UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Patologia

**EXPRESSÃO PRECOCE DE CD34, CD68, α -ACTINA DE MÚSCULO LISO E
COX-2 NO ESTROMA PERICRIPTAL DURANTE CARCINOGENÊSE COLÔNICA
INDUZIDA QUIMICAMENTE EM RATOS.**

ALINE TURATTI

Ribeirão Preto

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Patologia

EXPRESSÃO PRECOCE DE CD34, CD68, α -ACTINA DE MÚSCULO LISO E
COX-2 NO ESTROMA PERICRIPTAL DURANTE CARCINOGENESE COLÔNICA
INDUZIDA QUIMICAMENTE EM RATOS.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação do Departamento de
Patologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Ribeirão Preto

2006
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Patologia

**EXPRESSÃO PRECOCE DE CD34, CD68, α -ACTINA DE MÚSCULO LISO E
COX-2 NO ESTROMA PERICRIPTAL DURANTE CARCINOGENÊSE COLÔNICA
INDUZIDA QUIMICAMENTE EM RATOS.**

ALINE TURATTI

Ribeirão Preto

2006

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Turatti, Aline

Expressão precoce de CD34, CD68, α -actina de músculo liso e COX-2 no estroma pericriptal durante carcinogênese colônica induzida quimicamente em ratos.

52 p.; il.; 29 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

1. CD34 – 2. CD68 – 3. α -SMA – 4. COX-2 – 5. estroma pericriptal – 6. carcinogênese colônica – 7. DMH

Dedico este Trabalho

Aos meus pais Lêda e Turatti

por serem meus maiores e melhores
exemplos de amor, união e coragem...

Minha irmã Wendy, Tia-Lu e Vó Ida

por tudo que significam pra mim...

Voiá, Vô Careca e Juju

que tantas saudades nos deixaram...

“De tudo, ficam três coisas:

*A certeza de que estamos sempre
começando;*

A certeza de que precisamos continuar;

*A certeza de que seremos interrompidos
antes de terminar...*

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo;

Da queda um passo de dança;

Do medo uma escada;

Do sonho uma ponte;

Da procura um encontro...”

[Fernando Pessoa]

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador e amigo

Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia

Por sua incomparável capacidade de extrair das pessoas o que de melhor elas podem oferecer. Obrigada pela oportunidade de aprendizado constante e pela enorme participação em minha formação científica, ética e profissional.

“A felicidade não está na partida nem na chegada, mas na travessia”

[Guimarães Rosa]

AGRADECIMENTOS

A CAPES, pela bolsa concedida;

À Rosangela Orlandin Lopes, pela amizade, carinho e por todo auxílio técnico;

À Rosangela M. Castania de Paiva, pela amizade fraterna;

À Neide Terezinha Gonçalves, Luciara T. Santana e Edna Pio pela atenção e gentileza.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia, em especial: Adriana Luisa Gonçalves de Almeida, Antonio de Pádua Martins, Daniel Barcelini, Deise Lúcia Chesca Simões e Maria Aparecida Apolinário Caetano pela boa vontade e amizade constante;

À Tânia M. Beltramini Trevilato, por me direcionar para o caminho científico;

À Maria Capelini Turatti, por estar presente em todos os momentos e por me guiar profissionalmente desde a Graduação (este é o fruto do nosso trabalho!);

Ao Prof. Dr. Miguel Angel Sala Di Matteo, pelo auxílio na etapa estatística;

Aos amigos Marcelo Vinícius Oliveira Vespúcio e Patrícia Modiano pela amizade e colaboração incondicional;

À querida Juliana Rodrigues da Costa pelo carinho e companheirismo desde as primeiras etapas desta caminhada;

Ao quarteto: Mariana Marggiori, Camila S. Rosa, Daniella L. Nunes e Daniel Kelly por poder compartilhar meus sonhos, fracassos e sucessos mais profundos, sem reserva;

Aos meus anjos-da-guarda: Priscilla e Marcelo Rezende;

Aos amigos, em especial à Márcia Cristina M. Guimarães, Renata Toscano Simões, Waynice N. Garcia, Cleverson Rodrigues, Karina Magalhães Alves da Mata, Marcela Kazue Hassumi, Luane Taísa da Costa Barros e Lisandra Vanessa Martins.

A todos aqueles que direta ou indiretamente participaram, incentivaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

*"Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, pois cada pessoa é única
e nenhuma substitui outra.
Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, mas não vai só
nem nos deixa sós.
Leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.
Há os que levam muito,
mas há os que não levam nada.
Essa é a maior responsabilidade de nossa vida,
e a prova de que duas almas
não se encontram ao acaso. "*

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras e Tabelas	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
1.INTRODUÇÃO.	1
1.1 Câncer Colorretal	1
1.2 Carcinogênese	
2	
1.3 Alterações Estromais na Carcinogênese	
4	
1.4 Focos de Criptas Aberrantes	9
1.5 Modelos Experimentais de Carcinogênese Colorretal	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL & MÉTODOS	
15	
3.1 Animais	15
3.2 Delineamento experimental	15
3.3 Preparo da DMH	16
3.4 Coleta e Processamento do material	17
3.5 Imunohistoquímica	18
3.6 Análise Morfométrica	19
3.7 Análise Estatística	20
4. RESULTADOS	22

4.1 Observações Gerais	
22	
4.2 Características Histológicas e Análise Seqüencial dos FEA	22
5. DISCUSSÃO	
32	
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS	40
8. ANEXOS	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AOM	Azoximetano
APC	Adenomatous polyposis coli
ASMA	α -actina de músculo liso
BM	Membrana basal
CAFs	Fibroblastos associados ao câncer
CF	Criptas filhas
CFi	Índice de fissão de criptas
COX	Ciclooxigenase
DAB	3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorido
DMH	1,2-dimetilhidrazina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
FAP	Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar
FCA	Focos de Criptas Aberrantes
FEA	Foco de estroma ativado
H&E	Hematoxilina & Eosina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	K Dalton
K-ras	Kirsten rat sarcoma
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MIN	Neoplasia intestinal múltipla
MVD	Densidade microvascular
NACM	Mucosa colônica de aparência normal
NMU	N-metil-N-nitrosouréia
PMFs	Miofibroblastos pericriptais

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Esquema do delineamento experimental.
- Figura 2.** Área de mucosa colônica ocupada por células CD34, CD68, COX-2 e ASMA positivas no “foco de estroma ativado”.
- Figura 3.** Mucosa colônica corada por H&E.
Mucosa colônica com aparência normal (A) com vasos sanguíneos delicados (seta) e pequeno número de células estromais. Foco de Estroma Ativado (B, C, D). Grandes vasos sanguíneos (seta) na Figura B e o limite da mucosa normal e ASF na Figura C (*).
(A e B = 400X; C e D = 200X)
- Figura 4.** Índice de Fissão de Criptas na mucosa de aparência normal (barras brancas) e no “foco de estroma ativado” (barras pretas).
- Figura 5.** Área de mucosa colônica ocupada por vasos sanguíneos no estroma de aparência normal (barras brancas) e no FEA (barras pretas).
- Figura 6.** Número de células ASMA (A), CD34 (B), CD68 (C) e COX-2 (D) positivas; MVD (E) e CF1 (F) no estroma de aparência normal e no FEA.
- Figura 7.** Evolução das imuno-marcações (ASMA, CD34, CD68 e COX-2), densidade microvascular (MVD) e Fissão de Criptas nos Focos de Estroma Ativado.
- Figura 8.** Imunohistoquímica para CD34 e CD68 da mucosa colônica (200X). A – imuno-marcação CD34 na mucosa colônica de aparência normal com delicados vasos sanguíneos (seta); B - imuno-marcação CD34 no “Foco de Estroma Ativado” com grandes vasos sanguíneos (seta); C - imuno-marcação CD68 na mucosa colônica de aparência normal

com pequeno número de células positivas (seta); D - imuno-marcação CD68 no “Foco de Estroma Ativado” com maior número de células positivas.

Figura 9. Imunohistoquímica para ASMA e COX-2 da mucosa colônica (200X). A – imuno-marcação ASMA na mucosa colônica de aparência normal com pequeno número de células positivas (seta); B - imuno-marcação ASMA no “Foco de Estroma Ativado” com grande número de células positivas (seta); C – imuno-marcação COX-2 na mucosa colônica de aparência normal com pequeno número de células positivas (seta); D - imuno-marcação COX-2 no “Foco de Estroma Ativado” com grande número de células positivas (setas).

Tabela 1. Características dos Anticorpos Primários

Tabela 2. Médias $\pm$ DP dos pesos (g) dos animais de todos grupos experimentais.

