detectado cifras entre os 75% e os 100% [5,6,9,10,12,45,49]. Essa disparidade é ainda mais marcada quando restringimos a análise aos FCA displásicos. A sua prevalência em doentes com CCR varia entre 6% e 54% nos estudos que avaliaram peças de colectomia e entre 0% a 16% nos trabalhos em que a detecção foi efectuada endoscopicamente [5,9,44,63]. Acresce que, por razões desconhecidas, na maioria dos estudos Europeus e Japoneses a prevalência de FCA

displásicos varia entre 10% e 29%, enquanto nos trabalhos Norte Americanos foram detectadas prevalências significativamente menores ou até mesmo inexistência de FCA displásicos [5-7,9,43,46,53,55,58, 64,65].

A confirmação e caracterização histológica dos FCA também denotam uma grande variabilidade através dos diversos estudos. De facto, dos FCA detectados endoscopicamente apenas 53% a 92% são confirmados através da avaliação histológica [6,9,10,45,46]. De forma inversa, mas igualmente curiosa, 5% das biopsias obtidas em localizações catalogadas endoscopicamente como normais são caracterizadas como FCA através da apreciação histológica [46].

As variabilidades e disparidades descritas anteriormente podem dever-se a múltiplos factores. Por um lado, a identificação de FCA através da magnificação endoscópica caracteriza-se por importantes variabilidades intra e inter-observador, que, aparentemente, não se dissolvem de forma absoluta com o treino na técnica [11,12]. Essa limitação resultará, pelo menos em parte, da inexistência de critérios objectivos e reprodutíveis para identificação e caracterização dos FCA [33,56,66]. Os mesmos problemas taxonómicos e de variabilidade inter-observador são enfrentados pelos Anátomo-Patologistas, que não dispõem de critérios estandardizados para identificação e categorização dos FCA [33,63]. Acresce que, por diversas razões, a histologia pode não ser, neste contexto, um *gold standard* adequado: os FCA, sobretudo alguns deles, são lesões pequenas que podem não ser englobados na biopsia ou constituir apenas uma pequena parte do material biopsado; a hemorragia consequente às biopsias obscurece o campo de visão e dificulta a realização das colheitas seguintes; a orientação do material obtido bem como as características e forma de secção desse material podem influenciar, de forma não despreciada, a identificação e caracterização de estruturas com dimensões tão reduzidas como o são os FCA [11,46]. Recentemente, um estudo detectou uma boa correlação entre a EMC e a histologia no que se refere à identificação dos FCA, suscitando a hipótese de que a integração dessa tecnologia no contexto da avaliação dos FCA poderá obviar, ou pelo menos minorar, as conhecidas disparidades entre as avaliações endoscópica e histológica [67].

Na sequência das questões elencadas anteriormente, alguns estudos têm dispensado a biopsia e consequente avaliação histológica dos FCA [47,50,52]. Esta estratégia alberga uma legitimidade reforçada pela evidência de que existe uma correlação significativa e positiva entre o número de FCA e índices crescentes de proliferação celular bem como com níveis decrescentes de apoptose, avaliados em amostras colhidas em alguns desses FCA [49]. Por outras palavras, a relação existente entre a cinética celular e o número de FCA identificado e contabilizado endoscopicamente, consubstancia a credibilidade da técnica [49]. Não obstante, com o abandono da confirmação histológica perde-se, inevitavelmente, a categorização anátomo-patológica dos diferentes tipos de FCA, ou, dito de forma mais objectiva, soçobra a identificação de FCA displásicos. Contudo, estudos recentes sugerem que não só os FCA displásicos mas também os FCA hiperplásicos encerram potencial de malignidade, hipótese consubstanciada pela sua natureza monoclonal e pelo facto de exibirem algumas alterações genéticas reconhecidas como importantes na carcinogénese da via serreada [6,56,68-72]. Acresce que a displasia, assumindo geralmente um carácter focal, coexiste, por vezes, com hiperplasia no

mesmo FCA, sugerindo que essas condições não são mutuamente exclusivas e, mais, que FCA displásicos podem originar-se a partir de FCA hiperplásicos [64,73]. Ressalta, assim, que a categorização histológica dos FCA é, provavelmente, menos importante do que inicialmente se pensava.

11.4. MONOCLONALIDADE E PERFIL GENÉTICO DOS FCA

A constatação de que as células que compõem os FCA são proliferações monoclonais constitui um argumento sólido e substantivo a favor da sua natureza pré-neoplásica [69]. Essa condição é, ainda, reforçada pelo facto de terem sido identificadas nos FCA mutações e alterações epigenéticas que se reconhece ocorrerem em neoplasias colo-rectais [13].

A nível molecular, sabe-se que existe uma relação inversa entre os adenomas serrados sésseis e os adenomas convencionais no que diz respeito às mutações *BRAF* e *K-ras*: as mutações *BRAF* estão frequentemente associadas à histologia serrada e são raras nos adenomas não serrados, enquanto as mutações *K-ras* são comuns nos adenomas convencionais e invulgares nos adenomas serrados [70,74,75]. Os FCA têm, também, uma variante serrada que constitui a forma predominante dos FCA não displásicos. Os FCA serrados e não serrados têm uma relação inversa com as mutações *BRAF* e *K-ras*, semelhante à que existe entre os adenomas serrados e os adenomas convencionais [70,74,75].

Outra relação inversa em termos moleculares, neste caso no que se refere às mutações *K-ras* e *APC*, foi detectada entre FCA de doentes com PAF e FCA de doentes com neoplasias (adenomas ou CRC) esporádicas [33,56,76,77]. As mutações *K-ras* são frequentes nos FCA esporádicos e raras nos FCA associados a PAF, enquanto as mutações *APC* ocorrem em 100% dos FCA de doentes com PAF e são incomuns nos FCA esporádicos [33,56,76,77]. Recorde-se que se trata de duas mutações que são comuns tanto nas neoplasias esporádicas como nas dos doentes com PAF [78,79]. Assim, foi sugerido que a aquisição da mutação *APC* nos FCA esporádicos e da mutação *K-ras* nos FCA associados a PAF poderão constituir o evento desencadeante da progressão dos FCA para adenomas, nos respectivos fenótipos [33,80].

A mutação *p53*, também ela comum e importante na carcinogénese colo-rectal, já foi igualmente identificada em FCA [81,82].

Quanto à β catenina, embora a sua expressão citoplasmática e nuclear possa ser encontrada em FCA hiperplásicos, ela está frequentemente associada a FCA displásicos e aumenta proporcionalmente ao grau de displasia [83,84].

No que concerne à instabilidade de microssatélites, ela foi identificada com incidências crescentes desde os FCA, passando pelos adenomas e culminando no CCR, estando ausente em mucosa normal [85,86]. Acresce que a instabilidade de microssatélites nos FCA é tanto mais prevalente quanto maior o risco de CCR

dos doentes em causa, verificando-se, por exemplo, que se encontra presente em todos os FCA de doentes com síndrome de Lynch [85,87].

Por último, a metilação aberrante do DNA, um processo com contributo reconhecido no processo de cancerização colo-rectal, foi também identificada em FCA [72,88-91].

11.5. CINÉTICA CELULAR

A cinética celular, elemento de indiscutível e universal importância na carcinogénese, também já mereceu, como seria expectável, estudo e análise no âmbito dos FCA [49,92,93]. Em investigações de modelo animal verificou-se a existência de actividade proliferativa aumentada nos FCA e, ainda, que vários agentes quimiopreventivos exerciam influência nos FCA através da modulação da proliferação e da apoptose celulares [18,26,27]. No contexto humano, um estudo que comparou a cinética celular, nomeadamente a proliferação e a apoptose, entre mucosa normal, FCA e carcinoma, revelou resultados interessantes [49]. De facto, enquanto a apoptose era menor e a proliferação celular maior, ambas de forma significativa, na comparação entre FCA e mucosa normal, já na comparação de FCA com carcinoma, as duas propriedades da cinética celular eram significativamente maiores no tecido maligno [49]. De acordo com esses resultados, os autores especularam que o principal distúrbio da cinética celular envolvido na progressão da mucosa normal para FCA seria uma diminuição da apoptose enquanto a progressão de FCA para carcinoma resultaria dum marcado incremento da actividade proliferativa acompanhado por um aumento proporcionalmente inferior da apoptose [49].

11.6. IMPORTÂNCIA DO TAMANHO DAS CRIPTAS

Em estudos de modelo animal, nomeadamente ratos expostos a carcinogénese colo-rectais, verificou-se que quanto maior a dimensão dos FCA maior era o risco de CCR [39,40]. Nos humanos, embora a maioria dos estudos tenha revelado que os FCA de maiores dimensões se associavam a risco aumentado de terem natureza displásica bem como a maior incidência de neoplasia colo-rectal, outros trabalhos não corroboraram essas conclusões [6-8,43,44,55,63]. Acresce que um outro trabalho detectou mesmo uma relação inversa, ou seja, um aumento do risco de adenomas distais em doentes com FCA de menores dimensões (< 20 criptas) e risco aumentado de pólipos hiperplásicos em doentes com FCA de maiores dimensões (> 100 criptas) [47].

11.7. HISTÓRIA NATURAL DOS FCA

A natureza e utilidade dos FCA, nomeadamente o facto de poderem ser precursores e/ou biomarcadores de neoplasia colo-rectal, não pode ser esclarecida nem sustentada apenas por estudos epidemiológicos de associação entre essas lesões endoscópicas e o *status* de neoplasia, implicando,

inevitavelmente, o conhecimento da sua história natural. Sobre esse tema a escassa informação existente é interessante mas simultaneamente não unânime e até, de certa forma e em alguns aspectos, contraditória.

O trabalho desenvolvido por Schoen RE e colaboradores instalou algum cepticismo relativamente ao papel e utilidade dos FCA, uma vez que ao pesquisar essas lesões num grupo de doentes em duas ocasiões separadas por um período de um ano, verificou que apenas 43% dos FCA detectados no primeiro exame voltavam a ser identificados na segunda avaliação e que, adicionalmente, 56% dos doentes tinham pelo menos um novo FCA no segundo exame [10]. Concluíram os autores que os FCA têm um carácter dinâmico, incluindo aparecimento e regressão de lesões, propriedade detectada e identificada como significativa num hiato temporal de apenas um ano, e, nesse contexto, colocaram reservas na potencial natureza e utilidade dos FCA no âmbito da carcinogénese colo-rectal [10].

Dois anos mais tarde, em 2010, o mesmo grupo publicou um trabalho em que um grupo de 434 doentes foi submetido a pesquisa e sequente remoção dos FCA detectados no recto, com posterior reavaliação dentro de um ano [12]. Verificaram os autores que não só a prevalência e número médio de FCA era semelhante nas duas avaliações, mas também que existia uma correlação significativa entre o número e localização dos FCA na avaliação inicial e essas mesmas características no segundo exame [12]. Esses achados mimetizaram, de forma notável, interessante e indisfarçável, o que se sabe do contexto e história natural dos pólipos adenomatosos: o número de pólipos na colonoscopia índice em que é efectuada polipectomia é um importante factor preditivo do número de pólipos detectado nas colonoscopias de seguimento realizadas após 1-4 anos e, adita, existe uma correlação entre a localização das lesões detectadas em ambas as avaliações endoscópicas [12,94-96].

Mais recentemente, Ohkubo H liderou uma equipa que analisou, de forma retrospectiva, as alterações do número de FCA em doentes que tinham efectuado avaliação dessas lesões em pelo menos duas ocasiões intervaladas de 6 meses a 3 anos [97]. Este estudo incluiu 82 doentes e verificou a inexistência de alterações significativas do número de FCA entre as duas pesquisas, resultado apurado não apenas em termos globais mas também após estratificação de acordo com o tempo mediado entre as avaliações e igualmente depois de ter em conta o *status* actual ou prévio de neoplasia [97]. Acessoriamente, os autores reportaram que importantes factores de risco para CCR, tais como idade, hábitos tabágicos e índice de massa corporal, não se associaram a alterações significativas do número de FCA entre as duas avaliações [97]. Concluíram os investigadores que estes resultados sublinham a fiabilidade dos FCA como potencial biomarcador de neoplasia colo-rectal [97].

11.8. A SEQUÊNCIA FCA-ADENOMA-CARCINOMA

Em continuidade da evidência acumulada e apesar dos resultados não serem unânimes e até, por vezes, assumirem carácter contraditório, tem-se enraizado a convicção de que os FCA são o passo que antecede a conhecida e inequívoca sequência adenoma-carcinoma.

