

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



TESI DOCTORAL

MARCADORS DE LA VIA SERRADA DEL CÀNCER COLORECTAL A LA MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL

Doctoranda:

Míriam Gené Hijós

Directores:

Eva Musulén Palet

María Salomé Martínez González

Tutor:

Joan Carles Ferreres Piñas

Programa de Doctorat en Cirurgia i Ciències Morfològiques

Departament de Ciències Morfològiques

Universitat Autònoma de Barcelona, 2025

A tu,

Al Seny i a la Rauxa,

Recordant-me el sentit de ser-hi dins del constant “sensesentit”.

“La joventut d’un ser no es mesura pels anys que té,
sinó per la curiositat que alberga”.

Salvador Pániker

AGRAÏMENTS

A la Marina, l'Anna i la Laura, que feien funcionar les màquines per mi, amb una dedicació que no els hi podré agrair mai. Elles m'ho van fer més fàcil. Gràcies i mil gràcies.

A l'Eva, la Montse i la Sandra, que van continuar la feina iniciada, però ja des de casa.

A l'Eva Musulén per mostrar-me el camí de la investigació, ensenyar-me la importància del rigor, de la feina ben feta, i acompanyar-me en aquest recorregut, llarg...però del que he après molt.

A la Salomé Martínez, per la confiança que m'ha atorgat, no només en aquest treball, sinó en altres àmbits.

Al Javi, pels seus consells, sàvies aportacions i experiència, pel seu temps i esforç dedicat. Una, y no más!

A la Padrina, sempre una inspiració, una guia.

Al meu pare, del que he après a fer les coses amb esforç i il·lusió. A la meva mare, que a banda d'esforç i dedicació hi posa amor. A la Laura, el meu Yang, l'equilibri perfecte.

I al Josep, per animar-me a començar aquest camí, i acompanyar-me, tot i que ha sigut més llarg del que esperàvem, i ple de petits reptes externs que tampoc esperàvem. Gràcies pel teu suport i paciència. I al Marcel i al Francesc, per entendre les estones de temps robades, per respectar-ho, recolzar-me i transmetre'm el seu ànim i entusiasme.

ABREVIACIONS

AST: Adenoma serrat tradicional

AT: Adenoma tubular

ATV: Adenoma tubulovellós

AV: Adenoma vellós

CaMII: Carcinoma colorectal associat a malaltia inflammatòria intestinal

CCR: Càncer colorectal

CCRnMII: Càncer colorectal no associat a malaltia inflammatòria intestinal.

CIMP: Fenotip de perfil metilador

CIMP-H: Fenotip de perfil metilador alt

CIMP-L: Fenotip de perfil metilador baix

CIN: Inestabilitat cromosòmica.

CU: Colitis ulcerosa

DAG: Displàsia d'alt grau.

DBG: Displàsia de baix grau

DC: Displàsia convencional

DNC: Displàsia no convencional

EROs: Espècies reactives d'oxigen

ERNS: Espècies reactives de nitrogen

IDH: Índex de desenvolupament humà

IMS: Inestabilitat de microsatèl·lits

IND: Indeterminat per displàsia

LS, NOS: Lesió serrada no específica

LSS: Lesió serrada sèssil

LSSD: Lesió serrada sèssil amb displàsia

MC: Malaltia de Crohn

MG: Metaplàsia gàstrica

MII: Malaltia inflammatòria intestinal

MMR: Reparació de desajusts

NEG: Negatiu per displàsia

p53-mut: Patró d'expressió mutat de la proteïna p53

p53-wt: Patró d'expressió no mutat de la proteïna p53

PH: Pòlip hiperplàstic

SI: Sistema immunològic

SIA: Sistema immunitari adaptatiu

SII: Sistema immunitari innat

SL: Síndrome de Lynch

ÍNDEX

Resum.....	9
Abstract.....	12
1. Introducció.....	15
1.1 Generalitats del càncer colorectal.....	15
1.1.1 Epidemiologia.....	15
1.1.2 Etiologia.....	16
1.1.3 Diagnòstic i tractament.....	17
1.1.4 Carcinogènesi del càncer colorectal.....	18
1.1.4.1 Vies de carcinogènesi.....	18
1.1.4.2 Subtipus moleculars del càncer colorectal.....	23
1.2 Malaltia inflamatòria intestinal i càncer colorectal.....	25
1.2.1 Introducció.....	25
1.2.2 Paper de la inflamació en el desenvolupament del carcinoma associat a malaltia inflamatòria intestinal.....	26
1.2.3 Microambient inflamatori i tumoral.....	28
1.2.4 Alteracions moleculars relacionades amb el carcinoma associat a malaltia inflamatòria intestinal.....	29
1.2.4.1 Alteracions genètiques en seqüències codificants de l'ADN.....	30
1.2.4.2 Alteracions en seqüències no codificants de l'ADN.....	32
1.2.5 Definició i evolució de les lesions precursors del carcinoma associat a malaltia inflamatòria intestinal.....	33
1.2.5.1 Histologia de la displàsia.....	34
1.2.5.2 Displàsia no convencional.....	35
1.3 Metaplàsia i carcinogènesi.....	39
1.3.1 Introducció.....	39
1.3.2 Mecanismes de transformació: inflamació-metaplàsia-displàsia.....	41
1.3.3 Metaplàsia gàstrica com a precursora de displàsia en malaltia inflamatòria intestinal.....	42

1.3.3.1	Metaplàsia gàstrica.....	42
1.3.3.2	Metaplàsia gàstrica al còlon.....	44
2.	Hipòtesi.....	47
3.	Objectius.....	49
3.1	Objectiu principal.....	49
3.2	Objectius secundaris.....	49
4.	Compendi de Publicacions.....	51
4.1.	Article 1.....	51
4.2	Article 2.....	69
5.	Resum global de Resultats.....	83
6.	Resum global de la Discussió.....	88
7.	Conclusions.....	95
8.	Línies de futur.....	97
9.	Bibliografia.....	100
10.	Annexes (Treballs relacionats amb la tesi).....	122
10.1	Comunicació internacional 1.....	122
10.2	Comunicació internacional 2.....	124
10.3	Comunicació internacional 3.....	126