Turatti, A. **Expressão precoce de CD34, CD68, α -actina de músculo liso e COX-2 no estroma pericriptal durante carcinogênese colônica induzida quimicamente em ratos.** 2006. 52 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado que a atividade coordenada das células epiteliais com o estroma é fundamental no crescimento e diferenciação em situações fisiológicas e patológicas, inclusive no câncer. Vários relatos acentuam a importância do compartimento estromal nos tumores malignos e indicam fortemente que interações contínuas entre o carcinoma e as células estromais (resultando em regulamento e modulação recíproca) são condições prévias para desenvolvimento e progressão de carcinomas. Comparativamente, pouca informação está disponível sobre as características e o papel do estroma durante o processo carcinogênico e a maioria dos dados são baseados em estudos isolados. Nos animais tratados com o carcinógeno Dimetilhidrazina foi identificado na mucosa colônica o aparecimento de “Focos de Estroma Ativado” (FEA) que diferem do foco inflamatório esporádico encontrado na mucosa normal dos animais controles devido à imuno-expressão aumentada de células CD34, CD68, α -actina de músculo liso (ASMA), COX-2 positivas e densidade microvascular. Além disso, o FEA cercou um número aumentado de criptas colônicas em fissão que freqüentemente apresentavam células epiteliais com núcleos hipercromáticos. Este último achado pode sugerir correlação entre as alterações estromais e epiteliais dentro dos FEA. Embora esses achados sejam novos, são consistentes com observações prévias que o estroma tem um papel significativo na carcinogênese. Juntamente com dados da literatura, este trabalho sugere que, no cólon, a “*field cancerization*” epitelial pode ser acompanhada através de alterações estromais e isto pode apontar novos marcadores de transformação neoplásica.

Palavras-chave: CD34, CD68, alfa-actina de músculo liso, COX-2, estroma pericriptal, carcinogênese colônica, 1,2 – Dimetilhidrazina (DMH)

Turatti, A. **Early Expression of CD34, CD68, α -smooth muscle actin and COX-2 in pery-crypt stroma during chemically-induced rat colonic carcinogenesis.** 2006. 52 f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

ABSTRACT

There has been considerable that the activity of epithelial cells with their stroma is fundamental in controlling growth and differentiation in normal and pathological situations, including cancer. A number of reports stress the importance of the stromal compartment in malignant tumors and strongly indicate that continuous interactions between the carcinoma and stromal cells (resulting in their reciprocal regulation and modulation) are prerequisites for carcinoma development and progression. Comparatively, less information is available about the features and role of the stroma for the carcinogenic process. In animals treated with the carcinogen Dimethyl-hydrazine we identified the appearing of mucosal “Activated Stromal Foci” (ASF) that differ from the sporadic inflammatory foci found in the normal mucosa of the control animals because of the presence of increased immune-expression of CD34, CD68, α -smooth muscle actin (ASMA), COX-2 positive cells and microvessel density. Furthermore, the ASF surrounded a increased number of colonic crypts in fission when compared to areas of normal stroma. This last finding suggests that stromal activation and epithelial changes may be correlated. These findings are novel but expected and consistent with previous observations that the stroma has a significant role in carcinogenesis. Taken together with literature data, our findings suggest that in the colon, the epithelial *field cancerization* may be accompanied by stromal changes and this may point to the finding of new markers of neoplastic transformation.

Keywords: CD34, CD68, α -smooth muscle actin (ASMA), COX-2, pery-crypt stroma, colonic carcinogenesis, 1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH)

1. Introdução

1.1 Câncer Colorretal

Embora conhecido há séculos, somente nas últimas décadas o câncer se tornou um evidente problema de saúde pública mundial. Esta doença se desenvolve essencialmente em consequência do acúmulo de mutações nos genes de células somáticas que desempenham papel crítico no controle da proliferação, crescimento, sinalização, adesão e morte celulares, juntamente com uma série de alterações histopatológicas (FEARON & VOGELSTEIN, 1990; VENITT, 1994; EVAN & LITTLEWOOD, 1998).

O intestino grosso é um dos locais de maior frequência de neoplasias primárias no corpo humano, podendo estas lesões ter um caráter benigno, (adenomas) ou maligno (adenocarcinomas). Praticamente 98% de todos os cânceres do intestino grosso são adenocarcinomas, sendo que estes representam ainda 70% de todas as neoplasias malignas do trato gastrointestinal (MORSON *et al.*, 1974). O câncer de cólon esporádico corresponde à 85% do total de neoplasias malignas colorretais, e a forma hereditária compreende 15% do total de casos deste tipo de lesão. O câncer colorretal hereditário apresenta duas subdivisões: a Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), totalizada por menos de 1% de todos os casos e o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) que corresponde a cerca de 10% do total de casos (COTTI *et al.*, 2000).

A incidência e a mortalidade por câncer de cólon têm apresentado tendência ao crescimento no mundo todo, em especial em países desenvolvidos e áreas urbanas de países menos desenvolvidos. O carcinoma colorretal é o terceiro tipo de câncer mais comum, em termos de casos novos (PARKIN, 2004) e a maior causa de morte por câncer nos países ocidentais (SAIKALI *et al.*, 2004).

No Brasil, com o aumento da expectativa de vida da população, as neoplasias vêm ganhando cada vez mais importância. As regiões sul e sudeste demonstram maiores taxas de morbimortalidade por câncer de cólon (Datasus, 2005). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que o câncer de colorretal para o ano de 2006 no Brasil será o 5º tumor maligno mais freqüente entre homens (com 11.390 casos novos) e 4º entre as mulheres (13.970 casos novos). A maior incidência de casos ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de desenvolvimento já aumentam a partir dos 40 anos. (INCA - Ministério da Saúde, 2006).

A incidência de câncer colorretal apresenta acentuada variação em todo o mundo, mas mantém íntima correlação com os padrões socioeconômicos em vários países. Os mais importantes determinantes padrões de ocorrência de câncer em diferentes populações são os fatores ambientais e o estilo de vida. Os fatores de risco relacionados à dieta e outros, como obesidade e atividade física, parecem atuar por múltiplas e diferentes vias que podem se sobrepor (POTTER, 1996). Outros fatores de risco são presença de doença inflamatória intestinal (retocolite ulcerativa e doença de Crohn), cirurgias prévias (gástricas, colecistectomia, ureterossigmoidostomia) e também a genética individual (WILLIAMS, 1993).

1.2 Carcinogênese

Carcinogênese é um termo geral que denota o desenvolvimento de neoplasia (PITOT & DRAGAN, 1991). Este desenvolvimento neoplásico é um processo de múltiplos estágios exemplificado pelo acúmulo de mutações somáticas de uma célula resultando na alteração de suas propriedades e na aquisição de alterações que manifestam do fenótipo maligno (HAHN & WEINBERG, 2002).

Na década de 1940, pesquisadores que estudavam a carcinogênese em camundongos demonstraram a existência de dois estágios distintos: a iniciação e a promoção (ROUS & KIDD, 1941; MOTTRAM, 1944; BERENBLUM & SHUBIK, 1947). Estes experimentos clássicos permitiram a compreensão das características das fases de iniciação e promoção o que resultou em um modelo seqüencial do desenvolvimento neoplásico dividido em três estágios: iniciação, promoção e progressão (MOOLGAVKAR, 1986; DRAGAN *et al.*, 1993). O primeiro estágio da carcinogênese, conhecido como etapa da iniciação, caracteriza-se por alteração permanente e irreversível do DNA celular resultante de alterações genéticas inerentes, ou mais comumente de alterações epigenéticas induzidas por carcinógenos. A célula iniciada pode transforma-se em maligna, se receber ou não estímulos promotores de malignidade (HEMMINK, 1993). A etapa subsequente à iniciação é representada pela promoção, que por sua vez apresenta longa duração. O estágio de promoção tumoral é caracterizado pela expansão clonal de células iniciadas pela ação de um agente promotor devido a alterações na expressão de genes geralmente relacionados à proliferação, apoptose e inflamação celular. Diferentemente da iniciação, a promoção é reversível desde que tirado o agente promotor (KLAUNIG *et al.*, 2000). Além disso, as células pré-neoplásicas podem progredir para neoplasia benigna ou maligna (BANNASCH, 1986). No último

estágio, durante a progressão do tumor, além da irreversibilidade, as células pré-neoplásicas se tornam invasivas e mais expansivas devido à progressiva instabilidade genômica (PITOT & DRAGAN, 1991).

1.3 Alterações Estromais na Carcinogênese

É bem aceito que a atividade coordenada das células epiteliais com o estroma é fundamental no crescimento e diferenciação em situações fisiológicas e patológicas, inclusive o câncer (DONJACOUR & CUNHA, 1991). Em contraste com a idéia convencional de que o desenvolvimento neoplásico é um processo autônomo da célula e que os maiores participantes são as próprias células neoplásicas, novas evidências atribuem importante papel aos componentes estromais, como os fibroblastos, onde a neoplasia é vista como uma mistura heterogênea de diferentes tipos celulares. Estes diferentes tipos de células, sendo células neoplásicas, fibroblastos, células endoteliais e outras, interagem reciprocamente e atuam com quase a mesma importância na manifestação de determinados aspectos do fenótipo maligno (KIARIS *et al.*, 2004). Todos estes relatos acentuam a importância do compartimento estromal nos tumores malignos e indicam fortemente que as interações contínuas entre o carcinoma e as células estromais são condições prévias para desenvolvimento e progressão do carcinoma, embora análise experimental destes mecanismos seja muito difícil (MÜELLER & FUSENIG, 2002).