Dados histológicos, incluindo FCA com evidência de displasia e até mesmo de carcinoma, e, sobretudo, dados moleculares, nomeadamente a indução por carcinogêneos colo-rectais, a prevenção e/ou regressão determinada por agentes quimiopreventivos, a evidência de monoclonalidade e a existência de mutações reconhecidas como importantes na carcinogénese colo-rectal, atestam e suportam aos FCA um perfil adequado a precursor de neoplasias colo-rectais [6,13,57,98]. Não obstante, dada a prevalência e o número de FCA desproporcionalmente elevados em comparação com a frequência de adenomas e de CCR, apenas uma pequena percentagem dos FCA deterá a capacidade de progredir na sequência de cancerização [52]. Dito por outras palavras, apenas alguns, poucos, FCA se comportarão, efectivamente, como precursores neoplásicos. Contudo, um número elevado de FCA poderá reflectir a presença de um epitélio hiperproliferativo, propiciando não apenas o aparecimento de adenomas mas também, eventualmente, a sua mais frequente e mais rápida conversão em neoplasias avançadas [47]. De resto e reforçando esta hipótese, é reconhecida a existência de epitélio hiperproliferativo em doentes com CRC [99].

Dos parágrafos anteriores se depreende e entende que os FCA sejam, actualmente, referidos como precursores e/ou biomarcadores de neoplasias colo-rectais.

11.9. INFLUÊNCIA DE DIVERSOS FACTORES NA PREVALÊNCIA E NO NÚMERO DOS FCA

À medida que se foi sedimentando o papel dos FCA como potenciais precursores e/ou biomarcadores de CCR, suscitou-se, natural e inevitavelmente, o interesse em pesquisar a eventual relação da prevalência e do número dos FCA com diversos factores, sobretudo com aqueles que se sabe constituírem elementos de risco para CCR.

Embora a maioria dos estudos reporte prevalências e números de FCA crescentes de acordo com o aumento da idade, nem sempre essas diferenças assumiram magnitude suficiente para terem significância estatística [6,43,46,47,49,55].

Dois estudos publicados em 2005 revelaram a inexistência de associação significativa entre o número de FCA e a história familiar de CCR, mas as conclusões obtidas foram fragilizadas pela baixa incidência desse antecedente nos doentes incluídos [7,52]. Em 2007, Stevens e col. desenharam e concretizaram um estudo para responder especificamente a esta questão, analisando uma amostra que incluiu 43 indivíduos com história de CCR em familiar de primeiro grau e verificaram que esses doentes tinham um número médio de FCA significativamente superior aos dos que não tinham esse antecedente (9,0 vs. 4,4, $p < 0,01$) [53]. Não obstante, mais recentemente, dois estudos encorpados por casuísticas com magnitude semelhante não suportaram a mesma conclusão, ou seja, não detectaram associação significativa entre os antecedentes familiares de CCR e o número de FCA identificado [46,51].

Relativamente ao  ndice de massa corporal (IMC), dois estudos não detectaram qualquer rela o entre a obesidade e a frequência dos FCA, um detectou uma correla o positiva e significativa entre o número de FCA e o IMC e, por último, um outro trabalho reportou uma prevalência significativamente inferior de FCA nos doentes obesos, ou seja, com $IMC > 30$ [Odds ratio (OR) = 0,53; intervalo de confiança (IC) 95%: 0,35 - 0,80] [12,46,51,100]. Atendendo a que a obesidade   considerada um factor de risco para CCR, o resultado deste último estudo   algo surpreendente [46,101,102]. Na discussão do artigo, os autores apontaram para a possibilidade da obesidade aumentar o risco de CCR por uma via independente ou ulterior ao desenvolvimento dos FCA [46].

Vários trabalhos têm demonstrado a existência de rela o significativa entre a prevalência e/ou número de FCA e os hábitos tabágicos [46,51,52,103]. Um estudo multicêntrico envolvendo 505 doentes, verificou, em modelo de análise multivariada, que doentes com hábitos tabágicos activos (OR = 2,6; IC a 95% = 1,2 – 5,6) ou passados (OR = 1,6; IC a 95% = 1,1 – 2,5) tinham uma prevalência significativamente superior de FCA do que os doentes não fumadores, sendo os valores, respectivamente, 81%, 71% e 60% ($p = 0,004$) [46]. Outros três estudos verificaram que o número de FCA era significativamente superior em doentes com hábitos tabágicos, rela o que, aparentemente, tem subjacente um efeito de dose-resposta, uma vez que essa correla o positiva só se revelou estatisticamente significativa a partir de determinada carga tabágica, nomeadamente 15 unidades maço ano (UMA) num dos estudos e 20 UMA nos outros dois [51,52,103]. A associa o entre a frequência de FCA e os hábitos tabágicos s  não   consensual porque um trabalho, publicado em 2005 por Rudolph e col., revelou a ausência de rela o significativa entre os hábitos tabágicos activos e/ou passados com o número de FCA, não detectando, igualmente, qualquer correla o quando a carga tabágica era tida em linha de conta [7]. No entanto, importa salientar que, dado o tamanho reduzido da amostra estudada, os resultados desse trabalho devem ser interpretados com cautela [7].

Em estudos de modelo animal o AAS e os AINE´s demonstraram ter um efeito inibidor do desenvolvimento e da expansão de FCA [24,32]. Num estudo *ex vivo* envolvendo a avalia o de peças de colectomia de doentes operados por CCR, verificou-se que os doentes com história de consumo regular de AAS durante pelo menos um ano tinham um número de FCA significativamente inferior ao dos doentes que não tomavam esse fármaco [104]. No mesmo sentido, um pequeno estudo prospectivo demonstrou que em doentes submetidos   administra o de sulindac ocorria redu o do número de FCA [6]. Não obstante, vários estudos recentes, um deles multicêntrico, incluindo um número apreciável de doentes, não detectaram qualquer associa o entre a toma cr nica de AAS e/ou AINE´s e a frequência de FCA [7,46,52]. Acresce que um outro trabalho demonstrou, prospectivamente, que a administra o de celecoxib não exerce qualquer modula o significativa sobre os FCA [65].

Uma limita o transversal a quase todos os estudos que reportaram associa es entre a prevalência e/ou número de FCA e a existência de neoplasia colo-rectal   a de que várias características importantes, tais como hábitos tabágicos, história familiar de CCR, IMC e uso de AAS/AINE´s, não foram incluídas nos modelos

de análise [5,6,9,45]. Assim, não é possível excluir o potencial efeito confundente destes factores nessas associações e, mais importante, não se pode garantir que as conclusões obtidas nesses trabalhos sejam válidas e aplicáveis a todo o espectro de doentes, ou seja, independentemente dos factores de risco associados. Emerge, deste modo, a importância de testar essas associações em estudos que incluam uma ampla caracterização clínica, comportamental e epidemiológica dos doentes, preceito já presente, de forma parcial, no estudo que Sakai e col. conduziram em 2011 [48].

11.10. POTENCIAIS APLICAÇÕES DOS FCA

Os FCA, assumindo-se como potenciais precursores e/ou biomarcadores de neoplasias colo-rectais, avocam uma série de possíveis aplicações.

Uma das potenciais aplicações mais atractivas refere-se, indubitavelmente, à utilização dos FCA como lesão alvo em estudos de quimioprevenção [33,97,105]. Os pólipos são, actualmente, o marcador mais frequentemente usado e avaliado nesses estudos [105]. Contudo, a utilização dos pólipos, nesse contexto, arroga duas importantes limitações: dadas as suas dimensões é pouco provável que se consiga a sua regressão e, pelo mesmo motivo mas também pela sua frequência e história natural, a apreciação de efeitos quimiopreventivos sobre pólipos exige amostras de dimensões apreciáveis e, também, avaliação durante longos períodos de tempo [105]. Os FCA, pela sua maior prevalência e número, bem como pelas menores dimensões, assomam como um alvo mais apetecível, na medida em que permitem utilizar amostras menores, obter resultados mais mesuráveis num espaço de tempo mais curto e, ainda, avaliar a dose-resposta através da análise dos efeitos no número de FCA [13,97,105]. A título de exemplo, o antidiabético metformina foi identificado e reportado como detentor de efeito quimiopreventivo contra o CCR, tanto em roedores como em humanos, em estudos que utilizaram os FCA como marcadores de CCR [106,107].

Em termos clínicos, os FCA poderão, potencialmente, servir para estratificar o risco de neoplasia colo-rectal e, dessa forma, aprimorar o rastreio de CCR, não só em termos da definição da data de início e dos intervalos de rastreio, mas também, eventualmente, auxiliando na escolha dos métodos a utilizar [13,108]. Em acréscimo, os FCA poderão ser usados em estudos de identificação e mensuração de factores de risco para CCR, através da sua avaliação em doentes com e sem esses factores, apresentando, neste contexto, as mesmas vantagens que se mencionaram anteriormente no parágrafo referente aos estudos de quimioprevenção [33]. Por último, representando um evento precoce da transformação neoplásica, os FCA poderão ajudar a esclarecer, de forma complementar, os mecanismos de iniciação e progressão da carcinogénese colo-rectal.

11.11. PROBLEMAS E LIMITAÇÕES ASSOCIADOS AOS FCA

A avaliação e o significado dos FCA encerram algumas limitações, dificuldades e contradições, cujo esclarecimento é imperioso e absolutamente fundamental antes de poderem ser utilizados, de forma substanciada e axiomática, na prática clínica e/ou laboratorial.

A primeira perplexidade é levantada, desde logo, na associação dos FCA com o *status* de neoplasia, já que alguns estudos não detectaram diferenças significativas da prevalência e do número de FCA entre doentes com e sem neoplasias (adenomas e carcinomas) colo-rectais [46,47,109].

A segunda interrogação prende-se com a validade e interesse da identificação de FCA displásicos. Originalmente identificados como um nicho de FCA albergador de risco neoplásico particularmente intenso, alguns dados mais recentes, nomeadamente dificuldades relacionadas com a reprodutibilidade da sua identificação e o facto de serem extremamente raros ou inexistentes em estudos Norte Americanos, atearam cepticismo em volta dos seus reais significado e importância [5,6,9,46,109].

Os dados existentes sobre a história natural dos FCA constituem a terceira arrepsia. Embora a informação seja escassa e até, de certa forma, discordante, foi levantada a hipótese dos FCA ostentarem um elevado dinamismo, nomeadamente com aparecimento e regressão dum número significativo de lesões num período de apenas um ano [10,12,97].

A quarta e penúltima reserva diz respeito à sedutora utilização dos FCA como lesão alvo em estudos de quimioprevenção, cujo entusiasmo foi potenciado pelos resultados obtidos em estudos animais, mas que viu as expectativas frenadas por um estudo clínico que não identificou modulação significativa dos FCA pelo celecoxib [109,110].

A última e, por ventura, mais importante questão diz respeito à avaliação dos FCA. A identificação destas lesões por magnificação endoscópica acoplada a cromoscopia revelou considerável variabilidade entre observadores, limitação que não sofreu atenuação significativa com o treino na técnica [11,12]. Problemas da mesma natureza foram detectados no que concerne à avaliação histológica dos FCA [33,63]. Tanto na avaliação endoscópica como na análise histológica, as debilidades enunciadas poderiam ser minoradas se fossem estabelecidos critérios objectivos, reprodutíveis e, tanto quanto possível, consensuais para a identificação e caracterização dos FCA [33].

11.12. FCA NA COLITE ULCEROSA (CU): ALGUMA RELAÇÃO COM A SEQUÊNCIA DISPLASIA-CARCINOMA?

De forma algo surpreendente, existe apenas um trabalho publicado sobre os FCA e a sua potencial relação com a displasia na CU [111]. Nesse trabalho, que incluiu 28 doentes com CU, Kukitsu T e col. detectaram um aumento gradual e significativo do número de FCA desde os doentes sem displasia, passando

pelos com displasia e culminando nos que tinham carcinoma [111]. Especificando, o número médio de FCA foi de $8,7 \pm 4,5$ nos doentes com displasia/carcinoma e de $3,5 \pm 2,6$ nos doentes sem lesões neoplásicas ($p = 0,0112$) [111]. Apesar de haver apenas dois doentes que, além de displasia, tinham também carcinoma, salienta-se o facto desses doentes exibirem um número de FCA particularmente elevado (17 e 13 FCA, respectivamente) [111]. Através de análises univariada e multivariada os autores detectaram a existência de associação significativa entre o número de FCA e a presença de displasia, não definindo, contudo, um *cut-off* em termos do número de FCA a partir do qual o risco de displasia era significativamente mais elevado [111]. O trabalho em apreço incluiu, simultaneamente, uma avaliação molecular que também consubstanciou a existência de relação entre os FCA e a displasia [111]. De facto, o estudo reportou evidentes similitudes genéticas entre os FCA e a displasia, nomeadamente negatividade para as mutações dos genes *APC* e *K-ras* e positividade para a hipermetilação do gene *p16* [111].