RESUM

El carcinoma colorectal (CCR) associat a la malaltia inflamatòria intestinal (CaMII) es desenvolupa seguint la seqüència “inflamació crònica-displàsia-càncer”. Aquesta via inflamatòria de carcinogènesi es caracteritza per alteracions precoces de *TP53*, a diferència de la via serrada, on no s’observa aquesta mutació i solen ser tumors inestables (IMS). Recentment s’ha descrit a la via serrada una metaplàsia gàstrica (MG) com a resultat de l’estrès crònic a la mucosa, on s’iniciaria la carcinogènesi serrada.

La malaltia inflamatòria intestinal (MII) és una entitat que cursa amb episodis d’inflamació recidivant que, perllongats en el temps, podria acabar generant una MG com a mecanisme adaptatiu de la mucosa a l’estrès crònic. Així, podem hipotitzar que ambdues vies de carcinogènesi, tot i generar-se per alteracions moleculars diferents, comparteixen la MG com a lesió inicial on es desenvolupa la displàsia.

Pretenem en aquest treball, estudiar marcadors que caracteritzen la via serrada per veure com es comporten al CaMII i diferenciar ambdues vies, i explorar si la MG contribueix a la carcinogènesi de la via inflamatòria estudiant els CaMII, les lesions precursors i la mucosa adjacent d’ambdues lesions.

Al primer estudi es recopilaren 57 CCR en pacients amb MII i 35 mostres de mucosa adjacent. La caracterització molecular es va realitzar mitjançant l’anàlisi de l’expressió de proteïna p53 (marcador subrogat d’alteracions de *TP53*), de les proteïnes dels gens reparadors de l’ADN per analitzar la inestabilitat de microsatèl·lits (IMS) i separar tumors estables i inestables, i l’expressió de MUC5AC com a marcador de fenotip gàstric.

Al segon estudi es van analitzar 76 lesions precursors revisant 33 colectomies de pacients amb MII. En aquest cas també es va estudiar l’expressió de CDX2, marcador de fenotip intestinal, la negativitat del qual, en presència d’expressió de MUC5AC, confirma la MG. La IMS es va explorar amb l’expressió de MLH1, com a marcador subrogat de la hipermetilació del gen.

Vam observar que els CCR presentaven majoritàriament un patró mutat de p53 (p53-mut), eren tumors estables i negatius per MUC5AC, malgrat es va veure positivitat a la mucosa adjacent tant amb inflamació aguda com amb canvis crònics. La mucosa adjacent mostrava majoritàriament patró de p53-wt,

especialment en casos MUC5AC positius, i era estable. Només 6 CCR eren inestables, tots ells amb un patró d'expressió de p53-wt ($p=0.010$) i MUC5AC positius ($p=0.005$), els quals podrien correspondre a carcinomes de la via serrada o associats a la síndrome de Lynch.

Entre les lesions precursors es van trobar 15 lesions de displàsia convencional (DC), i 61 de displàsia no convencional (DNC), en ambdós casos amb diferents graus de displàsia. Es va observar p53-mut en lesions de DNC que presentaven displàsia, expressió que augmentava al incrementar-se el grau de displàsia. Totes les DC eren p53-wt. La majoria de les DNC expressaven MUC5AC, i aquesta disminuïa a mida que augmentava el grau de displàsia ($p=0.006$). L'expressió de CDX2 es perdia de forma inversa a l'expressió de MUC5AC ($p<0.001$) confirmant la MG. Cap DNC ni DC va perdre expressió de MLH1. Es va demostrar també MG a la mucosa adjacent a les lesions de DNC amb canvis crònics o amb inflamació aguda.

Concloem que el CaMII es caracteritza per alteracions de *TP53*, estabilitat de microsatèl·lits i manca d'expressió de MUC5AC, que a la MII es poden originar CCR per la via serrada, i confirmem que la MG apareix a la mucosa inflamada de pacients amb MII, persisteix en estat quiescent i va desapareixent a mida que augmenta el grau de displàsia en lesions de DNC, prèvia a alteracions de *TP53*. Per tant, la MG seria la lesió sobre la qual s'inicia la carcinogènesi del CaMII, fet que comparteix amb la via serrada.

ABSTRACT

Colitis-associated colorectal carcinoma (CAC) develops following the 'inflammation-dysplasia-cancer' sequence. CAC pathway is characterised by early *TP53* gene alterations in contrast the serrated pathway, where *TP53* alterations are rare and a late event, and it can present as unstable tumours. Recently, a gastric metaplasia (GM) has been described as a result of chronic mucosal stress in the serrated pathway, as an early carcinogenic event.

Inflammatory bowel disease (IBD) is an entity that presents with recurrent episodes of inflammation that, prolonged over time, could develop GM as an adaptive mechanism of the mucosa to chronic stress. Thus, we can hypothesise that both carcinogenic pathways share GM as the initial lesion where dysplasia develops, although each pathway is generated by different molecular alterations.

The aim of this study is evaluate serrated pathway markers in CAC to differentiate between the two pathways, and explore the presence of GM in CAC, precursor lesions and adjacent mucosa, to elucidate how GM contributes to carcinogenesis.

In the first study, 57 CAC were collected and 35 samples of adjacent mucosa. Molecular characterisation was performed using p53 protein expression (a surrogate marker of *TP53* alterations), DNA mismatch repair proteins to analyse microsatellite instability (MSI) and separate stable tumours from unstable (MSI) tumours, and the expression of MUC5AC as a marker of gastric phenotype.