Os patologistas foram os primeiros a perceberem que os fibroblastos estromais sofriam mudanças quantitativas e morfológicas durante a progressão do câncer. Relativo às mudanças quantitativas eles notaram que tumores humanos como o de mama, cólon, estômago e pâncreas exibiram aumento no conteúdo de

fibroblastos que em certos casos chegavam a 90% da massa tumoral. (SCHURCH *et al.*, 1981; HOWLETT & BISSELL, 1993). Isso indica que os fibroblastos adjacentes às células neoplásicas são alvos de certos sinais que resultam em respostas proliferativas. A proliferação aumentada dos fibroblastos constitui somente o aspecto mais comum da resposta estromal, chamada resposta desmoplásica, a qual é caracterizada por alterações na matriz extracelular como o aumento da produção de colágenos específicos, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteoglicanas (MAHFOUZ *et al.*, 1987; HOWLETT & BISSELL, 1993).

Estes fibroblastos modificados, denominados miofibroblastos ou fibroblastos associados ao câncer (CAFs), desempenham uma função central no complexo processo de interação tumor-estroma e conseqüentemente na tumorigênese. Os miofibroblastos representam o tipo predominante de fibroblastos no tumor (SAPPINO *et al.*, 1988; RONNOV-JESSEN *et al.*, 1996). Esta denominação reflete o estado intermediário entre as células musculares lisas e fibroblastos (GABBIANI *et al.*, 1997; DEWEVER & MAREEL, 2002). São células que participam da cicatrização através da migração, proliferação e produção de fatores críticos na regulação dos processos patológicos. Deve ser mencionado que os miofibroblastos não são células patológicas por si só, mas que estão presentes em vários tecidos sob condições anormais (POWELL *et al.*, 1999).

Eles podem ser identificados através de imunohistoquímica pela expressão de marcadores mesenquimais como α -actina de músculo liso, ASMA (42 KD), e vimentina (52-58 KD). (RONNOV-JESSEN *et al.*, 1996; DEWEVER & MAREEL, 1999). A ativação do programa de diferenciação parcial do músculo liso, exemplificada pela expressão das proteínas acima mencionadas resultando na geração do miofibroblasto, também tem sido notada nos miofibroblastos que regem

a resposta de reparo na inflamação. (SAPPINO *et al.*, 1990). A presença ou ausência de outros filamentos celulares, como desmina (50-54 kD), calponina, caldesmona e miosina de músculo liso (460 kD), também foi usada para melhor caracterizar estas, mas dependendo de sua localização e condição patológica o padrão de expressão pode marcar diferentemente (GRUPP *et al.*, 1997; POWELL *et al.*, 1999; SERINI & GABBIANI, 1999).

A proliferação dos fibroblastos estromais parece não somente uma característica chave em diversas condições inflamatórias, mas também no câncer (POWELL *et al.*, 1999). A suposição que a inflamação crônica estaria envolvida na tumorigênese foi postulada por Virchow quando observou que mediadores químicos decorrentes da inflamação estimulavam a proliferação celular (BALKWILL & MANTOVANI, 2001). Esta hipótese foi mais tarde suportada por similaridades surpreendentes da reação tecidual das células inflamatórias, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e fibroblastos ativados na cicatrização e no câncer (COUSSENS & WERB, 2002). A grande diferença notada é que o tecido de reparação, em contraste com o tumoral, tem crescimento autolimitado, sustentando o conceito do tumor como “feridas que não cicatrizam” (DVORAK, 1986).

Diversos estudos têm quantificado os miofibroblastos no estroma de diferentes tipos de câncer. No câncer de mama invasivo, estes fibroblastos foram encontrados em proporções muito maiores que em carcinomas “*in situ*” (SCHÜRCH, 1999). Na neoplasia intraepitelial prostática o estroma tumoral é caracterizado por muitos fibroblastos e uma redução radical das células musculares lisas, tipo celular proeminente no estroma de próstata normal (TUXHORN *et al.*, 2002.) No cólon os miofibroblastos aparecem dispostos em forma de malha circundando as criptas, sendo denominados miofibroblastos pericriptais (PMFs), e

parecem estar envolvidos, juntamente com as células epiteliais, na produção da membrana basal (BM) do epitélio colônico (HIGAKI *et al.*, 1999). Nos pólipos neoplásicos colônicos, os fibroblastos intersticiais são substituídos por um grande número de PMFs (ADEGBOYEGA *et al.*, 2004).

Outro ponto importante é o crescimento de novos capilares por ser uma etapa essencial no desenvolvimento tecidual. A angiogênese associada aos tumores sólidos é um processo em que novos capilares são formados no estroma tumoral a partir de células endoteliais do hospedeiro (LIOTTA *et al.*, 1974,1976; DICKINSON *et al.*, 1994; FOLKMAN 1995). Há muitas décadas foi percebido que os tecidos tumorais apresentam uma vascularização bastante proeminente em relação aos tecidos normais. Existem suficientes evidências hoje de que a presença desta vascularização exacerbada é uma condição essencial para que ocorra o desenvolvimento neoplásico. Isto se deve ao desenvolvimento de microvasos a partir de células endoteliais pertencentes a capilares situados próximos às células neoplásicas. O conteúdo de sangue na microvasculatura do cólon mostrou-se aumentado nas fases mais precoces da carcinogênese colônica, tanto em roedores quanto em humanos de acordo com estudo de Wali *et al.* (2005).

Ao contrário da ciclooxigenase-1 (COX-1), a qual é uma enzima usualmente expressa em tecidos normais e envolvida em diversas funções celulares, a ciclooxigenase-2 (COX-2) é uma proteína expressa como resposta à presença de mediadores locais liberados em consequência de vários estímulos que fazem parte de uma resposta inflamatória. Diversos estudos demonstram que sua expressão nos tecidos colorretais é normalmente baixa e que sua superexpressão pode alterar o potencial tumorigênico das células intestinais (DuBOIS *et al.*, 1996). Além disso, a

COX-2 também está associada a fatores angiogênicos e formação de novos vasos no processo de carcinogênese (WU *et al.*; RAO *et al.*, 2004).

Hull *et al.* (1999) notaram um aumento da expressão de COX-2 na mucosa intestinal normal de ratos ApcMin/+ e Kishimoto *et al.* (2002) também demonstraram aumento da expressão de COX-2 já em 4 semanas após a primeira exposição ao carcinógeno azoxymetano em ratos normais. Foi relatado o aumento da expressão de COX-2 nos miofibroblastos subepiteliais intestinais em adenoma esporádico do cólon (ADEGBOYEGA *et al.*, 2004).

Apesar destes relatos, não há nenhum estudo com uma avaliação crítica da morfologia do estroma pericriptal colônico nas fases mais precoces da carcinogênese do cólon para um maior conhecimento. Além disso, é muito provável que as células do estroma pericriptal possam desempenhar algum papel no processo de fissão de criptas, o qual inicia-se assimetricamente em relação ao eixo da cripta (WRIGHT, 2000), por uma bifurcação na região basal seguida por uma divisão longitudinal até que existam duas criptas filhas. A fissão de criptas é estabelecida como um importante mecanismo de crescimento, regeneração (PARK *et al.*, 1997) e reparo intestinal (CHENG *et al.*, 1986). Há evidência crescente que a fissão de cripta também é um evento chave no crescimento de lesões neoplásicas. Um aumento relevante na fissão de criptas foi observado no intestino normal de humanos com FAP e em ratos com neoplasia intestinal múltipla (MIN) (WASSAN *et al.*, 1988).

Segundo Preston *et al.* (2003) a proporção de criptas em fissão no caso de adenomas é significativamente maior quando comparada à fissão envolvida no processo de desenvolvimento normal da mucosa.

Garcia *et al.* (1999) demonstraram que a fissão de criptas poderia explicar o espalhamento de clones mutantes no epitélio colônico em um processo chamado “field cancerization”. Recentemente, Greaves *et al.* (2006) demonstraram em relevantes experimentos que a fissão de criptas é o mecanismo pelo qual mutações se esparramam no cólon humano normal.

1.4 Focos de Criptas Aberrantes

Os focos de criptas aberrantes (FCA), inicialmente descritos por Bird (1987), são encontrados no cólon de ratos tratados com 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) de forma dose-dependente, e têm sido postulados como precursores do processo carcinogênico, sendo considerados lesões pré-neoplásicas, que se desenvolverão em câncer colorretal ao longo do tempo (BIRD, 1995; SHIVAPURKAR *et al.*, 1997).

Os estudos experimentais utilizando os FCA vêm sendo largamente empregados para detectar possíveis fatores que possam influenciar a carcinogênese colorretal nos seus estágios iniciais. Essas alterações relacionadas ao processo de transformação neoplásica podem ser caracterizadas, quantificadas e utilizadas como biomarcadores indicadores da provável progressão para câncer (McLELLAN *et al.*, 1991; THORUP *et al.*, 1994). As primeiras descrições dos FCA mencionaram a presença de hiperplasia estromal ao redor das criptas colônicas alteradas (BIRD, 1987).