Não obstante os resultados interessantes, este estudo encerra algumas limitações importantes que é preciso salientar: a amostra tinha dimensão reduzida; o *status* de displasia era conhecido antes da inclusão no trabalho; o rastreio de displasia não foi efectuado com cromoendoscopia; o diagnóstico de colangite esclerosante primária, a história prévia de displasia e a história familiar de CCR não foram reportados nem incluídos na análise do estudo, pelo que não é possível garantir que a associação detectada entre os FCA e a displasia seja independente desses importantes factores de risco para CCR na CU; por último, a potencial influência da idade do doente, dos hábitos tabágicos, da história familiar de CCR e do IMC no número de FCA não foi avaliada, sendo sabido que esses factores podem ter uma interferência significativa na frequência dessas lesões endoscópicas [6,47,51-53,111,112]. Assim, o valor preditivo dos FCA relativamente à presença síncrona de neoplasia na CU não se encontra cabalmente clarificado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fujimitsu Y, Nakanishi H, Inada K, et al. Development of aberrant crypt foci involves a fission mechanism as revealed by isolation of aberrant crypts. *Jpn J Cancer Res.* 1996;87:1199-1203.
2. Renehan AG, O'Dwyer ST, Haboubi NJ, et al. Early cellular events in colorectal carcinogenesis. *Colorectal Dis.* 2002;4:76-89.
3. Potten CS, Kellett M, Roberts SA, et al. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut.* 1992;33:71-78.
4. Chang WWL: Histogenesis of colon cancer in experimental animals. *Scand J Gastroenterol.* 1984;19:27-43.
5. Hurlstone DP, Karajeh M, Sanders DS, et al. Rectal aberrant crypt foci identified using high-magnification-chromoscopic colonoscopy: biomarkers for flat and depressed neoplasia. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:1283-1289.
6. Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, et al. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med.* 1998;339:1277-1284.
7. Rudolph RE, Dominitz JA, Lampe JW, et al. Risk factors for colorectal cancer in relation to number and size of aberrant crypt foci in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:605-608.
8. Yokota T, Sugano K, Kondo H, et al. Detection of aberrant crypt foci by magnifying colonoscopy. *Gastrointest Endosc.* 1997;46:61-65.
9. Adler DG, Gostout CJ, Sorbi D, et al. Endoscopic identification and quantification of aberrant crypt foci in the human colon. *Gastrointest Endosc.* 2002;56:657-662.
10. Schoen RE, Mutch M, Rall C, et al. The natural history of aberrant crypt foci. *Gastrointest Endosc.* 2008;67:1097-1102.
11. Gupta AK, Pinsky P, Rall C, et al. Reliability and accuracy of the endoscopic appearance in the identification of aberrant crypt foci. *Gastrointest Endosc.* 2009;70:322-330.
12. Pinsky PF, Fleshman J, Mutch M, et al. One year recurrence of aberrant crypt foci. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010;3:839-843.
13. Lopez-Ceron M, Pellise M. Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. *Colorectal Dis.* 2012;14:e157-164.
14. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett.* 1987; 37:147-151.
15. McLellan EA, Bird RP. Specificity study to evaluate induction of aberrant crypts in murine colons. *Cancer Res.* 1988;48:6183-6186.
16. McLellan EA, Bird RP. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res.* 1988;48:6187-6192.
17. McLellan EA, Medline A, Bird RP. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon. *Carcinogenesis.* 1991;12:2093-2098.

18. McLellan EA, Medline A, Bird RP. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Res.* 1991;51:5270–5274.
19. Alabaster O, Tang Z, Shivapurkar N: Dietary fiber and the chemopreventive modulation of colon carcinogenesis. *Mutat Res.* 1996;350:185–197.
20. Katsuki S, Oui M, Takayama T, et al.: Aberrant crypt foci as biomarkers in chemoprevention for colorectal cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 1998;99:379–384.
21. Shpitz B, Bomstein Y, Kariv N, et al.: Chemopreventive effect of aspirin on growth of aberrant crypt foci in rats. *Int J Colorectal Dis.* 1998;13:169–172.
22. Corpet DE, Tache S. Most effective colon cancer chemopreventive agents in rats: a systematic review of aberrant crypt foci and tumor data, ranked by potency. *Nutr Cancer.* 2002;43:1–21.
23. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, et al. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 1998;58:409–412.
24. Mereto E, Frenchia L, Ghia M. Effects of aspirin on incidence and growth of aberrant crypt foci induced in the rat colon by 1,2- dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* 1994;76:5–9.
25. McLellan E, Bird RP. Effect of disulfiram on 1,2-dimethylhydrazine- and azoxymethane-induced aberrant crypt foci. *Carcinogenesis.* 1991;12:969–972.
26. Johnson IT: New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mutat Res.* 2004;551:559–28.
27. Johnson IT: Phytochemicals and cancer. *Proc Nutr Soc.* 2007; 66:207–215.
28. Lam LK, Zhang J. Reduction of aberrant crypt formation in the colon of CF1 mice by potential chemopreventive agents. *Carcinogenesis.* 1991;12:2311–2315.
29. Wargovich MJ, Harris C, Chen CD, et al. Growth kinetics and chemoprevention of aberrant crypts in the rat colon. *J Cell Biochem.* 1992;16G:51–54.
30. Wargovich MJ, Chen CD, Jimenez A, et al. Aberrant crypts as a biomarker for colon cancer: evaluation of potential chemopreventive agents in the rat. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996; 5:355–360.
31. Li H, Kramer PM, Lubet RA, et al. Effect of calcium on azoxymethane- induced aberrant crypt foci and cell proliferation in the colon of rats. *Cancer Lett.* 1998;124:39–46.
32. Wargovich MJ, Jimenez A, McKee K, et al. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression. *Carcinogenesis.* 2000;21:1149 – 1155.
33. Gupta AK, Pretlow TP, Schoen RE. Aberrant crypt foci: what we know and what we need to know. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:526-533.
34. Yamashita N, Minamoto T, Onda M, et al. Increased cell proliferation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci of rat colon. *Jpn J Cancer Res.* 1994;85:692-698.
35. Pretlow TP, Cheyer C, O’Riordan MA. Aberrant crypt foci and colon tumors in F344 rats have similar increases in proliferative activity. *Int J Cancer.* 1994;56:599-602.

36. Corpet DE, Taché S, Peiffer G. Colon tumor promotion: is it a selective process? Effects of cholate, phytate, and food restriction in rats on proliferation and apoptosis in normal and aberrant crypts. *Cancer Lett.* 1997;114:135-138.
37. Magnuson BA, Shirliff N, Bird RP. Resistance of aberrant crypt foci to apoptosis induced by azoxymethane in rats chronically fed cholic acid. *Carcinogenesis.* 1994;15:1459-462.
38. Shpitz B, Hay K, Medline A, et al. Natural history of aberrant crypt foci. A surgical approach. *Dis Colon Rectum.* 1996;39:763-767.
39. Magnuson BA, Carr I, Bird RP. Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res.* 1993;53:4499-4504.
40. Pretlow TP, O'Riordan MA, Somich GA, et al. Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis.* 1992;13:1509-1512.
41. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res.* 1991;51:1564-1567.
42. Roncucci L, Stamp D, Medline A, et al. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol.* 1991;22:287-294.
43. Shpitz B, Bomstein Y, Mekori Y, et al. Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics. *Hum Pathol.* 1998;29:469-475.
44. Bouzourene H, Chaubert P, Seelentag W, et al. Aberrant crypt foci in patients with neoplastic and nonneoplastic colonic disease. *Hum Pathol.* 1999;30:66-71.
45. Seike K, Koda K, Oda K, et al. Assessment of rectal aberrant crypt foci by standard chromoscopy and its predictive value for colonic advanced neoplasms. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:1362-1369.
46. Mutch MG, Schoen RE, Fleshman JW, et al. A multicenter study of prevalence and risk factors for aberrant crypt foci. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009;7:568-574.
47. Kim J, Ng J, Arozullah A, et al. Aberrant crypt focus size predicts distal polyp histopathology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:1155-1162.
48. Sakai E, Takahashi H, Kato S, et al. Investigation of the prevalence and number of aberrant crypt foci associated with human colorectal neoplasm. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20:1918-1924.
49. Figueiredo P, Donato M, Urbano M, et al. Aberrant crypt foci: endoscopic assessment and cell kinetics characterization. *Int J Colorectal Dis.* 2009;24:441-450.
50. Uchiyama T, Takahashi H, Endo H, et al. Number of aberrant crypt foci in the rectum is a useful surrogate marker of colorectal adenoma recurrence. *Dig Endosc.* 2012;24:353-357.
51. Anderson JC, Swede H, Rustagi T, et al. Aberrant crypt foci as predictors of colorectal neoplasia on repeat colonoscopy. *Cancer Causes Control.* 2012;23:355-361.
52. Moxon D, Raza M, Kenney R, et al. Relationship of aging and tobacco use with the development of aberrant crypt foci in a predominantly African-American population. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:271-278

53. Stevens RG, Swede H, Heinen CD, et al. Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2007;248:262-268.
54. Nucci MR, Robinson CR, Longo P, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol.* 1997;28:1396-1407.
55. Roncucci L, Modica S, Pedroni M, et al. Aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1998;77:2343-2348.
56. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* 2001;121:599-611.
57. Alrawi SJ, Schiff M, Carroll RE, et al. Aberrant crypt foci. *Anticancer Res.* 2006;26:107-119.
58. Roncucci L, Stamp D, Medline A, et al. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol.* 1991;22:287-294.
59. Kristt D, Bryan K, Gal R. Colonic aberrant crypts may originate from impaired fissioning: relevance to increased risk of neoplasia. *Hum Pathol.* 1999;30:1449-1458.
60. Hamilton SR, Aaltonen LA. (Eds.) *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system 2000*, IARC Press, Lyon.
61. Paulsen JE, Namork E, Steffensen IL, et al. Identification and quantification of aberrant crypt foci in the colon of Min mice--a murine model of familial adenomatous polyposis. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:534-539.
62. Pretlow TP, Pretlow TG. Mutant KRAS in aberrant crypt foci (ACF): initiation of colorectal cancer? *Biochim Biophys Acta.* 2005;1756:83-96.
63. Siu IM, Pretlow TG, Amini SB, et al. Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *Am J Pathol.* 1997;150:1805-1813.
64. Otori K, Sugiyama K, Hasebe T, et al. Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res.* 1995;55:4743-4746.
65. Cho NL, Redston M, Zauber AG, et al. Aberrant crypt foci in the adenoma prevention with celecoxib trial. *Cancer Prev Res (Phila).* 2008;1:21-31.
66. Rasheed S, Rigas B. Screening for colorectal cancer: does it all start with aberrant crypt foci? *Gastrointest Endosc.* 2008;67:1103-1105.
67. Mascolo M, Staibano S, Ilardi G, et al. Probe-based confocal laser endomicroscopy evaluation of colon preneoplastic lesions, with particular attention to the aberrant crypt foci, and comparative assessment with histological features obtained by conventional endoscopy. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:645173.
68. Suehiro Y, Hinoda Y. Genetic and epigenetic changes in aberrant crypt foci and serrated polyps. *Cancer Sci.* 2008;99:1071-1076.
69. Siu IM, Robinson DR, Schwartz S, et al. The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. *Cancer Res.* 1999;59:63-66.

70. Beach R, Chan AO, Wu TT, et al. BRAF mutations in aberrant crypt foci and hyperplastic polyposis. *Am J Pathol.* 2005;166:1069-1075.
71. Rosenberg DW, Yang S, Pleau DC, et al. Mutations in BRAF and KRAS differentially distinguish serrated versus non-serrated hyperplastic aberrant crypt foci in humans. *Cancer Res.* 2007;67:3551-3554.
72. Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, et al. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol.* 2002;160:1823-1830.
73. Di Gregorio C, Losi L, Fante R, et al. Histology of aberrant crypt foci in the human colon. *Histopathology.* 1997;30:328-334. Erratum in: *Histopathology.* 1997;31:491.
74. O'Brien MJ, Yang S, Clebanoff JL, et al. Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:423-434.
75. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, et al. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:1491-1501.
76. Ichii S, Takeda S, Horii A, et al. Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis (FAP). *Oncogene.* 1993;8:2399-2405.
77. Miyaki M, Seki M, Okamoto M, et al. Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 1990;50:7166-7173.
78. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319:525-532.
79. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* 1992;359:235-237.
80. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, et al. Aberrant crypt foci: detection, gene abnormalities, and clinical usefulness. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:S42-45.
81. Losi L, Roncucci L, di Gregorio C, et al. K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol.* 1996;178:259-263.
82. Shivapurkar N, Huang L, Ruggeri B, et al. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett.* 1997;115:39-46.
83. Mi B, Wang X, Bai Y, et al. Beta-catenin expression is altered in dysplastic and nondysplastic aberrant crypt foci of human colon. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009;17:294-300.
84. Hao XP, Pretlow TG, Rao JS, et al. Beta-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res.* 2001;61:8085-8088.
85. Pedroni M, Sala E, Scarselli A, et al. Microsatellite instability and mismatch-repair protein expression in hereditary and sporadic colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001;61:896-899.
86. Heinen CD, Shivapurkar N, Tang Z, et al. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res.* 1996;56:5339-5341.