In the second study, 76 precursor lesions were analysed by reviewing 33 colectomies of patients with IBD. In this case, we also studied the expression of CDX2, as intestinal phenotype marker. CDX2 negative with MUC5AC expression confirms GM. MSI was explored with MLH1 expression, as a surrogate marker of gene hypermethylation.

We observed that CACs mostly had a p53-mutated pathway (p53-mut), were MSS and negative for MUC5AC, although the adjacent mucosa was MUC5AC positive in acute inflammation and chronic inflammation. The adjacent mucosa showed mostly p53-wt expression, especially in MUC5AC-positive cases, and was MSS. Only 6 CRC were inestable tumours, all of them with p53-wt ($p=0.010$) and MUC5AC-positive ($p=0.005$) expression pattern, which could

correspond the serrated pathway carcinomas or associated with Lynch syndrome.

Among the precursor lesions, 15 lesions of conventional dysplasia (CD) and 61 of non-conventional dysplasia (NCD) were found, in both cases with different degrees of dysplasia. We observed p53-mut in NCD lesions with dysplasia, and p53 expression increased as the degree of dysplasia increased. All DC were p53-wt. Most of the NCDs expressed MUC5AC, which decreased as the degree of dysplasia increased ($p=0.006$). CDX2 expression was lost inversely to MUC5AC expression ($p<0.001$) confirming GM. Neither NCD nor DC lost MLH1 expression. GM was also demonstrated in the mucosa adjacent to NCD lesions with chronic changes or acute inflammation.

We conclude that CAC is characterised by *TP53* alterations, microsatellite stability and lack of MUC5AC expression, and also serrated pathway is related with IBD. Finally, we confirm that MG appears in the inflamed mucosa of patients with IBD, persists in a quiescent state and disappears as the degree of dysplasia increases in NCD lesions, prior to *TP53* alterations. Therefore, CAC and serrated pathway share GM as a change on which the carcinogenesis begins.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. GENERALITATS DEL CÀNCER COLORECTAL

1.1.1 Epidemiologia

El càncer colorectal (CCR) és el tercer tipus de càncer més freqüent a nivell mundial (18.5%) i el segon pel que fa a mortalitat (15.5%) (1). Tant els hàbits alimentaris occidentals com la manca d'activitat física i la obesitat suposen els factors de risc més importants per a l'aparició de la malaltia, deixant en quart lloc la predisposició genètica (2). Aquests hàbits són característics de països desenvolupats i de països en desenvolupament industrial i econòmic, per tant, la incidència i la mortalitat del CCR es troben relacionats amb l'índex de desenvolupament humà (IDH) d'un país (3). A nivell global, Espanya es troba entre els 15 països amb major incidència, i entre els 10 primers en relació a Europa (1) (Fig. 1).

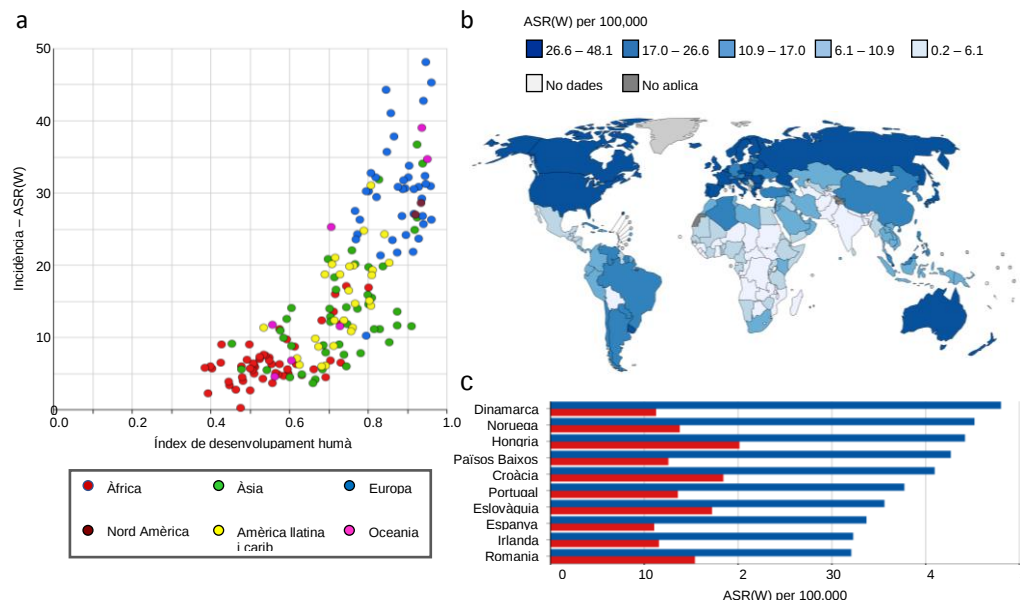


Figura 1: Epidemiologia descriptiva del CCR. a) Correlació entre l'índex de desenvolupament humà i la incidència de CCR al 2022, on s'observa que la major incidència té lloc en aquells països amb major IDH. b) Taxes d'incidència estimades de CCR a nivell mundial on s'observen grans variacions entre diferents àrees geogràfiques. c) Taxes d'incidència dels 10 països amb major incidència a nivell europeu on s'observa que Espanya es troba a la vuitena posició. Dades de GLOBOCAN 2022 (1).

La tendència observada preveu que per l'any 2030 es diagnostiquin 2.2 milions nous casos de CCR i la mortalitat augmenti a 1.1 milions, principalment en països amb un IDH mitjà o alt (2). Els països amb l'IDH més elevat veuran una disminució de la incidència i la mortalitat per l'èxit de la implantació de mesures de prevenció i millores en el tractament (4).