Os FCA são facilmente visíveis em exames microscópicos do cólon corado com azul de metileno. Estas lesões pré-neoplásicas se caracterizam morfológicamente por apresentarem criptas com aberturas terminais alteradas, espessamento epitelial com células proeminentes e tamanho maior que as criptas

adjacentes (BIRD, 1987). Este tipo de lesão é também encontrada na mucosa colônica humana, com maior frequência em pacientes portadores de Polipose Familiar de Cólon (PRETLOW *et al.*, 1991).

Não se conhecem os mecanismos da transformação de FCA em neoplasias, mas sabe-se da existência de relação entre alterações de oncogenes e de mecanismos genéticos com a formação de FCA. Assim, por exemplo, mutações no gene K-ras e na proteína p53, envolvidos no desenvolvimento de câncer de cólon, estão associadas com o aumento do número de FCA por campo e desenvolvimento de tumores colônicos (SHIVAPURKAR *et al.*, 1997).

Após a constatação dos FCA, muitos estudos foram realizados para estimar o seu número, tamanho e distribuição no cólon de roedores submetidos à ação de carcinógenos (BIRD, 1987; PRETLOW *et al.*; HARDMAN *et al.*, 1991; PARK *et al.*, 1997). Graças a estes estudos, hoje é possível avaliar o papel de diversos nutrientes, drogas e outros fatores, individuais e ambientais, na predisposição ou proteção ao desenvolvimento do câncer de cólon intestinal.

1.5 Modelos Experimentais de Carcinogênese Colorretal.

O câncer de cólon e reto pode ser induzido em modelos experimentais utilizando-se carcinógenos químicos de ação direta (por exemplo, a N-metil-N-nitrosouréia ou NMU) ou indireta, como a DMH, que possui alto grau de especificidade para o cólon de variadas espécies de roedores (OLIVEIRA *et al.*, 2001) sendo dependente da dose, espécie, sexo e idade para exercer o seu efeito (McLELLAN & BIRD, 1988^a).

Estes modelos têm sido de grande importância em estudos sobre diversos aspectos da morfologia e patogênese da doença, contribuindo para o aperfeiçoamento do seu diagnóstico, prevenção e tratamento.

A DMH tem sido o carcinógeno colônico mais utilizado em estudos experimentais em razão de sua: (1) alta especificidade na indução de aberrações nucleares e de criptas aberrantes não afetando outros órgãos (McLELLAN & BIRD, 1988^b); (2) estabilidade química e (3) alta taxa de obtenção de tumores em um pequeno período de latência. Isto pode ser conseguido com uma única injeção de DMH ou com uma série semanal de injeções, desde que a dose total da droga injetada seja equivalente. O período de latência depende do tipo de lesão que se quer obter e da via de administração. A administração da DMH em ratos produz metabólitos ativos, os quais promovem a metilação do DNA das células epiteliais colônicas; substituição do grupo metil pelo grupo etil, gerando tumores após um período de latência (GREENE *et al.*, 1987; PORIES *et al.*, 1993).

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são: caracterização e análise de expressão de marcadores imunohistoquímicos (CD34, CD68, α -actina de músculo liso e COX-2) do tecido conjuntivo que circunda as criptas da mucosa do cólon de ratos Wistar, quando submetidos à ação de carcinógeno químico, pois não há nenhum estudo com uma avaliação crítica da morfologia do estroma pericriptal colônico nas fases mais precoces da carcinogênese do cólon.

3. Material & Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados 48 ratos, da linhagem Wistar, machos, pesando em média 250g no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo e, mantidos no Biotério do Departamento de Patologia, em gaiolas plásticas, em sala com controle de temperatura (entre 24 - 28°C) e ciclo de luz de 12 horas, com dieta padrão Purina® e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos segundo as normas da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP.

3.2 Delineamento Experimental

Como pode ser observado na **Figura 1**, após um período inicial de adaptação, os animais foram aleatoriamente divididos em seis grupos de oito animais cada. Cinco grupos receberam uma única injeção intra peritoneal de 125 mg/Kg de peso corporal de 1,2-Dimetilhidrazina (DMH) como descrito anteriormente (McLELLAN *et al.*, 1991). Estes animais foram então subdivididos em cinco grupos de acordo com o tempo de sacrifício (1, 2, 6, 12 e 24 semanas após receberem a injeção de carcinógeno) e denominados G1, G2, G6, G12 e G24, respectivamente. O ultimo grupo foi o grupo controle (GC). Este grupo recebeu uma injeção de salina e foi eutanaziado após 12 semanas. Os animais foram mortos pela aspiração de dióxido de carbono.

3.4 Coleta e Processamento do Material

Os ratos foram sacrificados por aspiração de dióxido de carbono e submetidos imediatamente ao procedimento de laparotomia mediana com cuidadoso isolamento e retirada do cólon distal. Os cólons foram abertos longitudinalmente, lavados cuidadosamente em salina e medidos com régua graduada em milímetros. Em seguida foram estendidos entre placas de papelão com a mucosa voltada para cima protegida com papel de seda e submersos em formalina tamponada a 10% por um período de 24 horas.

Os tecidos foram retirados da formalina, recortados e processados. As peças foram desidratadas por submersão em banho de álcool em concentrações crescentes. Posteriormente, para a diafanização das peças, as mesmas foram submersas em banho de xilol por duas horas e 30 minutos.

Em seguida as amostras foram incluídas em parafina fluida. Parte do cólon foi incluída horizontalmente com a mucosa voltada para baixo e parte verticalmente para obtenção de cortes longitudinais e transversais respectivamente. Os blocos foram cortados em micrótomo para obtenção de cortes com 5 µm de espessura e montados em lâmina.

A coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 3 minutos e a contra-coloração com solução de Eosina Floxina alcoólica por 10 segundos. Para posterior desidratação, a lâmina foi submersa em concentrações crescentes de álcool e em seguida diafanizadas em xilol que é o meio miscível do entelan (Merck & Co. Inc, USA) utilizado para montagem das lâminas.

3.5 Imunohistoquímica

As reações de imunohistoquímicas foram realizadas nos cortes histológicos de cólon através de reação antígeno-anticorpo seguida de revelação da reação com marcador visível ao microscópio. As lâminas desparafinadas e hidratadas foram recuperadas antigenicamente através de incubação em panela a vapor em meio tamponado por 40 minutos. Após resfriamento do material, as peroxidases teciduais endógenas foram removidas pela adição de peróxido de hidrogênio e ligações inespecíficas do anticorpo primário foram evitadas por adição de soro de cavalo. As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário (**Tabela 1.**) por 12 horas em câmara úmida. Em seguida, houve a incubação com anticorpo secundário e, por último, a etapa com avidina-biotina. A reação foi identificada após a revelação por tratamento com DAB (Sigma-Aldrich Inc., USA) por cinco minutos e contra coloração com Hematoxilina de Harris seguida de montagem das lâminas. As reações de imunohistoquímica foram avaliadas com microscopia de luz e a imunoreatividade foi considerada positiva quando foi detectada coloração no citoplasma das células. O índice de marcação foi determinado pela relação entre o número total de células e o número de células fortemente coradas ao longo de cada cripta. Foram contadas 10 criptas por corte, sendo um corte para cada animal.

Tabela 1. Características dos Anticorpos Primários

Anticorpo	Marca	Clone	Localização celular	Diluição
α -ASMA	Novocastra	RBC2/1B6	citoplasma	1:100
CD34	Novocastra	QBEnd/10	citoplasma e membrana celular	1:50
CD68	Novocastra	KP1	citoplasma	1:200
COX-2	Novocastra	4H12	citoplasma	1:100

3.6 Análise Morfométrica

Em cada corte histológico foi realizada a contagem celular, de todos marcadores, e a medida da área ocupada por estas células, com a utilização de um microscópio *Zeiss* equipado com uma ocular graduada em micrômetros ($0,5 \times 0,5$). Para tanto, foram observados em média dez campos microscópicos aleatórios e utilizados até dois blocos de diferentes segmentos distais do cólon para cada animal.

Primeiramente foram analisados, com baixa luminosidade em pequeno aumento, os cortes histológicos corados por H&E a fim de identificar áreas com intensa neovascularização ("hot-spots").

Nos cortes histológicos imuno-marcados com CD34, foram contados quatro "hot-spots" de vasos na mucosa colônica de aparência normal (NACM) e nos focos de estroma ativado (FEA) e calculadas as médias. A densidade dos microvasos foi quantificada nos "hot-spots" com a ocular graduada sob aumento de 200 vezes. Os vasos foram identificados baseados na presença de características endoteliais. Quatro áreas aleatórias adjacentes à margem e dentro dos FEA também foram avaliadas, sob aumento de 200 vezes, para se calcular a média da densidade dos microvasos. Cada cólon teve então duas contagens de densidade de microvasos: intra-FEA e no tecido adjacente. O mesmo procedimento foi usado para quantificar células ASMA, CD68 e COX-2 positivas.