- 87.** Greenspan EJ, Cyr JL, Pleau DC, et al. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from patients without concurrent colon cancer. *Carcinogenesis*. 2007;28:769–776.
- 88.** Luo L, Chen WD, Pretlow TP. CpG island methylation in aberrant crypt foci and cancers from the same patients. *Int J Cancer*. 2005;115:747-751.
- 89.** Li H, Myeroff L, Smiraglia D, et al. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8412-8417.
- 90.** Greenspan EJ, Jablonski MA, Rajan TV, et al. Epigenetic alterations in RASSF1A in human aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*. 2006;27:1316-1322.
- 91.** Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8681-8686.
- 92.** Shpitz B, Bomstein Y, Mekori Y, et al. Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci, hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon. *Am J Surg*. 1997;174:425-430.
- 93.** Hao X, Du M, Bishop AE, et al. Imbalance between proliferation and apoptosis in the development of colorectal carcinoma. *Virchows Arch*. 1998;433:523-527.
- 94.** Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, et al. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993;328:901-906.
- 95.** Pinsky PF, Schoen RE, Weissfeld JL, et al. The yield of surveillance colonoscopy by adenoma history and time to examination. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7:86-92.
- 96.** Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, et al. New occurrence and recurrence of neoplasms within 5 years of a screening colonoscopy. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:1524-1529.
- 97.** Ohkubo H, Takahashi H, Yamada E, et al. Natural history of human aberrant crypt foci and correlation with risk factors for colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2012;27:1475-1480.
- 98.** Konstantakos AK, Siu IM, Pretlow TG, et al. Human aberrant crypt foci with carcinoma in situ from a patient with sporadic colon cancer. *Gastroenterology*. 1996;111:772-777.
- 99.** Risio M, Lipkin M, Candelaresi G, et al. Correlations between rectal mucosa cell proliferation and the clinical and pathological features of nonfamilial neoplasia of the large intestine. *Cancer Res*. 1991;51:1917-1921.
- 100.** Swede H, Rohan TE, Yu H, et al. Number of aberrant crypt foci associated with adiposity and IGF1 bioavailability. *Cancer Causes Control*. 2009;20:653-661.
- 101.** Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol*. 2007;13:4199-4206.
- 102.** Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, et al. Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:920-931.

-
- 103.** Anderson JC, Pleau DC, Rajan TV, et al. Increased frequency of serrated aberrant crypt foci among smokers. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1648-1654.
- 104.** Shpitz B, Klein E, Buklan G, et al. Suppressive effect of aspirin on aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *Gut*. 2003; 52:1598–1601.
- 105.** Stevens RG, Swede H, Rosenberg DW. Epidemiology of colonic aberrant crypt foci: review and analysis of existing studies. *Cancer Lett*. 2007;252:171-183.
- 106.** Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al. Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3:1077-1083.
- 107.** Hosono K, Endo H, Takahashi H, et al. Metformin suppresses azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci by activating AMP-activated protein kinase. *Mol Carcinog*. 2010;49:662-671.
- 108.** Adler DG. Aberrant crypt foci as biomarkers for colonic dysplasia. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2005;2:390-391.
- 109.** Cho NL, Redston M, Zauber AG, et al. Aberrant crypt foci in the adenoma prevention with celecoxib trial. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008;1:21-31.
- 110.** Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. Aberrant crypt foci: A review. *Toxicol Pathol*. 1999;27:632-642.
- 111.** Kukitsu T, Takayama T, Miyanishi K, et al. Aberrant crypt foci as precursors of the dysplasia-carcinoma sequence in patients with ulcerative colitis. *Clin Cancer Res*. 2008;14:48-54.
- 112.** Takahashi H, Takayama T, Yoneda K, et al. Association of visceral fat accumulation and plasma adiponectin with rectal dysplastic aberrant crypt foci in a clinical population. *Cancer Sci*. 2009;100:29-32.

SECÇÃO 2

CONTRIBUTO PESSOAL

CAPÍTULO 12.

*Aceite para publicação no
Scandinavian Journal of Gastroenterology*

TITLE

**Predictive Value of Rectal Aberrant Crypt Foci for Intraepithelial Neoplasia in Ulcerative
Colitis – A Cross-Sectional Study**

SHORT RUNNING TITLE

Value of Aberrant Crypt Foci in Ulcerative Colitis

AUTHORS

Paulo Freire¹, Pedro Figueiredo^{1,2}, Ricardo Cardoso¹, Maria Manuel Donato², Manuela Ferreira¹, Sofia Mendes¹, Mário Rui Silva³, Maria Augusta Cipriano³, Ana Margarida Ferreira¹, Helena Vasconcelos⁴,
Francisco Portela¹, Carlos Sofia^{1,2}.

1- Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

2 - Center of Gastroenterology, Faculty of Medicine, University of Coimbra

3 - Department of Pathology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

4 - Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar Leiria-Pombal

Portugal

Paulo Freire (Corresponding author)

Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

Telephone: +351239400483

Fax: +351239701517

e-mail address: pauloavfreire@gmail.com

Pedro Figueiredo

Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

pnf11@sapo.pt

Ricardo Cardoso

Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

racardoso@gmail.com

Maria Manuel Donato

Center of Gastroenterology, Faculty of Medicine, University of Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

mariamaueldonato@gmail.com

Manuela Ferreira

Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

malvesferreira@netcabo.pt

Sofia Mendes

Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

msofiamendes@iol.pt

Mário Rui Silva

Department of Pathology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

mtdsil@gmail.com

Maria Augusta Cipriano

Department of Pathology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

augustacipriano@gmail.com

Ana Margarida Ferreira

Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

magaidaferreira@gmail.com

Helena Vasconcelos

Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar Leiria-Pombal

Rua das Olhalvas

2410-197 Leiria - Portugal

hml.vasconcelos@gmail.com

Francisco Portela

Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

fasportela@gmail.com

Carlos Sofia

Department of Gastroenterology, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Praceta Prof. Mota Pinto

3000-075 Coimbra (Portugal)

carlossofia@huc.min-saude.pt

ABSTRACT

Background: Ulcerative colitis (UC) is associated with an increased risk of colorectal cancer (CRC). Aberrant crypt foci (ACF) are important biomarkers of sporadic CRC risk. Their correlation with the risk of intraepithelial neoplasia (IN) in UC remains unclear.

Aims: To assess whether ACF are a risk factor for IN in longstanding UC and to investigate any correlation between the clinico-epidemiological characteristics and prevalence/number of ACF in these patients.

Methods: Seventy-six patients with longstanding UC were prospectively screened by colonoscopy with chromoendoscopy-guided endomicroscopy. ACF were sought in the lower rectum.

Results: Eight INs were detected in 7 (9.2%) patients. The ACF prevalence and mean number were 60.5% and 2.4 ± 2.8 , respectively. The number of ACF was independently associated with the risk of having IN (OR=1.338; 95% CI 1.030-1.738). ACF number revealed a good calibration (area under the ROC curve=0.829) and discriminative ability ($p=0.205$, Lemeshow-Hosmer test) for the prediction of synchronous IN. Patients with ≥ 3 ACF have a significantly higher prevalence of IN than patients with < 3 ACF (22.6% vs 0%, $p=0.001$). Using this cut-off value, the performance of ACF in predicting the presence of IN was as follows: sensitivity=100%, specificity=65.2%, positive predictive value=22.6% and negative predictive value=100%. Age >40 years, family history of CRC and increased body mass index (BMI) were associated with a significantly higher number of ACF.

Conclusions: Longstanding UC patients with ≥ 3 ACF have a significantly higher likelihood of having IN. Age >40 years, family history of CRC and increased BMI have significant positive associations with the number of ACF.

Key words: Aberrant crypt foci; Ulcerative colitis; Intraepithelial neoplasia; Chromoendoscopy; Surveillance.

INTRODUCTION

Patients with longstanding distal/extensive ulcerative colitis (UC) are at an increased risk of developing colorectal cancer (CRC) (1,2). Although several medical societies have endorsed endoscopic surveillance recommendations for these patients, the existing strategies are still far from perfect (3-6).

The current surveillance programs call for repeated colonoscopies with multiple biopsies. Beyond the laborious and time-consuming nature of this approach, doubts remain regarding its efficacy and cost-effectiveness (4-8). Furthermore, the risk of CRC is not the same for all patients. The extent and duration of colonic disease, the diagnosis of primary sclerosing cholangitis (PSC) and a personal history of intraepithelial neoplasia (IN) have all been confirmed as risk factors in several different studies (7-10). Therefore, endoscopic screening is generally recommended for patients with longstanding (≥ 8 years) distal or extensive UC, and PSC and a previous diagnosis of IN are considered high-risk factors that justify shortened surveillance intervals (3-6,8,11,12). Other factors, such as a family history of CRC, younger age at diagnosis, severity of inflammation and the presence of pseudopolyps, have also been associated with an increased risk of UC-CRC, but on a smaller scale or without universal confirmation (7-9,12). Thus, although some medical societies use these factors in patient risk stratification and the definition of surveillance intervals, there is no consensus about these recommendations (3-6,11). Hence, there is a clinical need for additional biomarkers to improve UC-CRC risk stratification.

Aberrant crypt foci (ACF), which are clusters of colorectal crypts with abnormal morphology, have emerged as potential precursors and/or biomarkers of sporadic colorectal adenomas or carcinomas. Indeed, several epidemiologic studies, including one from our group, have revealed significant associations between the prevalence and/or number of ACF and the synchronous presence of sporadic neoplasms, including both adenoma and CRC, either with a exophytic or a flat appearance

(13-17). In addition, biochemical, genetic and morphological studies have shown similar changes in sporadic neoplasias and ACF, further supporting their connection (18-26).

The biological differences between UC-associated and sporadic CRC are widely recognised. In colitis-related CRC, for example, the development of multiple synchronous malignancies is more common (7,27). Moreover, adenomatous polyps do not always precede the appearance of a malignant neoplasm, as in sporadic cases (7,27). Furthermore, carcinogenesis in the inflamed colon appears to follow a different sequence of genetic alterations than that observed in sporadic cancers of the uninflamed colon (28). Moreover, sporadic and UC-related ACF have different genetic profiles (23-26). Therefore, the findings of the studies on the correlations between ACF and sporadic colorectal neoplasias cannot be applied to UC-related INs.

To our knowledge, there is only one published paper regarding the evaluation of ACF and their correlation with IN in UC (29). In this study, which included 28 UC patients, Kukitsu T *et al* found a stepwise increase in the number of rectal ACF in patients with UC alone, dysplasia and carcinoma (29). Nevertheless, in addition to its small sample size, this study had other important limitations: the IN-status was known previously to the study entry; colon screening was not performed by chromoendoscopy; diagnosis of PSC, personal history of IN and family history of CRC were not reported and, therefore, it's not possible to ensure that the detected association between IN and ACF is independent of other important UC-CRC risk factors; finally, the potential influences of patient age, smoking history, family history of CRC and body mass index on ACF number were not investigated, and it's known that these factors might have a significant association with the frequency of these endoscopic lesions (14,29-35). As a result, the predictive value of ACF for the synchronous presence of IN in UC has not yet been well clarified.

In light of these data, we aimed to investigate the potential relationship between the prevalence and number of ACF and the likelihood of IN in patients with longstanding UC. In addition, we aimed to evaluate whether any correlations exist among the various potential risk factors and the prevalence and number of ACF in these patients.

METHODS

Study population

In this cross-sectional study, patients with clinically inactive longstanding UC were recruited from the outpatient clinic of two Gastroenterology Departments - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra and Centro Hospitalar Leiria-Pombal (Portugal), between April 2011 and December 2013.

The inclusion criteria consisted of patients over 18 years old with a confirmed diagnosis of longstanding (≥ 8 years) left side or extensive UC that is clinically inactive (36-38). The exclusion criteria were as follows: unwillingness to consent to the protocol, personal history of IN or CRC, diagnosis of PSC, known allergy to methylene blue or fluorescein, pregnant or nursing women, coagulopathy (prothrombin time $< 50\%$ of control, partial thromboplastin time > 50 s), impaired renal function (creatinine level > 1.2 mg/dL) and the chronic use of aspirin and/or nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

All patients received a standard bowel preparation (4 L polyethylene glycol). All colonoscopies were performed by a single experienced endoscopist (P. Freire) using Pentax EC-3870CIFK under propofol-induced sedation or conscious sedation with intravenous midazolam if required.