La supervivència del CCR ha augmentat al llarg del temps degut a millores en la detecció precoç, aparició de tècniques quirúrgiques menys invasives i l'administració de tractaments més específics (5). És de vital importància implementar programes de detecció precoç, doncs a banda d'augmentar la supervivència i reduir la mortalitat, permeten reduir costos, un factor important tenint en compte que el CCR suposa un elevat cost pel sistema sanitari situant-se en segona posició en despeses en referència als altres tipus de càncer (6–8).

1.1.2. Etiologia

La variació que s'observa a l'epidemiologia del CCR entre països es pot explicar parcialment a través de les diferències en l'exposició a factors de risc, les variacions demogràfiques i als factors genètics (9). Conèixer els factors de risc relacionats amb l'aparició del CCR i incidir en aquells que es puguin modificar mitjançant polítiques sanitàries educatives encarades a la població de risc, és necessari per reduir la incidència (10). En aquest sentit, tenint en compte l'etiologia dels factors de risc generals associats al CCR, aquests es poden classificar en 2 grups: modificables i no modificables (Fig. 2).

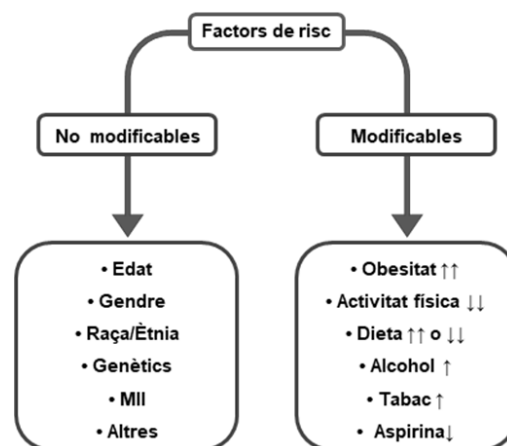


Figura 2. Factors de risc no modificables i modificables en CCR. Llistat dels principals factors que poden prevenir-se o no dins del desenvolupament del CCR. ↑↑: factor altament associat a l'aparició del CCR. ↑: factor associat a l'aparició del CCR. ↓↓: factor altament protector del CCR. ↓: factor protector del CCR. Esquema adaptat de Keum *et al.* i Sawicki *et al.* (2,10).

Els factors de risc modificables són aquells considerats responsables de les alteracions genètiques i epigenètiques adquirides a través d'hàbits que poden ser corregits o eliminats. Dins d'aquest grup trobem l'obesitat, la manca

d'activitat física, la dieta no saludable, l'alcohol i el tabac que en general actuen generant substàncies proinflamatòries i una resistència a la insulina, afavorint l'aparició del CCR (11–15). En aquest mateix grup hi trobem fàrmacs com l'aspirina, que en aquest cas, pel seu efecte antiinflamatori en redueix el risc (16). Aquests factors es troben fortament relacionats amb el CCR esporàdic, que suposa un 60-65% de tots els casos de CCR (10).

Per altra banda, els factors no modificables són aquells factors endògens que s'escapen a la prevenció. Dins d'aquests trobem com a factors que augmenten el risc l'edat avançada, el sexe, observant que els homes tenen major risc, però les dones pitjor pronòstic, patir malaltia inflamatòria intestinal (MII), que augmenta entre 2 i 6 vegades el risc, i les alteracions genètiques heretades. En aquest sentit trobem que un 25% dels casos es troben associats a antecedents familiars, encara que no es relacionin a cap síndrome genètica hereditària, i només un 5% corresponen a CCR associats a síndromes hereditàries (2,17,18). No obstant això, tot i que l'associació del CCR a alteracions genètiques es troba provada, en aquests casos els factors modificables també contribueixen en el desenvolupament de la malaltia (10).

1.1.3. Diagnòstic i tractament

El descens en la taxa de mortalitat del CCR en països desenvolupats és degut a la detecció precoç de la malaltia i als avenços en el seu tractament (19). Al nostre país el programa de cribratge de sang oculta en femta és el test utilitzat per la detecció precoç del CCR, seguit de la colonoscòpia, que a més permet extirpar lesions precursors i evitar la seva progressió a adenocarcinoma (20). El diagnòstic de certesa del CCR es duu a terme mitjançant la confirmació histològica de mostres del tumor extretes per colonoscòpia (21). Existeixen altres eines diagnòstiques per imatge com la tomografia axial computeritzada o la ressonància magnètica dirigides al colon, principalment encarades a l'estadificació clínica (21).

La classificació TNM és el factor pronòstic més important, i el que determinarà el maneig terapèutic del pacient (21). Tot i així, s'han observat diferències considerables en l'evolució i el pronòstic de la malaltia en pacients amb el

mateix estadi patològic, especialment en estadis intermedis (II i III). Per aquest motiu, durant les últimes dècades, s'ha donat èmfasi també a l'aportació que poden afegir biomarcadors moleculars i factors histològics en la millora de l'estimació pronòstica de la malaltia i l'adequació de les teràpies adjuvants i neoadjuvants (22,23).

El tractament ideal i d'elecció, si es pot, és la resecció completa del tumor i de les metàstasis, ja que és la única opció curativa en un CCR tant en estadis inicials com en estadis avançats. En cas de que aquesta opció no sigui viable, l'ús de quimioteràpia neoadjuvant i/o adjuvant, els tractaments dirigits o la radioteràpia es fan servir per reduir la mida del tumor i la seva disseminació (24). En pacients metastàtics, l'ús dels marcadors moleculars, principalment l'anàlisi dels gens *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* i també l'estat dels gens reparadors del sistema de reparació de desajusts (MMR) de l'ADN permet decidir l'estratègia de tractament més òptima. A dia d'avui, el nombre de tractaments efectius per aquest tipus de càncer ha crescut significativament, i l'augment de l'efectivitat dels nous fàrmacs i de les teràpies dirigides han incrementat substancialment la supervivència dels pacients (24).