O número de criptas filhas (CF), pares de criptas simétricas, também foi contado. Como proposto por Greaves *et al.* (2006), as CF foram interpretadas como criptas que sofreram recentemente o processo de fissão. O índice de fissão de criptas (CFi) foi subsequentemente estimado pelo número de criptas em fissão

somado ao número de CF em relação ao número total de criptas contado por campo microscópico. A análise foi executada por dois observadores independentes. Nenhum viés significativo foi encontrado.

3.7 Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Mann Whitney. Uma probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$) foi considerada estatisticamente significativa. Os resultados foram expressos em média $\pm$ DP. O software utilizado foi o *GraphPad Prism, USA*, v.4.0.

4. Resultados

4.1 Observações Gerais

Os animais não mostraram sinal clínico de deficiência nutricional durante o período experimental. Os pesos dos animais ao término do experimento estão resumidos na **Tabela 2**. Nenhum tumor foi observado na mucosa colônica dos ratos. No G24 somente três animais sobreviveram ao período experimental e, por isso, este grupo não foi incluído na análise estatística, tenham sido mostrados com base descritiva.

Tabela 2. Médias $\pm$ DP dos pesos (g) dos animais de todos grupos experimentais ao fim do experimento.

GC	G1	G2	G6	G12	G24
512,50 $\pm$	299,38 $\pm$	298,75 $\pm$	398,75 $\pm$	495,00 $\pm$	443,33 $\pm$
36,64	7,28	9,54	41,89	58,79	40,41

4.2 Características Histológicas e Análise Seqüencial dos FEA

Os Focos de Estroma Ativado (FEA) foram detectados nos ratos tratados com carcinógeno a partir do primeiro ponto (semana 1). Tanto a média do tamanho dos FEA quanto a média do número de células marcadas por área aumentaram com o tempo, sendo significante em 6 e 12 semanas ($p < 0,0001$) após o tratamento com carcinógeno (**Figuras 2 e 6**).

Tam:

Figura 2. Área de mucosa colônica ocupada por células CD34, CD68, COX-2 e ASMA positivas no “foco de estroma ativado”.

CD34: G6 < G12 ($p < 0.05$)

CD68: G1 = G2 = G6 < G12 ($p < 0.05$)

COX-2: G2 = G6 < G12 ($p < 0.05$)

* G24 não incluso na análise estatística.

O aumento da densidade celular foi observado assim como o espessamento do espaço extracelular (**Figura 3B**). Estas características não foram encontradas somente no foco inflamatório, onde normalmente são presentes, mas também na mucosa colônica normal. Frequentemente, mas não sempre, o epitélio cercado por FEA mostrou citoplasma basofílico e núcleos hiper cromáticos (**Figura 3C**) e também um número aumentado de criptas filhas (**Figura 3D**).

Figura 3.* Mucosa colônica corada por H&E.

Mucosa colônica com aparência normal (A) com vasos sanguíneos delicados (seta) e pequeno número de células estromais. Foco de Estroma Ativado (B, C, D). Grandes vasos sanguíneos (seta) na Figura B e o limite da mucosa normal e FEA na Figura C (*). (A e B = 400X; C e D = 200X)

O CFi foi maior no FEA do que no tecido normal e aumentou com tempo sendo significativo em 12 semanas ($P < 0,0001$) (**Figura 4**) assim como a densidade microvascular (MVD) sendo significativo em 6 e 12 semanas ($P < 0,0001$) ambos após o tratamento com DMH (**Figura 5**).

Figura 4. Índice de Fissão de Criptas na mucosa de aparência normal (barras brancas) e no “foco de estroma ativado” (barras pretas).

N: C = G1 = G2 = G6 = G12 ($p < 0,05$)

FEA: G6 < G12 ($p < 0,05$)

* G24 não incluso na análise estatística.

Figura 5. Área de mucosa colônica ocupada por vasos sanguíneos no estroma de aparência normal (barras brancas) e no FEA (barras pretas).

N: C = G1 = G2 = G6 = G12 ($p < 0,05$)

FEA: G6 < G12 ($p < 0,05$)

* G24 não incluso na análise estatística.

Os resultados da contagem de células imuno-marcadas, CFI e MVD do estroma de aparência normal e dos FEA foram resumidos na **Figuras 6 e 7** e representados nas **Figuras 8 e 9**. No cólon normal, um pequeno número de miofibroblastos e células estromais CD68 positivas foram encontradas em pequenos focos de inflamação da mucosa (**Figura 8A**). Nos animais tratados com carcinógeno o número dessas células aumentou com tempo (**Figura 8B**), assim como as células CD34 positivas que exibiram um "platô" na 6ª semana após o tratamento com DMH.

Nos animais controles as células ASMA positivas mostraram-se organizadas como uma malha cercando as criptas colônicas (**Figura 9A**). Nos FEA dos animais do G12, foi observado um aumento no número de células ASMA positivas embora com aparente desorganização, enquanto no grupo G24 a maioria destas células foi encontrada em focos bastante desorganizados (**Figura 9B**).

Na mucosa colônica normal, a expressão de COX-2 foi descoberta em macrófagos e células endoteliais da lâmina própria em todos os animais (**Figura 9C**). A expressão de COX-2 também aumentou notadamente nas células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos nos grupos G6, G12 e G24 (**Figura 9D**). Além disso, algumas células epiteliais passaram a expressar COX-2 (**Figura 9D**).

Figura 6. Número de células ASMA (A), CD34 (B), CD68 (C) e COX-2 (D) positivas; MVD (E) e CF1 (F) no estroma de aparência normal (N) e no FEA.

ASMA (A): G6 < G12 ($p < 0,05$)
 CD34 (B): G6 < G12 ($p < 0,05$)
 CD68 (C): G1 < G2 < G6 < G12 ($p < 0,05$)
 COX-2 (D): G2 < G6 < G12 ($p < 0,05$)
 MVD (E): G6 < G12 ($p < 0,05$)
 CFi (F): G6 < G12 ($p < 0,05$)

No estroma de aparência normal não houve diferença estatística significativa para todos marcadores

* G24 não incluso em nenhuma análise estatística.

A

C

D

E

F

Figura 7. Evolução das imuno-marcações (ASMA, CD34, CD68 e COX-2), densidade microvascular (MVD) e Fissão de Criptas nos Focos de Estroma Ativado.

Figura 8. Imunohistoquímica para CD34 e CD68 da mucosa colônica (200X). A – imuno-marcação CD34 na mucosa colônica de aparência normal com delicados vasos sanguíneos (seta); B - imuno-marcação CD34 no “Foco de Estroma Ativado” com grandes vasos sanguíneos (seta); C - imuno-marcação CD68 na mucosa colônica de aparência normal com pequeno número de células positivas (seta); D - imuno-marcação CD68 no “Foco de Estroma Ativado” com maior número de células positivas.

Figura 9. Imunohistoquímica para ASMA (200X) e COX-2 da mucosa colônica (400X). A – imuno-marcação ASMA na mucosa colônica de aparência normal com pequeno número de células positivas (seta); B - imuno-marcação ASMA no “Foco de Estroma Ativado” com grande número de células positivas (seta); C – imuno-marcação COX-2 na mucosa colônica de aparência normal com pequeno número de células positivas (seta); D - imuno-marcação de um grande número de células COX-2 positivas no “Foco de Estroma Ativado” e nas criptas (setas).

Figura 9. Imunohistoquímica para ASMA (200X) e COX-2 da mucosa colônica (400X). A – imuno-marcação ASMA na mucosa colônica de aparência normal com pequeno número de células positivas (seta); B - imuno-marcação ASMA no “Foco de Estroma Ativado” com grande número de células positivas (seta); C – imuno-marcação COX-2 na mucosa colônica de aparência normal com pequeno número de células positivas (seta); D - imuno-marcação de um grande número de células COX-2 positivas no “Foco de Estroma Ativado” e nas criptas (setas).

5. Discussão

No presente estudo foram identificados "Focos de Estroma Ativado" (FEA) ao redor das criptas nos animais tratados com carcinógeno. Estes FEA diferem dos focos inflamatórios esporádicos encontrados na mucosa normal dos animais controles devido ao aumento da MVD, CFI e imuno-expressão de células CD34, CD68, ASMA e COX-2 positivas.

Houve um aumento no tamanho dos FEA com tempo. Em geral, o FEA teve um aumento progressivo e gradual na MVD e o número de células positivas para expressão de COX-2, CD34, CD68 e ASMA. Um aumento gradual na MVD também foi observado durante a transição de displasia de baixo grau para displasia de alto grau e para o câncer de cólon por AOTAKE *et al.* (1999).

Entre os numerosos anticorpos primários endotélio-específicos disponíveis destaca-se o anti-CD 34. O CD34 é uma glicoproteína transmembrana de 110 kDa (VAN de RIJN *et al.*, 1994). O número de células CD34 positivas no FEA alcançou um platô no grupo G6. De maneira interessante, Nakayama *et al.* (2000) notaram positividade para CD34 aumentada em adenomas e virtualmente ausente em adenocarcinomas de cólon. Os autores propuseram que é possível que células estromais CD34 positivas se transformem em miofibroblastos no estroma de adenocarcinomas. Sendo assim, é plausível que eventual transformação pudesse explicar a estabilização do número de células estromais CD34 positivas neste trabalho.