Detailed phenotypic characteristics, including demographic data and clinical parameters, were obtained using a standardised questionnaire filled out by reviewing the medical charts and taking a patient interview at the time of enrolment. Phenotypic characteristics were classified according to the recently published second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of UC (4,39,40). Disease extent was defined as the furthest extent of inflammation, either microscopically or macroscopically (41). Family history of CRC was defined as having at least one first-degree relative with the disease. Smoking history was classified into three groups, current smoker, former smoker and never smoker, according to the definition stated by the Centers for Disease Control and Prevention (42).

This study was approved by the local Ethics Committee (HUC-29-09), and written informed consent was obtained from all participants prior to enrolment into the study, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Surveillance colonoscopy

After the colonoscope was advanced to the cecum, the staining of the entire colon was performed using methylene blue 0.1% delivered through a radial dye spray catheter (Endo-Flex 47226-G) following the SURFACE guidelines (43). Excess dye was removed by suction, and staining was considered adequate when the tiny glandular duct openings of the mucosa (pits) were clearly visible. The mucosa was then scrutinised, and any abnormalities were evaluated by endomicroscopy before being biopsied or removed, as clinically indicated. The lesions were classified morphologically according to the Paris classification (PC) (44). Five millilitres of 10% sodium fluorescein were injected intravenously as a contrasting agent before confocal laser endomicroscopy image acquisition. The circumscribed lesions were graded for the presence of IN according to Mainz-Kiesslich endoscopic confocal pattern classification (45).

Detection and count of ACF

After the entire colorectum was observed, the lower rectum (from the middle Houston valve to the dentate line) was washed with tap water and then re-stained with 0.1% methylene blue using the same radial spray catheter. Following a waiting period of at least 2 min for vital dye–epithelial cell interaction, a high volume water wash was applied, and the excess dye was aspirated. The stained mucosa was then meticulously examined in a clockwise fashion while the colonoscope was slowly withdrawn, and the ACF were counted. To ensure that the ACF were not double counted or missed, they were counted in a sequential method during a single withdrawal of the endoscope. The choice to assess only rectal ACF, in accordance with other endoscopic trials, was based on the results of a previous study showing that the number of ACF in the lower rectum correlated with that in the entire

colorectum (14-16, 30, 32, 46). This decision also avoids laborious and lengthy procedures, considering the future application of ACF as a surveillance marker.

ACF were defined as lesions with crypts more darkly stained than normal crypts and with larger diameters, shape polymorphisms or a slightly (< 2 mm) raised appearance (47-53). Any lesions that were raised more than 2 mm above the surrounding mucosa, before or after staining with methylene blue, were classified as polyps and not as ACF.

Before the beginning of this study, the endoscopist received specific training in identifying and accounting for ACF from another endoscopist at the same centre (P. Figueiredo) who had significant experience and publications in this field (13).

Pathology

Biopsy samples were processed and stained using standard methods and were subsequently evaluated by one of two experienced gastrointestinal histopathologists (M.R.S. and M.A.C.) who were blinded to the endoscopic findings. No differentiation was made between adenomas and dysplasia-associated lesions in this study, with the term IN being used according to the Vienna classification (54). Any specimens exhibiting IN were reviewed by the other pathologist, and in the event of interobserver disagreement, a consensus was reached.

Statistical analysis

Continuous variables are summarised using means and standard deviations, and categorical variables are expressed as frequencies and percentages. Standard tests were used to compare means and proportions, including the Student's t test or Wilcoxon rank-sum test for continuous variables and the Mann-Whitney U Test, Chi-Square or Fisher's Exact Test for categorical variables, as appropriate.

To identify the independent risk factors for IN, multivariate analysis was performed using logistic regression models including the following variables: ACF, gender, current age, age at disease diagnosis, disease duration and extent, presence of pseudopolyps, oral 5-ASA maintenance therapy, smoking status and family history of CRC. To discern the effect of ACF prevalence and ACF number on the risk of IN, these two variables were assessed together with the other mentioned variables in two distinct models: Model 1, including the prevalence of ACF and not the ACF number; and Model 2, including the ACF number and not the ACF prevalence. These analyses were used to estimate odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) for having IN.

The predictive performance of the number of ACF for the synchronous presence of IN was assessed by measuring the calibration and discriminative ability. Calibration measures the degree of correspondence between the predicted and observed outcome over the entire range of risks, whereas discrimination gauges a model's ability to differentiate between patients with and without IN. Calibration was described by goodness-of-fit testing using the Hosmer-Lemeshow test and considering p values ≥ 0.1 as well calibrated (55). Discrimination was evaluated using the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve, for which values above 0.8 were considered good (clinically useful) (56).

The Youden index (sensitivity + specificity -1) was used to select the best cut-off point at which the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for IN were calculated (57).

Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were calculated from 2x2 tables according to standard formulas.

The data were analysed using the IBM SPSS Statistics (IBM Co., Armonk, NY, USA) computer software for Windows (version 20.0).

RESULTS

A total of 84 patients (male/female: 35/49; mean age at diagnosis of UC 33.3 ± 11.6 years old) were prospectively enrolled in the study. Eight patients had to be excluded from further analysis because of poor bowel preparation (defined as greater than 10% of mucosal surface obscured; $n = 5$) or endoscopic activity ($n = 3$), and 76 patients completed the study protocol.

The cecum was reached in all examined patients. A total of 8 intraepithelial neoplastic lesions were identified in 7 patients (9.2%). All lesions were low-grade INs. No high-grade INs or carcinomas were found in any of the patients evaluated in this study. Out of the 8 intraepithelial neoplastic lesions detected, 5 were found in exophytic (PC type I) lesions, and 3 were associated with flat mucosal changes (PC type II). Fig. 1 illustrates a detected flat lesion assessed by both endomicroscopy and histology, that agreed on the diagnosis of IN.

A total of 185 (0-12) rectal ACF were identified in 46 patients (60.5%), with a per-patient mean number of 2.4 ± 2.8 . Rectal chromoendoscopy and ACF quantification prolonged the procedure by a median of 6.5 min (range: 5–10 min). Fig. 2 shows the endoscopic appearance of a detected rectal ACF and an endoscopic view of the rectum of a patient without ACF.

The prevalence and number of ACF in the patients with IN were significantly higher than those in patients without IN (Table I). However, as shown in Table I, in a multivariate logistic regression analysis performed for identifying independent risk factors for IN, only the ACF number (OR = 1.338; 95% CI 1.030-1.738) and disease duration revealed a significant association with this outcome.

To differentiate between patients with and without IN, the area under the ROC curve for the number of ACF was 0.829 (Fig. 3). Regarding calibration, goodness-of-fit, as measured by the Lemeshow-Hosmer test, had a $p = 0.205$. By ROC analysis, namely, by the estimation of the best Youden index, we found that ≥ 3 ACF was the most appropriate cut-off value for predicting the likelihood of having IN. Using this cut-off, the ACF predictive value for the synchronous presence of

IN revealed the following: sensitivity = 100%, specificity = 65.2%, positive predictive value = 22.6% and negative predictive value = 100% (Table II). The IN rates above and below the obtained cut-off are detailed in Table II.

Finally, we analysed the relationship between the prevalence and number of ACF and various potential risk factors, including gender, current age, age at disease diagnosis, disease duration and extent, presence of pseudopolyps, 5-ASA maintenance therapy, smoking status and family history of CRC (Table III). We found that the number of rectal ACF was significantly greater in patients aged over 40 years and in those with an increased body mass index. Additionally, patients with a family history of CRC had a significantly higher prevalence and number of ACF (Table III). Although not statistically significant, we found a positive trend between increasing body mass index and the prevalence of ACF (Table III).

There were no procedure-related complications.

DISCUSSION

Patients affected by longstanding UC have an increased risk of developing CRC and are candidates for endoscopic surveillance (1,2,4-6). The recognised risk factors for IN in UC can be used to schedule surveillance programs, not only in terms of when they should be started but also at which intervals screening should be performed (3-6,11). Nevertheless, the current strategy has several drawbacks: there are interval cancers and even cancers diagnosed before the date recommended for the start of screening; it is still necessary to perform regular colonoscopies, including chromoendoscopy and/or multiple biopsies, resulting in a low adherence to recommended surveillance programs by patients and physicians; finally, the cost-effectiveness of these strategies has not been well established (8, 58-65). The weaknesses of these screening programs could be somewhat lessened if it were possible to refine UC-CRC risk stratification.

ACF are considered important biomarkers of sporadic CRC, but their utility in UC has not been fully clarified (13-17,29). In this study, we assessed the association between the prevalence and number of rectal ACF and the likelihood of detecting IN at surveillance colonoscopy for longstanding UC patients. We demonstrated a correlation between the number of rectal ACF and the presence of IN that strongly supports ACF as a potential biomarker of IN in longstanding UC.

In the 76 patients with longstanding UC who were included in our work and completed the study protocol, we found that 46 patients (60.5%) had at least 1 ACF and that the average number of ACF was 2.4 ± 2.8 . Kukitsu T *et al* identified ACF in 27 (96.4%) out of 28 UC patients, whereas the ACF prevalence in studies of non-UC patients ranged from 18% to 100%, with most studies reporting a prevalence from 75% to 100% (13-17,29,51,53). The mean number of ACF reported in most of these studies is also higher than that found in our work (13-17,29). This discrepancy from our results may be due to 2 factors: the technique used in the detection of ACF and the characteristics of the study population. In all except one of the previous studies, the rectal ACF were assessed with magnification chromoendoscopy; in our work, this examination was performed with standard chromoendoscopy

(non-magnification) (13-17,29). As expected, magnification chromoendoscopy allowed for the detection of greater numbers of ACF, particularly at the expense of small ACF, the clinical significance of which appears to be less than that of large ACF (66-69). In addition, magnification chromoendoscopy is time-consuming, carries an important inter-observer variability even under the best circumstances and training, and is not a widespread technology. Therefore, this approach is unattractive if we are looking for a practical, available and feasible screening method (46,70,71). On the other hand, because we carried out a cross-sectional study, the prevalence of IN and consequently of ACF in our study population was, as expected, lower than those reported in previous case-control studies (13-16,29). Indeed, both the prevalence and the number of ACF detected in our study compare well with the data reported in cohort studies (51,53).

As in the case-control study conducted by Kukitsu T *et al*, we found a close correlation between the number of rectal ACF and the occurrence of IN in patients with longstanding UC (29). Along with disease duration, the number of rectal ACF independently predicted the risk of IN. Moreover, the number of ACF showed good discrimination and calibration to differentiate between patients with and without IN. By ROC analysis, the number of 3 ACF was found as the most appropriate cut-off value for predicting the likelihood of having IN, showing a sensitivity and negative predictive value of 100%. To our knowledge, this is the first cross-sectional study to suggest that rectal ACF may serve as potential biomarkers of the likelihood of having IN in patients with distal/extensive longstanding UC. Our data are also the first to define a cut-off point of ACF number for the risk of IN in these patients.

As a secondary end-point, we analysed the relationship between the prevalence-number of ACF and factors commonly recognised as being associated with an increased risk of IN in UC, as well as the potential correlation with variables shown to be related to an increased frequency of ACF in previous studies of non-UC patients. To the best of our knowledge, this work constitutes the first attempt to detect this type of correlation in patients with UC. In line with the data from studies in patients without inflammatory bowel disease (IBD), we found that increased age (>40 years) was

associated with a significantly higher number of ACF and that patients with family history of CRC had a significantly higher prevalence and number of ACF (14,30,33,72). In addition, we detected that an increased body mass index was associated with a significantly higher number of ACF, with a statistical trend toward a significantly higher ACF prevalence. Still, we found no significant associations between the prevalence and/or number of ACF and smoking status. The data on the relation of these factors with the frequency of ACF in non-IBD patients are conflicting (30,35,46,72,73). Nevertheless, regarding smoking history, our results should be carefully interpreted because the analysed sample included only 4 current smokers. Some studies suggest that aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the number of ACF (14,74,75). To prevent this confounding factor, we excluded patients based on their chronic use of these medications.

Our results suggest that in longstanding UC, the number of rectal ACF is a useful predictor of the likelihood of having IN. Even more importantly, our data showed, by multivariate analysis, that this effect is independent from other factors that are recognised as being associated with increased risk of UC-IN. Thus, rectal ACF may serve as a reliable surrogate biomarker for proximal colonic IN in longstanding UC and could therefore be useful to better risk-stratify these patients. Furthermore, our results suggest a positive correlation between the number of ACF and increasing age, increasing body mass index and family history of CRC; thus, the predictive value of ACF should always be adjusted to these factors. Nevertheless, our results need to be validated by other larger, preferably multicentric, studies before a new strategy based on these findings is adopted.