1.1.4. Carcinogènesi del càncer colorectal

Diversos factors genètics i epigenètics intervenen en les diferents fases de la història natural del CCR. En aquesta, es produeix la transformació de les cèl·lules epitelials de la mucosa còlica en lesions precursors que poden acabar generant CCR mitjançant diverses vies de carcinogènesi (25).

1.1.4.1 Vies de carcinogènesi

Les alteracions genètiques i epigenètiques que intervenen en la carcinogènesi del CCR determinen tres fenotips amb diferents característiques moleculars entre ells, però que no són mútuament excloents (26). El primer fenotip representa un perfil d'inestabilitat cromosòmica (CIN), caracteritzat per errors generats durant la divisió cel·lular que provoquen alteracions en el nombre de còpies cromosòmiques i en la seva estructura. El segon fenotip representa un perfil metilador (CIMP), caracteritzat per una hipermetilació dels dinucleòtids

CG repetits (illes CpG) en les regions promotores dels gens supressors de tumors. I per últim, el tercer fenotip representa un perfil d'inestabilitat de microsatèl·lits (IMS), caracteritzat per alteracions en la longitud dels microsatèl·lits, segments repetitius d'ADN dispersos per tot el genoma en regions no codificants intercalades entre el gens o dins dels gens. Aquesta darrera alteració sol estar provocada pel silenciament del gen reparador de l'ADN *MLH1* a través d'una hipermetilació del seu promotor (27).

D'aquesta manera, el CCR esporàdic s'inicia a través de tres vies de carcinogènesi (Fig. 3):

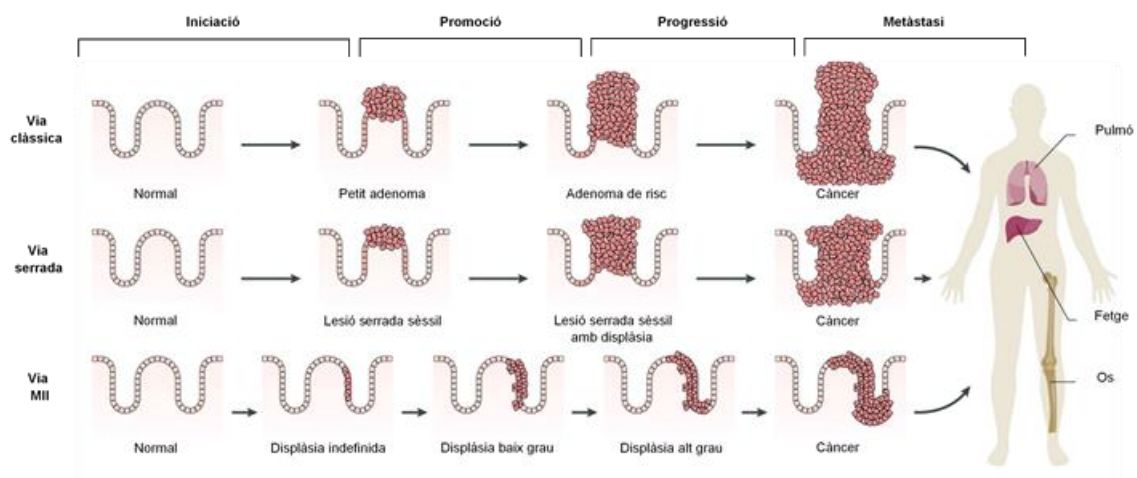


Figura 3. Vies de carcinogènesi en CCR. La història natural del CCR segueix quatre fases (iniciació, promoció, progressió i metàstasi) a través de tres vies de carcinogènesi: la via clàssica amb una seqüència adenoma-carcinoma, la via serrada amb una seqüència lesió serrada-carcinoma i la via de malaltia inflamatòria intestinal (MII) amb una seqüència displàsia-carcinoma associada a una inflamació crònica. Imatge adaptada de Keum & Giovannucci, 2019 (10).

1) Via clàssica: Es caracteritza per una acumulació gradual d'alteracions genètiques i epigenètiques que condueixen a la transformació de les cèl·lules normals en petits adenomes que progressen a adenomes de risc (>10 mm i d'histologia vellosa o amb displàsia d'alt grau) i finalment a càncer (Fig. 3) (10,28,29) exemplificant la seqüència adenoma-carcinoma a través del desenvolupament de CIN. Aquest procés comença amb mutacions inactivadores del gen supressor de tumors *APC*. Aquest fet provoca l'activació de la via de senyalització Wnt/ β -catenina que altera la regulació de la proliferació cel·lular i genera adenomes (10). Posteriorment es produeixen mutacions en l'oncogen *KRAS* que promouen el creixement dels adenomes i la

inactivació del gen supressor de tumors *TP53*, afavorint la progressió a carcinoma (30).

Pel que fa a les lesions precursors en aquesta via, conegudes com adenomes convencionals, se'n defineixen 3 subtipus:

- a) Adenoma tubular (AT), que constitueix el grup d'adenomes més freqüentment trobats a la població general. Es tracta d'una proliferació glandular d'arquitectura preservada, amb increment del número de glàndules, augment de la mida nuclear de les cèl·lules epitelials, hiper Cromàsia, pseudoestratificació nuclear amb polaritat preservada i disminució de cèl·lules caliciformes.
- b) Adenoma tubulovellós (ATV), que presenta les mateixes característiques però arquitecturalment s'observen vellositats al 25-75% de la lesió (Fig.4A).
- c) Adenoma vellós (AV), quan l'arquitectura vellosa representa més del 75% de la lesió (31).

Totes aquestes lesions poden progressar a displàsia d'alt grau, presentant complexitat de l'arquitectura glandular, amb fusió de glàndules i patró cribriforme, i major atípia cel·lular.