Os FEA freqüentemente circundaram com forma e tamanho heterogêneo as criptas colônicas, apresentando aumento no CFI e freqüente hiper Cromasia nuclear nas células epiteliais. Estes achados sugerem que as células epiteliais podem ter

perdido o controle homeostático e a coincidente presença de alterações estromais pode sugerir algum papel na carcinogênese. Estes achados são novos embora consistentes com observações prévias que o estroma tem um papel significativo na carcinogênese.

Cada vez mais, novas evidências indicam que diversos fenômenos biológicos dependem da ação combinada de células epiteliais e estromais. Isto é particularmente evidente durante o desenvolvimento de processos patológicos (DESMOULIERE *et al.*, 2004). A importância das células estromais e os fatores que elas expressam durante iniciação e progressão do câncer foi destacada em recente literatura. É bem conhecido o papel de suporte na carcinogênese dos componentes celulares estromais dos tecidos epiteliais.

Sabe-se que as mutações iniciais de um tumor se originam nas células epiteliais, embora alguns modelos experimentais apontem que as mutações nos fibroblastos estromais também possam iniciar tumores epiteliais por alterações de fatores de crescimento parácrino que atuam nos epitélios (BHOWMICK & MOSES, 2005). Interessantemente Okada *et al.* (2000) demonstraram que o estroma associado à inflamação promoveu a conversão de células de adenoma colônicos para células de adenocarcinoma. Além disso, a alteração no microambiente estromal foi mostrada suficientemente capaz de promover a transformação maligna de células epiteliais prostáticas humanas (CUNHA *et al.*, 2002).

O presente estudo demonstrou expressão aumentada de células ASMA e CD68 positivas nos FEA nos animais tratados com carcinógeno comparados aos animais controles. No FEA, as células CD68 positivas mostraram-se aumentadas precocemente (1 semana) enquanto as células ASMA positivas foram as de aparecimento mais tardio (12 semanas). Miofibroblastos ASMA positivos já foram

observados aumentados em lesões pré-neoplásicas do cólon (HIGAKI *et al.*, 1999) e sabe-se que macrófagos CD68 positivos estão aumentados no câncer de cólon. Miofibroblastos e macrófagos podem expressar grandes quantidades de COX-2 no câncer de cólon e isto pode estimular a angiogênese (SHEEHAN *et al.*, 2005).

Um mecanismo importante pelo qual o estroma influencia a carcinogênese é a expressão da enzima COX-2. Esta proteína é freqüentemente indetectável em tecidos normais, mas é induzida por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, espécies reativas de oxigênio e promotores tumorais. É bem conhecido que a superexpressão de COX-2 está associada à tumorigênese no epitélio gastrointestinal ativando a angiogênese e agindo diretamente nas células epiteliais.

Nosso estudo verificou um aumento gradual da expressão de células COX-2 positivas no FEA a partir da segunda semana após exposição ao carcinógeno. De maneira interessante, experimentos envolvendo deleção genética ou inibição farmacológica da COX-2 demonstraram que esta enzima representa um papel importante na tumorigênese intestinal (OSHIMA *et al.* 1996; JACOBY *et al.*, 2000).

BOOLBOL *et al.* (1996) notaram que a proteína COX-2 e os níveis de Prostaglandina E2 estavam elevados na mucosa normal de animais heterozigotos, em comparação com a mucosa de ratos sem alteração gênica para a FAP. Em outra pesquisa com camundongos *knockout*, heterozigotos para APC e heterozigotos ou homozigotos para COX-2, foi demonstrada expressão diminuída para COX-2. Os animais desenvolveram menos pólipos intestinais e colônicos comparados aos animais controles, sendo que os homozigotos para o *knockout* de COX-2 apresentaram um decréscimo de 86% em comparação aos controles. Adicionalmente, todos os pólipos eram significativamente menores como um resultado da redução da COX-2. Por sua vez, quando os animais heterozigotos

para APC, mas apresentando COX-2 normal, foram tratados com um inibidor específico da atividade enzimática de COX-2, apresentaram 50 a 60% de redução no número de pólipos (OSHIMA *et al.* 1996). Esses estudos concluíram que a COX-2 apresenta um impacto direto no desenvolvimento de pólipos colônicos e cânceres.

Está estabelecido que a expressão do gene COX-2 é “*up-regulated*” nos cânceres colorrectais humanos, e os níveis de COX-2 também são elevados nos tumores colônicos induzidos por carcinógeno químico em roedores (DuBOIS *et al.*, 1996). Há forte evidência que a COX-2 é “*down-regulated*” pelo APC e é “*up-regulated*” pelo acúmulo nuclear de β -catenina, o que adicionalmente implica a via de transdução de sinal *Wnt* na carcinogênese do cólon e do fígado (ARAKI *et al.*, 2003). Conforme relato de KISHIMOTO *et al.* (2003), o carcinógeno AOM causa um aumento na COX-2 e uma diminuição na expressão de mRNA do APC em mucosa colônica de aparência normal em ratos.

A partir das considerações encontradas na literatura e dos resultados deste trabalho, as seguintes hipóteses são propostas para explicar a relação epitélio-estroma na carcinogênese colônica:

(1) mutações simultâneas no epitélio e nas células estromais poderiam acontecer e isto facilitaria a transformação neoplásica do epitélio.

(2) mutações nas células epiteliais poderiam induzir o aparecimento dos FEA, por sinalização molecular, o que pode ter alterado o estroma facilitando a transformação neoplásica epitelial.

(3) mutações nas células estromais ou em seus precursores poderiam influenciar o epitélio e assim prejudicar seus mecanismos de regulação o que iniciaria a carcinogênese epitelial.

Finalizando, pode-se considerar que estas três hipóteses são plausíveis e que necessitam de investigações adicionais através de outros experimentos para confirmação e ampliação dos resultados aqui apresentados. Tendo em vista a complexidade da carcinogênese colônica, o estudo dos mecanismos envolvidos na formação e crescimento dos FEA pode elucidar a natureza da interação entre epitélio e estroma.

1. Conclusão

Nas condições em que esta investigação foi realizada pode-se concluir que:

1. Nos animais tratados com carcinógeno químico foram identificados grupos de células estromais, ao redor das criptas do cólon, que apresentavam aumento da MVD, FCI e imuno-expressão de CD34, CD68, ASMA e/ou COX-2.

2. Estes grupos de células foram denominados "Focos de Estroma Ativado" (FEA).

3. Estudos mais detalhados sobre a formação e evolução dos FEA podem ser úteis para compreensão do papel do estroma na carcinogênese do cólon.

7. Referências

ADEGBOYEGA, P.A.; OLOLADE, O.; SAADA, J.; MIFFLIN, R.; DI MARI, J.F.; POWELL, D.W. Subepithelial myofibroblasts express cyclooxygenase-2 in colorectal tubular adenomas. **Clin Cancer Res.**, v.10, n.17, p.5870-5879, 2004.

AOTAKE, T.; LU, C.D.; CHIBA, Y.; MURAOKA, R.; TANIGAWA, N. Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis. **Clin Cancer Res.**, v.5, n.1, p.135-142, 1999.

ARAKI, Y.; OKAMURA, S.; HUSSAIN, S.P.; NAGASHIMA, M.; HE, P.; SHISEKI, M.; MIURA, K.; HARRIS, C.C. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways. **Cancer Res.**, v.63, n.3, p.728-734, 2003.

BALKWILL, F. & MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v.357, p.539–545, 2001.

BANNASCH, P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I Hepatic preneoplasia. **Carcinogenesis**, v.7, n.5, p.689-695, 1986.

BERENBLUM, I. & SHUBIK, P. A new quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. **Br. J. Cancer**, v.1, p.383-391, 1947.

BIRD, R.P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letters**, v.37, p.147–151, 1987.

BIRD, R.P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Letters**, v.93, p.55–71, 1995.

BHOWMICK, N.A. & MOSES, H.L. Tumor-stroma interactions. **Curr Opin Genet Dev.**, v.15, n.1, p.97-101, 2005.

BOOLBOL, S.K.; DANNENBERG, A.J.; CHADBURN, A.; MARTUCCI, C.; GUO, X.J.; RAMONETTI, J.T.; ABREU-GORIS, M.; NEWMARK, H.L.; LIPKIN, M.L.; DECOSSE, J.J.; BERTAGNOLLI, M.M. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. **Cancer Research**, v.56, n.11, p.2556-2560, 1996.

BOIVIN, G.P.; WASHINGTON, K.; YANG, K.; WARD, J.M.; PRETLOW, T.P.; RUSSELL, R.; BESSELSSEN, D.G.; GODFREY, V.L.; DOETSCHMAN, T.; DOVE, W.F.; PITOT, H.C.; HALBERG, R.B.; ITZKOWITZ, S.H.; GRODEN, J.; COFFEY, R.J. Pathology of mouse models of intestinal cancer: Consensus report and recommendations. **Gastroenterology**, v.124, p.762-777, 2003.

CHENG, H.; BJERKNES, M.; AMAR, J.; GARDINER, G. crypt production in normal and diseased human colonic epithelium. **The Anatomical Record**, V.216, P.44-48, 1986.