This study has some limitations. First, the size of the study population and the number of patients with a final diagnosis of IN were quite small, and all of the INs detected were low-grade. This is an important issue if we intend to establish ACF as a useful criterion for the endoscopic surveillance of these patients. Hence, our findings should be confirmed in a larger set of patients. Second, as in other studies, no pathological confirmation of ACF nor endoscopic distinction among the different ACF types (dysplastic, hyperplastic, mixed hyperplastic/dysplastic, nondysplastic and nonhyperplastic) was undertaken in this study (15,16,30,31). We made this decision to not further

extend the endoscopic procedures and because several studies have revealed a great variability in the characterisation of the different ACF types according to endoscopy and histology, the evaluations of which differ markedly (14,17,18,48,53,54,76-78). On the other hand, this distinction is most likely less important than previously considered, as recent studies have suggested that not only dysplastic but also hyperplastic ACF have malignant potential (79). In addition, it has been reported that dysplasia is usually a focal change and sometimes coexists with hyperplasia in the same ACF, suggesting that these changes are not mutually exclusive and that dysplastic ACF could arise from hyperplastic ACF (78,80). Third, we acknowledge that performing a rectal ACF evaluation at the end of a colonoscopy (*i.e.*, on withdrawal) is a potential source of bias because the proximal colon had already been examined. Nevertheless, it should be noted that the histological diagnosis of the detected lesions was only known later. Finally, even though this is a hospital-based study, it is important to state that, given our country's health policy, the majority of IBD patients are followed in the hospital setting. Therefore, our results may not be applicable to institutions with different patient populations.

In summary, the number of ACF in the rectum, especially ≥ 3 ACF, is a strong independent risk factor for the presence of IN in longstanding UC. Thus, the detection and count of rectal ACF in longstanding UC patients might be a useful biomarker for proximal colonic IN. Additionally, our results indicate that increasing age (namely > 40 years), increasing body mass index and family history of CRC are associated with an increased number of ACF in these patients, stressing the importance of the assessment of ACF's predictive value in models adjusted or controlled for these factors, as we did in this study. Further evaluation of ACF as a surveillance biomarker in large-scale studies is warranted before reliable clinical application can be assured. Such studies might improve the effectiveness and adherence to UC surveillance programs and determine a more efficient use and allocation of resources in the CRC screening of UC patients.

CONFLICTS OF INTEREST/ DISCLOSURE

The authors have no potential conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge all of our colleagues who referred patients, the anaesthesiologists and the nursing staff for assisting in the endoscopic procedures and the patients for generously participating in the research. We are indebted to Carlos Alberto for his expert technical assistance.

This study was supported by research grants awarded by the following: Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/SINTD/60055/2009), Fundação Glaxo Smith Kline das Ciências da Saúde, Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (Programa de Estímulo à Investigação, En 2011) and Centro de Estudos Ibéricos. These institutions had no role in any phase of this study.

REFERENCES

1. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48:526-535.
2. Jess T, Rungoe C, Peyrin-Biroulet L. Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10:639-645.
3. Kornbluth A, Sachar DB; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:1371-1385.
4. Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B, Danese S, Gionchetti P, Moser G, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations. *J Crohns Colitis*. 2013;7:1-33.
5. Farraye FA, Odze RD, Eaden J, Itzkowitz SH, McCabe RP, Dassopoulos T, et al. AGA medical position statement on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2010;138:738-45.
6. Cairns SR, Scholefield JH, Steele RJ, Dunlop MG, Thomas HJ, Evans GD, et al. Guidelines for colorectal cancer screening and surveillance in moderate and high risk groups (update from 2002). *Gut*. 2010;59:666-689.
7. Guagnozzi D, Lucendo AJ. Colorectal cancer surveillance in patients with inflammatory bowel disease: What is new? *World J Gastrointest Endosc*. 2012;4:108-116.
8. Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, Charabaty A. Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2011;4:53-61.
9. Dyson JK, Rutter MD. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J Gastroenterol*. 2012;18:3839-3848.
10. Soetikno RM, Lin OS, Heidenreich PA, Young HS, Blackstone MO. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc*. 2002;56:48-54.

11. Efthymiou M, Taylor AC, Kamm MA. Cancer surveillance strategies in ulcerative colitis: the need for modernization. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1800-1813.
12. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, David G, Pandur T, Balogh M, et al. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:205-211.
13. Figueiredo P, Donato M, Urbano M, Goulão H, Gouveia H, Sofia C, et al. Aberrant crypt foci: endoscopic assessment and cell kinetics characterization. *Int J Colorectal Dis*. 2009;24:441-450.
14. Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, et al. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med*. 1998;339:1277-1284.
15. Adler DG, Gostout CJ, Sorbi D, Burgart LJ, Wang L, Harmsen WS. Endoscopic identification and quantification of aberrant crypt foci in the human colon. *Gastrointest Endosc*. 2002;56:657-662.
16. Hurlstone DP, Karajeh M, Sanders DS, Drew SK, Cross SS. Rectal aberrant crypt foci identified using high-magnification-chromoscopic colonoscopy: biomarkers for flat and depressed neoplasia. *Am J Gastroenterol*. 2005;100:1283-1289.
17. Seike K, Koda K, Oda K, Kosugi C, Shimizu K, Nishimura M, et al. Assessment of rectal aberrant crypt foci by standard chromoscopy and its predictive value for colonic advanced neoplasms. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:1362-1369.
18. Lopez-Ceron M, Pellise M. Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. *Colorectal Dis*. 2012;14:e157-164.
19. Alrawi SJ, Schiff M, Carroll RE, Dayton M, Gibbs JF, Kulavlat M, et al. Aberrant crypt foci. *Anticancer Res*. 2006;26:107-119.
20. Siu IM, Robinson DR, Schwartz S, Kung HJ, Pretlow TG, Petersen RB, et al. The identification of monoclonality in human aberrant crypt foci. *Cancer Res*. 1999;59:63-66.
21. Pretlow TP, Pretlow TG. Putative preneoplastic changes identified by enzyme histochemical and immunohistochemical techniques. *J Histochem Cytochem*. 1998;46:577-583.
22. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61:759-767.

23. Yamashita N, Minamoto T, Ochiai A, Onda M, Esumi H. Frequent and characteristic K-ras activation and absence of p53 protein accumulation in aberrant crypt foci of the colon. *Gastroenterology*. 1995;108:434-440.
24. Beach R, Chan AO, Wu TT, White JA, Morris JS, Lunagomez S, et al. BRAF mutations in aberrant crypt foci and hyperplastic polyposis. *Am J Pathol*. 2005;166:1069-1075.
25. Shivapurkar N, Huang L, Ruggeri B, Swalsky PA, Bakker A, Finkelstein S, et al. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett*. 1997;115:39-46.
26. Sakurazawa N, Tanaka N, Onda M, Esumi H. Instability of X chromosome methylation in aberrant crypt foci of the human colon. *Cancer Res*. 2000;60:3165-3169.
27. Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2004;126:1634-1648.
28. Feagins LA, Souza RF, Spechler SJ. Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2009;6:297-305.
29. Kukitsu T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Katsuki S, Sato Y, et al. Aberrant crypt foci as precursors of the dysplasia-carcinoma sequence in patients with ulcerative colitis. *Clin Cancer Res*. 2008;14:48-54.
30. Moxon D, Raza M, Kenney R, Ewing R, Arozullah A, Mason JB, et al. Relationship of aging and tobacco use with the development of aberrant crypt foci in a predominantly African-American population. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3:271-278.
31. Kim J, Ng J, Arozullah A, Ewing R, Llor X, Carroll RE, et al. Aberrant crypt focus size predicts distal polyp histopathology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:1155-1162.
32. Anderson JC, Pleau DC, Rajan TV, Protiva P, Swede H, Brenner B, et al. Increased frequency of serrated aberrant crypt foci among smokers. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1648-1654.
33. Stevens RG, Swede H, Heinen CD, Jablonski M, Grupka M, Ross B, et al. Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2007;248:262-268.

34. Anderson JC, Swede H, Rustagi T, Protiva P, Pleau D, Brenner BM, et al. Aberrant crypt foci as predictors of colorectal neoplasia on repeat colonoscopy. *Cancer Causes Control*. 2012;23:355-361.
35. Takahashi H, Takayama T, Yoneda K, Endo H, Iida H, Sugiyama M, et al. Association of visceral fat accumulation and plasma adiponectin with rectal dysplastic aberrant crypt foci in a clinical population. *Cancer Sci*. 2009;100:29-32.
36. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1989;170:2-6; discussion 16-9.
37. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2004;126:1518-1532.
38. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (2). *N Engl J Med*. 1991;325:1008-1016.
39. Dignass A, Eliakim R, Magro F, Maaser C, Chowers Y, Geboes K, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2012;6:965-990.
40. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel JF, Allez M, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J Crohns Colitis*. 2012;6:991-1030.
41. Greenstein AJ, Sachar DB, Smith H, Pucillo A, Papatestas AE, Kreel I, et al. Cancer in universal and left-sided ulcerative colitis: factors determining risk. *Gastroenterology*. 1979;77:290-294.
42. Centers for Disease Control and Prevention. State-specific secondhand smoke exposure and current cigarette smoking among adults—United States, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58:1232–1235.
43. Kiesslich R, Neurath MF. Chromoendoscopy: an evolving standard in surveillance for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10:695-696.
44. Paris Workshop Participants. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002. *Gastrointest Endosc*. 2003;58:S3-43. Review.

45. Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, Schneider C, Burg J, Stolte M, et al. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2007;132:874-882.
46. Mutch MG, Schoen RE, Fleshman JW, Rall CJ, Dry S, Seligson D, et al. A multicenter study of prevalence and risk factors for aberrant crypt foci. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7:568-574.
47. Roncucci L, Medline A, Bruce WR. Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1991;1:57-60.
48. Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR. Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol*. 1991;22:287-294.
49. Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res*. 1991;51:1564-1567.
50. Pretlow TP, O'Riordan MA, Pretlow TG, Stellato TA. Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *J Cell Biochem Suppl*. 1992;16G:55-62.
51. Schoen RE, Mutch M, Rall C, Dry SM, Seligson D, Umar A, et al. The natural history of aberrant crypt foci. *Gastrointest Endosc*. 2008;67:1097-1102.
52. Gupta AK, Pinsky P, Rall C, Mutch M, Dry S, Seligson D, et al. Reliability and accuracy of the endoscopic appearance in the identification of aberrant crypt foci. *Gastrointest Endosc*. 2009;70:322-330.
53. Pinsky PF, Fleshman J, Mutch M, Rall C, Charabaty A, Seligson D, et al. One year recurrence of aberrant crypt foci. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3:839-843.
54. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, Borchard F, Cooper HS, Dawsey SM, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. 2000;47:251-255.
55. Lemeshow S, Hosmer DW Jr. A review of goodness of fit statistics for use in the development of logistic regression models. *Am J Epidemiol*. 1982;115:92-106.
56. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology*. 1983;148:839-843.
57. Youden WJ. Index for rating diagnosis tests. *Cancer*. 1950;3:32-35.

58. Mooiweer E, van der Meulen AE, van Bodegraven AA, Jansen JM, Mahmmod N, Nijsten J, et al. Neoplasia yield and colonoscopic workload of surveillance regimes for colorectal cancer in colitis patients: a retrospective study comparing the performance of the updated AGA and BSG guidelines. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19:2603-2610.
59. Eaden JA, Ward BA, Mayberry JF. How gastroenterologists screen for colonic cancer in ulcerative colitis: an analysis of performance. *Gastrointest Endosc*. 2000;51:123-128.
60. Gearry RB, Wakeman CJ, Barclay ML, Chapman BA, Collett JA, Burt MJ, et al. Surveillance for dysplasia in patients with inflammatory bowel disease: a national survey of colonoscopic practice in New Zealand. *Dis Colon Rectum*. 2004;47:314-322.
61. Kaltz B, Bokemeyer B, Hoffmann J, Porschen R, Rogler G, Schmiegel W. Surveillance colonoscopy in ulcerative colitis patients in Germany. *Z Gastroenterol*. 2007;45:325-331.
62. Ullman TA, Croog V, Harpaz N, Itzkowitz S. Biopsy specimen numbers in the routine practice of surveillance colonoscopy in ulcerative colitis (UC). *Gastroenterology*. 2004;126:A471.
63. Rodriguez SA, Eisen GM. Surveillance and management of dysplasia in ulcerative colitis by U.S. gastroenterologists: in truth, a good performance. *Gastrointest Endosc*. 2007;66:1070.
64. van Rijn AF, Fockens P, Siersema PD, Oldenburg B. Adherence to surveillance guidelines for dysplasia and colorectal carcinoma in ulcerative and Crohn's colitis patients in the Netherlands. *World J Gastroenterol*. 2009;15:226-230.
65. Marion JF, Waye JD, Present DH, Israel Y, Bodian C, Harpaz N, et al. Chromoendoscopy-targeted biopsies are superior to standard colonoscopic surveillance for detecting dysplasia in inflammatory bowel disease patients: a prospective endoscopic trial. *Am J Gastroenterol*. 2008;103:2342-2349.
66. Orlando FA, Tan D, Baltodano JD, Khoury T, Gibbs JF, Hassid VJ, et al. Aberrant crypt foci as precursors in colorectal cancer progression. *J Surg Oncol*. 2008;98:207-213.
67. Shpitz B, Bomstein Y, Mekori Y, Cohen R, Kaufman Z, Neufeld D, et al. Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics. *Hum Pathol*. 1998;29:469-475.
68. Yokota T, Sugano K, Kondo H, Saito D, Sugihara K, Fukayama N, et al. Detection of aberrant crypt foci by magnifying colonoscopy. *Gastrointest Endosc*. 1997;46:61-65.