2) Via serrada: Les dues alteracions moleculars característiques d'aquesta via són: i) l'activació de la via MAPK, que indueix la proliferació cel·lular descontrolada, i es caracteritza per dues mutacions principals: la mutació de l'oncogen *BRAF*, que és la majoritària, i es relaciona principalment amb lesions serrades sèssils (LSS) i carcinomes de còlon dret, i la mutació de *KRAS*, més freqüent en adenomes serrats tradicionals i característica de còlon esquerre; ii) l'adquisició d'un fenotip CIMP que és el major substrat genètic que caracteritza aquesta via i que provoca la progressió a lesions serrades amb displàsia cap a l'adenocarcinoma (Fig. 3). L'alteració de CIMP està present en aproximadament un 75% de les lesions serrades, i en un 90% dels adenocarcinomes de subtipus serrat (10). El CIMP es classifica en baix (CIMP-L) quan la hipermetilació afecta de 1 a 5 gens, i alt (CIMP-H) quan afecta de 6 a 8. A la via serrada el perfil CIMP es solapa amb el perfil IMS en els casos en que la hipermetilació es produeix al gen *MLH1*, fet que suposa el 75% dels

casos de les LSS, i 12% de tots els CCR esporàdics (32). Un 3% dels IMS corresponen a la síndrome de Lynch (SL) (33).

Segons la Organització Mundial de la Salut (64), les lesions serrades es classifiquen en:

- a) Pòlip hiperplàsic (PH), una lesió glandular amb serres a l'epiteli de superfície o a la part superior de les criptes, sense dilatació basal de les criptes i proliferació limitada a la base, i sense atípia nuclear. Es classifiquen en PH microvesiculars i PH rics en cèl·lules caliciformes.
- b) Lesió serrada sèssil (LSS), una lesió amb abundants serres ocupant tota l'extensió de la glàndula fins a la cripta, i dilatació basal i horitzontalització de, com a mínim 1 de les criptes, amb atípia nuclear mínima.
- c) Lesió serrada sèssil amb displàsia (LSSD), de morfologia semblant a l'anterior però amb un component displàstic constituït per un patró complex de criptes, disminució de serres i displàsia epitelial que pot ser intestinal, indistingible de la displàsia convencional, o serrada, de nucli clar, amb nuclèol i citoplasma eosinòfil, i habitualment ambdues conviuen (Fig. 4B).
- d) Adenoma serrat tradicional (AST), pòlips protuberants que es caracteritzen per tenir serres en forma de fletxa, cèl·lules amb citoplasma eosinòfil i nuclis en punta de llapis; a més a més solen tenir criptes ectòpiques i displàsia epitelial.
- e) Adenoma serrat no classificable (LS, NOS), terme utilitzat en aquells casos que no es pot discernir entre LSSD i AST, i també per una nova entitat anomenada adenomes serrats tubulovelloso.

La progressió d'aquestes lesions segueix dues vies: i) els PH microvesiculars poden presentar mutació de *BRAF*, que genera la progressió a LSS, o AST del còlon dret. Posteriorment adquireixen un fenotip CIMP-H pel que progressaran a LSSD i a AST amb displàsia d'alt grau. La majoria de LSSD manifestaran hipermetilació de *MLH1*. Per últim adquiriran diferents alteracions moleculars que acabaran generant el CCR; ii) els AST de còlon esquerre, que són la majoria, i alguns PH rics en cèl·lules caliciformes, presenten mutació de *KRAS*, i mitjançant l'adquisició

d'un fenotip CIMP-L i alteracions de la via Wnt, progressa la displàsia. Finalment poden presentar inactivació de *TP53*, entre altres alteracions moleculars, pel que desenvolupen CCR (34).

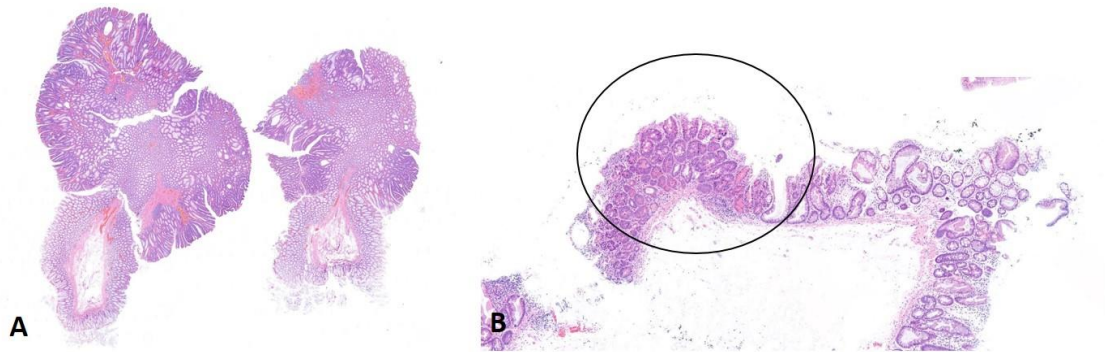


Figura 4. Representació de lesions adenomatoses i serrades. A) ATV (HE, 1X). B) LSSD, s'observa displàsia a la zona marcada amb la rodona (HE, 5X).

3) Via de la inflamació: Aquesta via es caracteritza per la formació de displàsia sobre una mucosa inflamada, es relaciona principalment amb pacients amb MII, i exemplifica la seqüència “inflamació crònica-displàsia-carcinoma” que dona lloc a múltiples lesions planes no visibles a la colonoscòpia, entre d'altres, que poden acabar desenvolupant CCR (Fig. 3). Els esdeveniments moleculars d'aquesta via es caracteritzen per mutacions precoces de *TP53* i rarament mutacions en el gen de l'*APC* de forma tardana (només observat en el 13% dels pacients) (35).

Pel que fa a les lesions precursors d'aquesta via, clàssicament es consideren lesions majoritàriament planes amb diferents graus de displàsia convencional (36). Tot i així, recentment s'han descrit noves lesions de morfologia molt variada: serrada, plana, hipermucinososa, etc., de les quals en parlarem en profunditat en capítols posteriors.