COTTI, G.C.C.; SANTOS, F.P.S; SEBASTIANES, F.M.; HABR-GAMA, A.; SEID, V.E.; MARTINO, R.B. Genética do câncer. **Ver. Méd.**, v.79 (2/4), p.45-64, 2000.

COUSSENS, L.M. & WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v.420, p.860–867, 2002.

CUNHA, G.R.; HAYWARD, S.W; WANG, Y.Z. Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. **Differentiation**, v.70, n.9-10, p.473-485, 2002.

Datasus. Ministério da Saúde. Governo Federal. Brasil. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em 05/06/2005.

DESMOULIERE, A.; GUYOT, C.; GABBIANI, G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. **Int J Dev Biol.**, v.48, n.5-6, p.509-517, 2004.

DeWEVER, O. & MAREEL, M. Role of myofibroblasts at the invasion front. **Biol Chem**, v.383, p.55–67 2002.

DICKINSON, A.J.; FOX, S.B.; PERSAD, R.A.; HOLLYER, J.; SIBLEY, G.N.A.; HARRIS, A.L. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. **Br J Urol.**, v.74, p.762-766, 1994.

DONJACOUR, A.A. & CUNHA, G.R. Stromal regulation of epithelial function. **Cancer Treat Res.**, v.53, p.335-364, 1991.

DRAGAN, Y.P., SARGENT, L., XU, Y.D., XU, Y.H., PITOT, H.C. The initiation-promotion-progression model of rat hepatocarcinogenesis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v.202, n.1, p.16-24, 1993.

DuBOIS, R.N.; RADHIKA, A.; REDDY, B.S.; ENTINGH, A.J. Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. **Gastroenterology**, v.110, n.4, p.1259-1262, 1996.

DVORAK, HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **N Engl J Med.**, v.315, p.1650–1659, 1986.

EVAN, G. & LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. **Science**, v.281, n.5381, p.1317-1322, 1998.

FEARON, E.R. & VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v.61, n.5, p.759-767, 1990.

FOLKMAN, J. Clinical applications of research on angiogenesis. **N Engl J Med.**, v.333, p.1757-1763, 1995.

GABBIANI, G.; RYAN, G.B.; MAJNE, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**, v.27, p.549–550, 1971.

GARCIA, S.B.; PARK, H.S.; NOVELLI, M.; WRIGHT, N.A. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. **J Pathol.**, v.187, n.1, p.61-81, 1999.

GREAVES, L.C.; PRESTON, S.L.; TADROUS, P.J.; TAYLOR, R.W.; BARRON, M.J.; OUKRIF, D.; LEEDHAM, S.J.; DEHERAGODA, M.; SASIENI, P.; NOVELLI, M.R.; JANKOWSKI, J.A.; TURNBULL, D.M.; WRIGHT, N.A.; MCDONALD, S.A. Mitochondrial DNA mutations are established in human colonic stem cells, and mutated clones expand by crypt fission. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.103, n.3, p.714-719, 2006.

GREENE, F.L.; Lamb, I.S.; BARWICK, M. Colorectal cancer in animal models - a review. **J Surg Res.**, v.43, n.5, p.476-487, 1987.

[GRUPP, C.](#); [LOTTERMOSER, J.](#); [COHEN, D.I.](#); [BEGHER, M.](#); [FRANZ, H.E.](#); [MULLER, G.A.](#) Transformation of rat inner medullary fibroblasts to myofibroblasts in vitro. **Kidney Int.**, v. 52, p.1279–1290, 1997.

HAHN, W.C. & WEINBERG, R.A. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nat Rev Cancer**, v.2, p.331–341, 2002.

HARDMAN, W.E.; CAMERON, I.L.; HEITMAN, D.W.; CONTRERAS, E. Demonstration of the need for end point validation of putative biomarkers: failure of aberrant crypt foci to predict colon cancer incidence. **Cancer Research**, v.51, p.6388-6391, 1991.

HEMMINK, K. DNA adducts, mutations and câncer. **Carcinogenesis**, New York, v.14, p. 2007-2012, 1993.

HIGAKI, S.; TADA, M.; NISHIAKI, M.; MITANI, M.; YANAI, H.; OKITA, K. Immunohistological study to determine the presence of pericryptal myofibroblasts and basement membrane in colorectal epithelial tumors. **J Gastroenterol.**, v.34, n.2, p.215-220, 1999.

HOWLETT, A.R. & BISSELL, M.J. The influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. **Epithelial Cell Biol.**, v.2, p.79–89, 1993.

HULL, M.A.; BOOTH, J.K.; TISBURY, A.; SCOTT, N.; BONIFER, C.; MARKHAM, A.F.; COLETTA, P.L. Cyclooxygenase 2 is up-regulated and localized to macrophages in the intestine of Min mice. **Br J Cancer**, v.79, n.9-10, p.1399-1405, 1999.

INCA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 12/06/06.

JACOBY, R.F.; SEIBERT, K.; COLE, C.E.; KELLOFF, G.; LUBET, R.A. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the Min mouse model of adenomatous polyposis. **Cancer Res.**, v.60, p.5040-5044, 2000.

KIARIS, H.; CHATZISTAMOU, I., KAOFOUTIS, C.H.; KOUTSELINI, H., PIPERICH, KALOFOUTIS A. Tumour-stroma interactions in carcinogenesis: basic aspects and perspectives. **Mol Cell Biochem.**, v.261, n.1-2, p.117-122, 2004.

KISHIMOTO, Y.; YASHIMA, K.; MORISAWA, T.; SHIOTA, G.; KAWASAKI, H.; HASEGAWA, J. Effects of cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 on APC and c-myc expression in rat colon carcinogenesis induced by azoxymethane. **J Gastroenterol.**, v.37, n.3, p.186-193, 2002.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Human & Experimental Toxicology**, v.19, p. 543-555, 2000.

LIOTTA, L.A.; KLEINERMAN, J.; SAIDEL, G.M. Quantitative relationship of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastasis following tumor implantation. **Cancer Research**, v.34, p.997-1004, 1974.

LIOTTA, L.A.; KLEINERMAN, J.; SAIDEL GM. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. **Cancer Research**, v.36, p.889-894, 1976.

MAHFOUZ, S.M.; CHEVALLIER, M.; GRIMAUD, J.A. Distribution of the major connective matrix components of the stromal reaction in breast carcinoma. An immunohistochemical study. **Cell Mol Biol**, v.33, p.453–467, 1987.

McLELLAN, E.A.; MEDLINE, A.; BIRD, R. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions in rat colon. **Carcinogenesis**, v.12, p.2093–2098, 1991.

McLELLAN, E.A. & BIRD, R.P. Specificity study to evaluated induction aberrant crypts in murine colons. **Cancer Research**, v.48, p. 6183-6186, 1988a.

McLELLAN, E.A. & BIRD, R.P. Aberrant cryots: potential pre-neoplastic lesions in murine colon. **Cancer Research**, v.48, p. 6187-6192, 1988b.

MOOLGAVKAR, S.H. Carcinogenesis modeling: from molecular biology to epidermiology. **Annu. Rev. Public. Health**, v.7, p.151-169, 1986.

MORSON, B.C. Evolution of câncer of the colon and rectum. **Cancer**, v.34, 9.845-849, 1974.

MOTTRAM, J.C. A developing factor in experimental glastogenesis. **J. athol. Bacteriol.**, v.56, p.181-187, 1994.

MUELLER, M.M. & FUSENIG, N.E. (2002) Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. **Differentiation**, v.70, n.9-10, p.486-497, 2002.

OKADA, F.; KAWAGUCHI, T.; HABELHAH, H.; KOBAYASHI, T.; TAZAWA, H.; TAKEICHI, N.; KITAGAWA, T.; HOSOKAWA, M. Conversion of human colonic adenoma cells to adenocarcinoma cells through inflammation in nude mice. **Lab Invest.**, v.80, n.11, p.1617-1628, 2000.

OLIVEIRA, E.C., LEITE, M.S.B., MIRANDA, J.A.R., ANDRADE, A.L.S.M; GARCIA, S.B., LUQUETTI, A.O. and MOREIRA, H. Chronic *Trypanossoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Carcinogenesis**, v.22, p. 737-740, 2001.

OSHIMA, M.; DINCHUK, J.E.; KARGMAN, S.L.; OSHIMA, H.; HANCOCK, B.; KWONG, E.; TRZASKOS, J.M.; EVANS, J.F.; TAKETO, M.M. Suppression of intestinal polyposis in Apc Δ 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell**, v.87, p.803-809, 1996.

PARK, H.S.; GOODLAD, R.A.; WRIGHT, N.A. The incidence of aberrant crypt foci and colonic carcinoma in dimethylhydrazine-treated rats varies in a site-specific manner and depends on tumor histology. **Cancer Research**, v.57, p.4507-4510, 1997.

PARK, H.S.; GOODLAD, R.A.; AHNEN, D.J.; WINNETT, A.; SASIENI, P.; LEE, C.Y.; WRIGHT, N.A. Effects of epidermal growth factor and dimethylhydrazine on crypt size, cell proliferation and crypt fission in the rat colon. **American Journal of Pathology**, v.151, n.3, p.843-852, 1997.