69. Bouzourene H, Chaubert P, Seelentag W, Bosman FT, Saraga E. Aberrant crypt foci in patients with neoplastic and nonneoplastic colonic disease. *Hum Pathol.* 1999 Jan;30(1):66-71.
70. Hurlstone DP, Cross SS. Role of aberrant crypt foci detected using high-magnification-chromoscopic colonoscopy in human colorectal carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20:173-181.
71. Mascolo M, Staibano S, Ilardi G, Siano M, Vecchione ML, Esposito D, et al. Probe-based confocal laser endomicroscopy evaluation of colon preneoplastic lesions, with particular attention to the aberrant crypt foci, and comparative assessment with histological features obtained by conventional endoscopy. *Gastroenterol Res Pract.* 2012;2012:645173.
72. Rudolph RE, Dominitz JA, Lampe JW, Levy L, Qu P, Li SS, et al. Risk factors for colorectal cancer in relation to number and size of aberrant crypt foci in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:605-608.
73. Sakai E, Takahashi H, Kato S, Uchiyama T, Hosono K, Endo H, et al. Investigation of the prevalence and number of aberrant crypt foci associated with human colorectal neoplasm. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20:1918-1924.
74. Shpitz B, Klein E, Buklan G, Neufeld D, Nissan A, Freund HR, et al. Suppressive effect of aspirin on aberrant crypt foci in patients with colorectal cancer. *Gut.* 2003;52:1598-1601.
75. Johnson IT. New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mutat Res.* 2004;551:9-28.
76. Gupta AK, Pretlow TP, Schoen RE. Aberrant crypt foci: what we know and what we need to know. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:526-533.
77. Gupta AK, Schoen RE. Aberrant crypt foci: are they intermediate endpoints of colon carcinogenesis in humans? *Curr Opin Gastroenterol.* 2009;25:59-65.
78. Siu IM, Pretlow TG, Amini SB, Pretlow TP. Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *Am J Pathol.* 1997;150:1805-1813.
79. Suehiro Y, Hinoda Y. Genetic and epigenetic changes in aberrant crypt foci and serrated polyps. *Cancer Sci.* 2008;99:1071-1076.

80. Otori K, Sugiyama K, Hasebe T, Fukushima S, Esumi H. Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res.* 1995;55:4743-4746.

Table I. Univariate and multivariate analysis of risk factors for intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis

Variables	Total	Patients with IN	Patients without IN	Univariate			Multivariate		
				p	OR (95% CI)	p	Model 1 ^A OR (95% CI)	Model 2 ^B OR (95% CI)	
ACF prevalence - n (%)	46 (60.5%)	7 (100%)	39 (56.5%)	0.038	0.998	-			
Patients with ACF	30	0	30						
Patients without ACF									
ACF number*	2.4±2.8	5.0±2.3	2.1±2.7	0.003	-	0.029	1.338 (1.030-1.738)		
Gender - n (%)									
Male	30	4 (13.3%)	26	0.424	0.562	0.839			
Female	46	3 (6.5%)	43						
Current age - years*	48.9±13.2	56.1±15.6	48.2±12.9	0.232	0.893	0.819			
Age at disease diagnosis - years*	33.3±11.6	32.6±11.0	33.3±11.7	0.869	0.965	0.937			
Disease duration - years*	16.1±9.9	27.9±20.3	14.9±7.4	0.019	0.046	0.026	1.087 (1.002-1.079)	1.092 (1.010-1.181)	
Extent of disease - n (%)									
Distal	46	5 (10.9%)	41	0.697	0.558	0.470			
Extensive	30	2 (6.7%)	28						
Pseudopolyps - n (%)									
Yes	33	2 (6.1%)	31	0.692	0.422	0.895			
No	43	5 (11.6%)	38						
Oral 5-ASA maintenance therapy									
Yes	66	5 (7.6%)	61	0.228	0.090	0.264			
No	10	2 (20%)	8						
Smoking status ^c - n (%)									
Current	4	0 (0%)	4	0.799	0.500	0.374			
Former	19	2 (10.5%)	17						
Never	53	5 (9.4%)	48						
Family history of CRC - n (%)									
Yes	7	2 (28.6%)	5	0.123	0.423	0.281			
No	69	5 (7.2%)	64						
Body mass index - n (%)									
<18.5	3	0 (0%)	3	0.787	0.730	0.687			
18.5 – 24.9	29	4 (13.8%)	25						
25 – 29.9	32	0 (0%)	32						
≥ 30	12	3 (25%)	9						

IN – Intraepithelial neoplasia; OR - Odds Ratio; CI - Confidence Interval; ACF - Aberrant crypt foci; CRC - colorectal cancer.

* Mean ± standard deviation

A - Model 1 - Multivariate logistic regression analysis designed to assess whether the prevalence of aberrant crypt foci is an independent risk factor for intraepithelial neoplasia. Variables included in the model were: aberrant crypt foci prevalence, gender, current age, age at disease diagnosis, disease duration and extent, presence of pseudopolyps, oral 5-ASA maintenance therapy, smoking status, family history of colorectal cancer and body mass index.

B - Model 2 - Multivariate logistic regression analysis designed to assess whether the number of aberrant crypt foci is an independent risk factor for intraepithelial neoplasia. Variables included in the model were: aberrant crypt foci number, gender, current age, age at disease diagnosis, disease duration and extent, presence of pseudopolyps, oral 5-ASA maintenance therapy, smoking status, family history of colorectal cancer and body mass index

C - According the definition stated by the Centers for Disease Control and Prevention (42).

Table II. Intraepithelial neoplasia rates according the cut-off of 3 aberrant crypt foci

ACF number	Total	Patients with IN	Patients without IN	<i>p</i>
0-2	45	0 (0%)	45	0.001
≥ 3	31	7 (22.6%)	24	

ACF - Aberrant crypt foci; IN - Intraepithelial neoplasia;

Table III. Prevalence and number of aberrant crypt foci according to various potential risk factors

Variables	Total - n	ACF prevalence - n (%)	<i>p</i>	ACF number*	<i>p</i>
Gender					
Male	30	18 (60.0%)	0.940	2.6 ± 3.3	0.808
Female	46	28 (60.9%)		2.2 ± 2.5	
Current age [#]					
≤ 40	23	11 (47.8%)	0.136	1.4 ± 2.0	0.032
> 40	53	35 (66.0%)		2.8 ± 3.0	
Age at disease diagnosis [#]					
≤ 40	56	33 (58.9%)	0.633	2.5 ± 3.0	0.937
> 40	20	13 (65.0%)		2,2 ± 2.2	
Disease duration [#]					
≤ 20	61	35 (57.4%)	0.257	2.2 ± 2.8	0.172
> 20	15	11 (73.3%)		3.1 ± 2.8	
Extent of disease					
Distal	46	30 (65.2%)	0.300	2.4 ± 2.7	0.498
Extensive	30	16 (53.3%)		2.3 ± 3.1	
5-ASA maintenance therapy					
Oral					
Yes	66	41 (62.1%)	0.503	2.3 ± 2.7	0.738
No	10	5 (50.0%)		3.1 ± 3.6	
Topic					
Yes	14	9 (64.3%)	0.750	3.6 + 4.2	0.370
No	62	37 (59.7%)		2.1 + 2.4	
Pseudopolyps					
Yes	33	21 (63.6%)	0.627	2.1 ± 2.2	0.700
No	43	25 (58.1%)		2.6 ± 3.2	
Smoking status					
Current	4	2 (50.0%)	0.886	3.5 ± 5.7	0.954
Former	19	12 (63.2%)		2.5 ± 2.6	
Never	53	32 (60.4%)		2.3 ± 2.6	
Family history of CRC					
Yes	7	7 (100%)	0.038	4.14 ± 3.6	0.044
No	69	39 (56.5%)		2.2 ± 2.7	
Body mass index					
<18.5	3	0 (0%)	0.055	0	0.028
18.5 – 24.9	29	16 (55.2%)		1.9 ± 2.6	
25 – 29.9	32	20 (62.5%)		2.6 ± 3.1	
≥ 30	12	10 (83.3%)		3.7 ± 2.5	

ACF - Aberrant crypt foci; CRC - colorectal cancer.

* Means ± standard deviation

Years

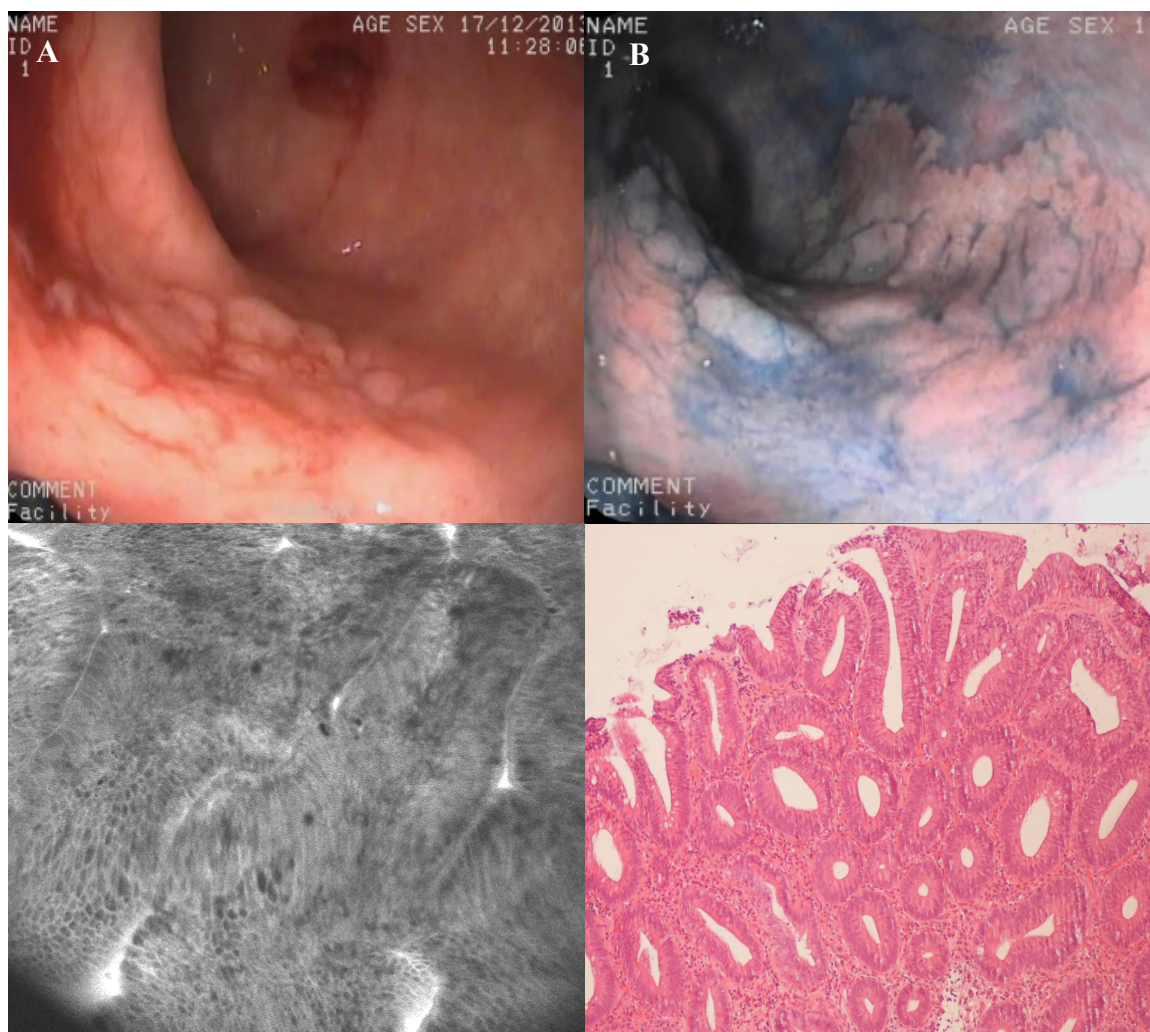


Figure 1. Lesion detected during colon screening (A) and highlighted after chromoendoscopy with methylene blue (B). The evaluations by endomicroscopy (C) and histology (D) agree on the identification of intraepithelial neoplasia.