La importància de diferenciar aquestes lesions recau en la implicació pronòstica donada les diferències en la seva progressió. Només una petita proporció d'AT acabaran malignitzant, excloent els associats a la síndrome de poliposi familiar colònica, on gairebé tots progressen a adenocarcinoma (37,38). Pel que fa a les lesions serrades, a diferencia dels AT, tenen més predisposició a tenir lesions metacròniques i a desenvolupar carcinomes sincrònics (39). A més a més, s'ha vist que les LSSD progressen més sovint i amb més rapidesa a CCR

que els AT (40). En el cas de les lesions precursors de la via de la inflamació, la principal dificultat rau en identificar-les macroscòpicament, donat que moltes són planes, i en reconèixer-les i diagnosticar-les histològicament, degut a la manca d'experiència dels patòlegs i la falta de consens en les classificacions aparegudes recentment (41–45). Diagnosticar aquestes lesions en pacients amb MII és important ja que la seva evolució a carcinoma afecta a persones més joves, tenen més probabilitats de patir CCR sincrònics (46), i tot i que en estadis inicials tenen el mateix pronòstic que el CCR no associat a MII, en estadis avançats el pronòstic empitjora pel fet que més freqüentment presenten histologies agressives (47,48)

1.1.4.2 Subtipus moleculars dels CCR

La classificació del CCR mitjançant les seves característiques histopatològiques deixa de banda l'heterogeneïtat molecular que poden presentar els tumors (49). Per aquest motiu, el 2015 el "Colorectal Cancer Subtyping Consortium" va elaborar un sistema de classificació molecular de CCR amb un consens de 4 subtipus moleculars que suposà la classificació més robusta elaborada fins a dia d'avui, tot i que el seu valor pronòstic i aplicabilitat no es considera suficientment òptima per ser implementada a la pràctica clínica diària (50,51) (Fig.5).

Els diferents subtipus moleculars són:

- a) **CMS1 (immunològic)**: Representen aproximadament el 14% dels CMS i normalment es desenvolupen sobre adenomes serrats, són de bon pronòstic en estadis inicials i en estadis avançats responen a immunoteràpia. Acostumen a presentar un microambient ric amb limfòcits, s'associa a gens relacionats amb la via amb JAK/STAT, i freqüentment presenten IMS, CIMP i mutacions de *BRAF V600E*.
- b) **CMS2 (canònic)**: Representen aproximadament el 37% dels CMS, habitualment estan relacionats amb a AT i tenen més bon pronòstic. S'associen a la via carcinogènica clàssica degut a l'augment de l'activació de la via de Wnt/ β -catenina i del proto-oncogen *MYC*.
- c) **CMS3 (metabòlic)**: Representen aproximadament el 13% dels CMS, normalment es troben relacionats amb AT, però tenen pitjor pronòstic

que els dos anteriors. S'associa amb característiques de desregulació metabòlica. Associats a mutacions de *KRAS* i un CIMP baix.

- d) **CMS4 (mesenquimal)**: Representen aproximadament el 23% dels CMS, normalment es troben relacionats amb adenomes serrats, i tenen pitjor pronòstic sent els que més probablement desenvolupen metàstasis. Aquest CMS presenta un microambient amb alt component de cèl·lules de l'estroma i s'associa a l'activació de les vies de TGF β , VEGF i Integrina- β 3, vinculades respectivament a la transició epiteli-mesenquima, a l'angiogènesi i a la remodelació de la matriu extracel·lular. Freqüentment es troben associats a CIN.

Cal dir que les característiques moleculars es solapen en alguns dels grups, fent difícil la seva classificació, i que aproximadament un 13% dels CCR no es poden classificar en cap grup, (52).

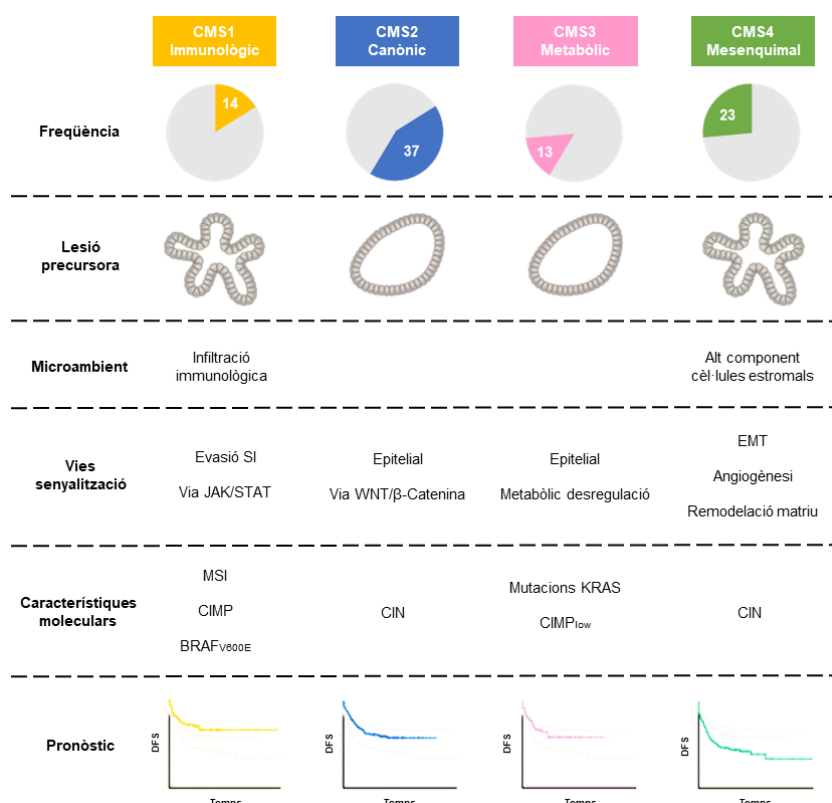


Figura 5. Representació biològica i clínica del CMS del CCR. Cada CMS constitueix una entitat amb característiques clíniques i moleculars diferents on les lesions precursors assignades a cadascun dels subtipus es basen en característiques moleculars. CIMP, fenotip metilador de les illes CpG. CIN: inestabilitat cromosòmica; EMT, transició epitelial-mesenquimal; IMS, inestabilitat de microsatèl·lits; SI, sistema immune. Imatge adaptada de Medema *et al.* 2016 (52).