PARKIN, D.M. International variation. **Oncogene**, v.23, p.6329-6340, 2004.

PITOT, H.C. & DRAGAN, Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **FASEB J.**, v.5, n.9, p. 2280-2286, 1991.

PORIES, S.E.; RAMCHURREN, N.; SUMMERHAYES, I.; STEELE., G. Animal models for colon carcinogenesis. **Arch. Surg.**, v.128, p.647- 653, 1993.

POTTER, J.D. Nutrition and colorectal cancer. **Cancer Causes and Control**, v.7, p.127-146, 1996.

[POWELL, D.W.; MIFFLIN, R.C.; VALENTICH, J.D.; CROWE, S.E.; SAADA, J.I.; WEST, A.B.](#) Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. **Am J Physiol**, v.277, p.C1–9, 1999.

PRESTON, S.L.; WONG, W.M.; CHAN, A.O.; POULSOM, R.; JEFFERY, R.; GOODLAD, R.; MANDIR, N.; ELIA, G.; NOVELLI, M.; BODMER, W.F.; TOMLINSON, I.A.; WRIGHT, N.A. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. **Cancer Research**, v.63, p.3819-3825, 2003.

PRETLOW, T.P.; BARROW, B.J.; ASHTON, W.S.; O'RIORDAN, M.A.; PRETLOW, T.G.; JURCISEK, J.A.; STELLATO, T.A. Aberrant Crypts: Putative Preneoplastic Foci in Human Colonic Mucosa. **Cancer Research**, v.51, p.1564-1567, 1991.

RAO, M.; YANG, W.; SEIFALIAN, A.M.; WINSLET, M.C. Role of cyclooxygenase-2 in the angiogenesis of colorectal cancer. **Int J Colorectal Dis.**, v.19, n.1, p.1-11, 2004.

RONNOV-JESSEN, L.; PETERSEN, O.W.; BISSELL, MJ Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: Importance of the stromal reaction. **Physiol Rev.**, v.76 p. 69–125, 1996.

ROUS, P. & KIDD, J.G. Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states: a study of tar tumors in rabbits. **J. Exp. Med.**, v.73, p.369-390, 1941.

SAIKALI, J.; PICARD, C.; FREITAS, M.; HOLT, P. Fermented milks probiotics cultures and colon cancer. **Nutrition Cancer**, v.49, p. 14-24, 2004.

SAPPINO, A.P.; SCHURCH, W.; GABBIANI, G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: Expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. **Lab Invest.**, v.63, p.144–161, 1990.

SAPPINO, A.P.; SKALLI, O.; JACKSON, B.; SCHURCH, W.; GABBIANI, G. Smoothmuscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. **Int J Cancer**, v.41, p.707–712, 1988.

SCHURCH, W.; SEEMAYER, T.A.; LAGACE, R. Stromal myofibroblasts in primary invasive and metastatic carcinomas. A combined immunological, light and electron microscopic study. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v.391, p.125–139, 1981.

SCHÜRCH, W. The myofibroblast in neoplasia. **Curr Top Pathol.**, v.93, p.135–148, 1999.

SERINI, G. & GABBIANI, G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. **Exp Cell Res.**, v.250, p.273–283, 1999.

SHEEHAN, K.M.; STEELE, C.; SHEAHAN, K.; O'GRADY, A.; LEADER, M.B.; MURRAY, F.E.; KAY, E.W. Association between cyclooxygenase-2-expressing macrophages, ulceration and microvessel density in colorectal cancer. **Histopathology**, v.46, p.287–295, 2005.

SHIVAPURKAR, N.; HUANG, L.; SWALSKY, P.A.; BAKKER, A.; FINKELSTEIN, S.; FROST, A.; SILVERBERG, S. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. **Cancer Letters**, v.115, p.39-46, 1997.

THORUP, I.; MEYER, O.; KRISTIANSEN, E. Influence of a dietary fiber on development of dimethylhydrazine-induced aberrant crypt foci and colon tumor incidence in Wistar rats. **Nutr. Cancer**, v.21, p.177–182, 1994.

[TUXHORN, J.A.](#); [AYALA, G.E.](#); [SMITH, M.J.](#); [SMITH, V.C.](#); [DANG, T.D.](#); [ROWLEY, D.R.](#) Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. **Clin Cancer Res.**, v.8, p.2912–2923, 2002.

VAN de RIJN, M.; HENDRICKSON, M.R.; ROUSE, R.V. CD34 expression by gastrointestinal tract stromal tumors. **Hum Pathol.**, v.25, n.8, p.766-771, 1994.

VENITT, S. Mechanism of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer. **Clin. Chem.**, v.40, n.7, p.1421-1425, 1994.

WALI, R.K.; ROY, H.K.; KIM, Y.L.; LIU, Y.; KOETSIER, J.L.; KUNTE, D.P.; GOLDBERG, M.J.; TURZHITSKY, V.; BACKMAN, V. Increased microvascular blood content is an early event in colon carcinogenesis. **Gut**, v.54, n.5, p.654-660, 2005.

WASSAN, H.S.; PARK, H.S.; LIU, K.C.; MANDIR, N.K.; WINNETT, A.; SASIENI, P.; BODMER, W.F.; GOODLAD, R.A.; WRIGHT, N.A. APC in the regulation of intestinal crypt fission. **J Pathol.**, v.185, p.246-255, 1998.

WILLIAMS, N.S. Colorectal cancer: epidemiology, etiology, pathology, clinical features and diagnosis. In: KEIGHLEY, M.R.B. WILLIAMS, NS. Surgery of the anus, rectum and colon. London, WB. Saunders, p.831-885, 1993.

WRIGHT, N.A. Intestinal stem-cell repertoire: from normal gut development to the origins of colonic cancer. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.81, n.2, p.117-143, 2000.

WU, A.W.; GU, J.; LI, Z.F.; JI, J.F.; XU, G.W. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. **World J Gastroenterol.**, v. 10, n.16, p.2323-2326, 2004.

8. Anexos

8.1 Contagem de células imuno-marcadas

ASMA			
	média ± DP		n
	N	FEA	N-FEA
GC	76,250 ± 35,317		8
G1	69,625 ± 19,899		8
G2	65,625 ± 17,840		8
G6	72,000 ± 16,300		8
G12	67,625 ± 19,078	218,000 ± 48,270	8
G24	100,000 ± 11,135	403,667 ± 53,631	3

CD34			
	média ± DP		n
	N	FEA	N-FEA
GC	38,750 ± 5,650		8
G1	25,625 ± 8,484		8
G2	26,750 ± 9,467		8
G6	34,250 ± 10,687	52,250 ± 9,558	8
G12	33,625 ± 11,438	78,250 ± 17,119	8
G24	43,000 ± 11,148	73,000 ± 3,605	3

CD68			
	média ± DP		n
	N	FEA	N-FEA
GC	50,500 ± 9,574		8
G1	50,875 ± 20,615	95,500 ± 11,589	8
G2	50,750 ± 20,865	96,375 ± 10,716	8
G6	42,000 ± 10,474	111,125 ± 10,453	8
G12	35,500 ± 10,636	156,125 ± 35,686	8
G24	58,333 ± 18,230	190,667 ± 13,868	3

COX-2			
	média ± DP		n
	N	FEA	N-FEA
GC	1,625 ± 1,407		8
G1	2,125 ± 2,295		8
G2	0,500 ± 0,755	7,750 ± 3,058	8
G6	2,500 ± 2,000	12,625 ± 2,503	8
G12	2,000 ± 2,000	13,250 ± 1,488	8
G24	3,000 ± 1,000	20,667 ± 1,527	3

8.2 Índice de Fissão de Criptas

CFi	média ± DP			n
	N	FEA	N-ASF	
GC	0,225 ± 0,104			8
G1	0,213 ± 0,099			8
G2	0,200 ± 0,110			8
G6	0,200 ± 0,106	0,538 ± 0,150		8
G12	0,213 ± 0,064	0,913 ± 0,099		8
G24	0,267 ± 0,208	1,300 ± 0,400		3

8.3 Densidade Microvascular

MVD	média ± DP			n
	N	ASF	N-ASF	
GC	4,000 ± 2,203			8
G1	2,250 ± 1,488			8
G2	2,250 ± 1,581			8
G6	5,125 ± 2,232	10,000 ± 3,703		8
G12	5,625 ± 2,133	17,375 ± 3,502		8
G24	6,666 ± 2,516	38,000 ± 3,502		3

8.4 % da Área Estromal ocupada pelas células imuno-marcadas

média ± DP				
	ASMA	CD34	CD68	COX-2
G1			1,50 ± 2,070	
G2			2,25 ± 2,604	2,500 ± 1,603
G6		4,825 ± 3,355	6,50 ± 2,764	4,250 ± 2,251
G12	16,50 ± 5,496	16,50 ± 5,496	6,00 ± 5,042	10,50 ± 2,725
G24	28,33 ± 6,658	25,00 ± 6,557	36,33 ± 2,081	15,00 ± 3,000