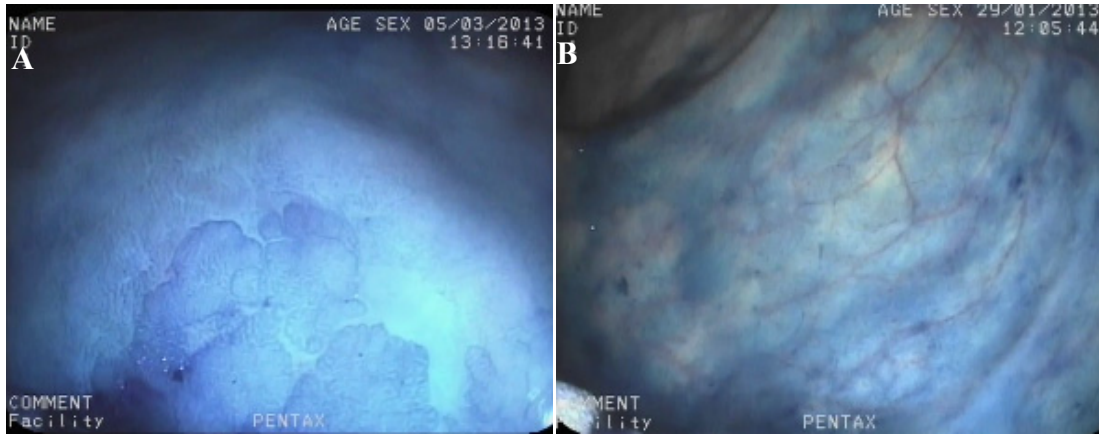


Figure 2. Endoscopic views of the rectum stained with methylene blue. A - Aberrant crypt foci endoscopic appearance. B - Endoscopic view of the rectum of a patient without aberrant crypt foci.

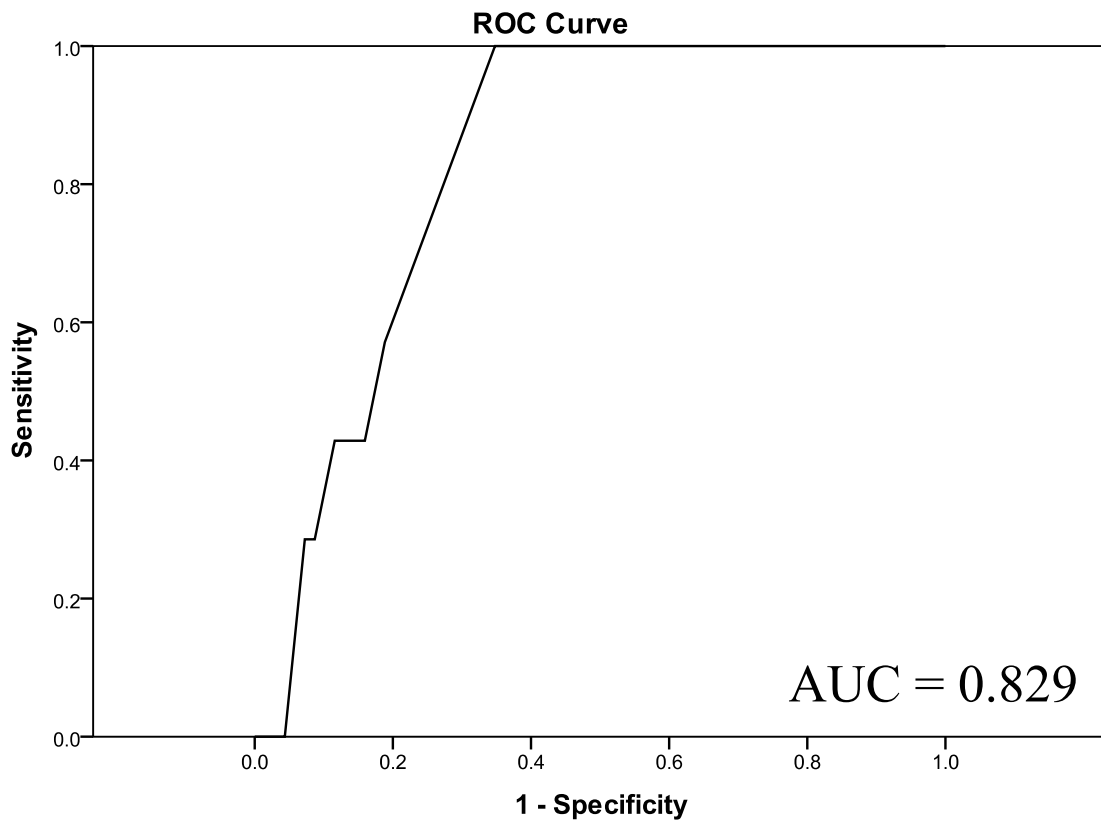


Figure 3. Receiver operating characteristic (ROC) curve and corresponding area under the curve (AUC) for the number of aberrant crypt foci as predictors of the likelihood of having intraepithelial neoplasia.

SUMÁRIO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

SUMÁRIO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A investigação na doença inflamatória intestinal foi dominada pela imunologia na década de 1990 e pela genética no decénio seguinte. Apesar de descobertas prometedoras e de alguns subsequentes avanços na abordagem da doença, incluindo a emergência de novas terapêuticas, o impacto clínico da perquisição nessas áreas ficou aquém das expectativas originais. O conhecimento da etiopatogenia da doença logrou vários e rápidos avanços mas a sua etiologia mantém-se ignota. Não obstante, o trilho percorrido caracterizou a doença inflamatória intestinal como uma patologia complexa e heterogénea e suscitou, na comunidade clínica e científica, o interesse da exploração dessa heterogeneidade como forma de diferenciar o prognóstico e de adaptar, em conformidade, as estratégias de diagnóstico, seguimento e tratamento. O trabalho desenvolvido nesta tese intentou contribuir nesta vertente, ou seja, explorar a tradução prática da heterogeneidade da doença inflamatória intestinal como forma de aproximação da ambicionada medicina personalizada.

Na primeira parte da tese foi avaliada a utilidade prognóstica do gene *NOD2/CARD15* na doença de Crohn e na colite ulcerosa. No que diz respeito à doença de Crohn, verificámos que as mutações *NOD2/CARD15* não têm influência significativa nem na incidência nem no momento de eclosão das fístulas perianais. Não obstante, na nossa série, os doentes com fístulas perianais portadores de mutação apresentaram pior resposta à antibioterapia com ciprofloxacina e/ou metronidazol. Relativamente à colite ulcerosa, o nosso trabalho revelou que apesar das variantes do gene *NOD2/CARD15* não determinarem aumento da susceptibilidade para a doença, associam-se a um curso mais agressivo da patologia, incluindo maior necessidade de corticóides no primeiro ano, aumento da refractariedade a corticóides endovenosos e incremento da taxa de colectomia.

Os avanços nos conhecimentos e nas ferramentas de exploração dos determinantes genéticos associados à congregação de esforços de várias equipas de investigação originaram os *genome-wide association studies* (GWAS). Estes estudos, investigando uma cifra considerável de variantes genéticas num número substancial de doentes, representam uma comprovada mais valia na exploração do mapa genético da doença inflamatória intestinal. Todavia, a pesquisa de correlações genótipo-fenótipo tem-se cingido, quase exclusivamente, a genes de susceptibilidade para a doença. No entanto, um gene que não determine aumento do risco de desenvolver a doença pode, ainda assim, influenciar o seu fenótipo, cenário que é reflectido, por exemplo, pelos resultados do nosso trabalho. Por outro lado, importa salientar que os estudos GWAS podem diluir a reconhecida heterogeneidade regional e étnica da base genética da doença inflamatória intestinal. Deste modo, é preciso interpretar cuidadosamente as conclusões desses trabalhos e perceber que as discrepâncias dos resultados dos estudos prévios não são, necessariamente, falsos positivos originados por erros de amostragem.

Na segunda parte da tese debruçamo-nos sobre o rastreio de neoplasia do cólon na doença inflamatória intestinal, nomeadamente na colite ulcerosa, comparando, em doentes sem colangite esclerosante primária e sem história de neoplasia intra-epitelial, dois métodos de vigilância: a colonoscopia convencional com biopsias aleatórias seriadas e a endomicroscopia confocal guiada por cromoendoscopia. No nosso trabalho, o desempenho da endomicroscopia confocal guiada por cromoendoscopia na detecção de neoplasia intra-epitelial não foi significativamente superior ao da colonoscopia convencional com biopsias aleatórias seriadas. Por outro lado, a endomicroscopia confocal guiada por cromoendoscopia revelou-se mais demorada que a colonoscopia convencional, mas diminuiu o número de biopsias realizadas e aumentou significativamente a proporção de biopsias com neoplasia intra-epitelial. Por último, a endomicroscopia confocal revelou boa acuidade na identificação de neoplasia intra-epitelial, sobretudo um elevado valor preditivo negativo.

Os resultados do nosso trabalho, designadamente no que se refere ao desempenho na detecção de neoplasia intra-epitelial, contrariam as conclusões dos restantes estudos da literatura. Nesses trabalhos, a cromoendoscopia revelou ser superior à colonoscopia convencional no rastreio de doentes seguidos em centros de referência e incluindo condições de risco elevado, designadamente colangite esclerosante primária e/ou história de neoplasia intra-epitelial. Deste modo, os resultados do nosso estudo salientam que a heterogeneidade da doença inflamatória intestinal deve ser tida em conta quando se selecciona o método a utilizar no rastreio de neoplasia do cólon. Esta estratégia permitirá uma melhor gestão e alocação de recursos, sem prejudicar ou comprometer a propriedade da vigilância. No que concerne ao bom desempenho da endomicroscopia confocal na identificação de neoplasia intra-epitelial, os nossos resultados alinham-se com as conclusões dos outros estudos. Destaca-se o elevado valor preditivo negativo da técnica que suporta a ideia de que será redundante biopsar áreas cujo aspecto endomicroscópico se revele normal.

Em termos de perspectivas futuras, com a emergência dos colonoscópios de alta definição é preciso verificar se, com a sua utilização, a cromoendoscopia mantém algum benefício ou se, pelo contrário, se tornará expletiva. Paralelamente é necessário averiguar e definir as características das curvas de aprendizagem das diversas técnicas, em especial da cromoendoscopia e da endomicroscopia confocal.

Ainda na segunda parte da tese, no contexto da utilização da endomicroscopia confocal, explorámos um sistema computacional de avaliação das imagens captadas, obtendo resultados encorajadores em termos de classificação das micrografias em dois grupos – com baixa ou com alta probabilidade de patologia. Os nossos dados constituem uma importante base de trabalho com vista ao desenvolvimento de ferramentas que auxiliem a interpretação das imagens obtidas, tentando minimizar, dessa forma, um dos previsíveis obstáculos à disseminação da utilização da endomicroscopia confocal.

Na terceira e última parte da tese avaliámos os focos de criptas aberrantes como potenciais biomarcadores de neoplasia do cólon na colite ulcerosa. A nossa investigação demonstrou que a existência, a nível do recto, de três ou mais focos de criptas aberrantes é um factor de risco independente para neoplasia intra-epitelial. Acessoriamente, verificámos que a idade superior a 40 anos, a história familiar de cancro colorectal e o índice de massa corporal elevado se associam de forma positiva e significativa com o número de focos de criptas aberrantes. Assim, a pesquisa de correlação entre os focos de criptas aberrantes e o risco de neoplasia intra-epitelial deve ser ajustada ou controlada para esse factores, à semelhança do que efectuámos no nosso estudo.

A investigação do papel dos focos de criptas aberrantes como biomarcadores e/ou precursores de neoplasia do cólon na doença inflamatória intestinal é, surpreendentemente, uma área pouco explorada. A prossecução do trabalho neste âmbito pode ajudar a desvendar alguns elementos da carcinogénese, contribuir para uma melhor estratificação do risco neoplásico e, paralelamente, propiciar uma melhor adesão dos doentes aos programas de rastreio. A concretização destas metas implica, contudo, a exploração concomitante de outros aspectos relacionados com os focos de criptas aberrantes, incluindo a avaliação da sua história natural, a potencial influência das medicações na sua evolução e a uniformização dos elementos técnicos e operacionais envolvidos na sua pesquisa.