1.2. MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL

1.2.1. Introducció

La MII és una malaltia crònica recidivant associada a una desregulació del sistema immunològic de la mucosa còlica del pacient, que pot alternar episodis d'activitat amb episodis quiescents, i que es manifesta com una inflamació crònica i descontrolada de l'intestí (53). És més prevalent als països occidentals desenvolupats, afectant aproximadament dos milions de persones a Europa, tot i que en els darrers vint anys s'ha observat un augment de la incidència en països en desenvolupament d'Europa de l'est, Àsia, Sud Amèrica i Àfrica (54).

La patogènia de la MII és deguda a la interacció multifactorial d'alteracions genètiques, immunològiques i ambientals (53). Aquestes últimes afecten a la microbiota intestinal de tal manera que es produeix una disminució del gruix de la barrera intestinal que permet una activació inadequada de les cèl·lules immunològiques. Aquesta situació genera els símptomes típics de la MII i el seu curs natural alternant, episodis d'exacerbació amb episodis de remissió (54).

La MII comprèn dues entitats que presenten diferències en la seva presentació clínica, la colitis ulcerosa (CU) i la malaltia de Crohn (MC). La CU afecta principalment a la mucosa i la submucosa del recte i del còlon, de distal a proximal i de forma contínua, a diferència de la malaltia de Crohn (MC), les lesions de la qual tenen predilecció per l'íleon i el còlon dret, encara que poden observar-se a qualsevol nivell del tub intestinal, afectant-lo de forma discontinúua, penetrant la paret, amb aparició d'estenosis i fístules. En ambdós casos, la simptomatologia és semblant i principalment es presenta amb dolor abdominal, diarrea, femta amb materials patològics com moc, sang o a vegades pus, fatiga, pèrdua de pes, anèmia i febre en alguns casos. A banda d'això, també pot aparèixer simptomatologia extraintestinal com artritis, colangitis esclerosant i problemes cutanis (55).

La inflamació és una de les característiques distintives del càncer, i s'ha demostrat que els pacients amb una MII de llarga evolució tenen un risc més

elevat de desenvolupar un CCR comparat amb la població general (56). Els principals factors de risc per desenvolupar un CCR associat a MII (CaMII) són: la llarga durada de la malaltia, l'extensió de la malaltia, pacients joves en el moment del diagnòstic, la coexistència de colangitis esclerosant primària, la severitat de la inflamació i la història familiar de CCR (57). El CaMII sol aparèixer en pacients més joves, es localitza més sovint al còlon dret i pot presentar histologies més agressives: diferenciació mucinosa, carcinoma amb cèl·lules en anell de segell, adenoescamós o indiferenciat. Per tant, aquestes característiques els hi confereix, en aquests casos, un pitjor pronòstic (58). No obstant això, en els darrers anys el risc de desenvolupar CaMII ha disminuït degut als programes de vigilància, on la detecció precoç de displàsies, la cirurgia primerenca i els fàrmacs biològics que disminueixen la inflamació, són actuacions claus per aquest decreixement en la incidència (57).

1.2.2 Paper de la inflamació en el desenvolupament del CaMII

La inflamació crònica és una característica fortament associada al càncer ja que molts tumors apareixen després d'una inflamació perllongada en el temps, i d'altres, desencadenen una inflamació crònica del teixit peritumoral durant la seva progressió (59). El paper que juga aquesta inflamació crònica en la carcinogènesi del CaMII es troba explicada per dos mecanismes: un mecanisme indirecte mediat per les citocines produïdes per les cèl·lules inflamatòries i epitelials com a resposta a la inflamació, i un mecanisme directe produint dany a l'ADN a través de l'estrès oxidatiu que genera la inflamació (60). L'estrès oxidatiu és una de les diferències principals en la patogènia del CaMII respecte al CCR no associat a MII (CCRnMII) (61).

En individus sans existeix una comunicació fermament controlada entre els enteròcits i les cèl·lules del sistema immunitari del budell per mantenir un equilibri entre la microbiota intestinal i els mediadors inflamatoris. En el procés de resposta contra agents patògens, les cèl·lules immunològiques són reclutades i activades sustentant un equilibri entre mediadors proinflamatoris i senyals antiinflamatòries (60). En els pacients amb una MII severa, aquest

equilibri es troba trencat, produint-se també una disminució de la capacitat antioxidant. Aquesta situació provoca que les cèl·lules immunològiques alliberin de forma massiva espècies reactives d'oxigen (EROs) i espècies reactives de nitrogen (ERNs) creant un estrès oxidatiu que danya l'ADN i condueix a la mutagènesi cel·lular (62).

No obstant això, el dany a l'ADN i l'acumulació de mutacions en gens involucrats en la carcinogènesis no és l'única via en la que la inflamació pot promoure el desenvolupament de CCR (63). En realitat, la inflamació crònica és capaç de produir un escenari de propensió on indueix canvis epigenètics i on es genera una disbiosi a la mucosa que allibera radicals lliures extracel·lulars que incrementen la permeabilitat intestinal afavorint la inflamació.

Aquesta situació promou la reparació i regeneració tissular, però quan aquest dany histològic és recurrent, aquest procés de reparació també indueix un dany permanent de l'ADN i una inestabilitat genòmica a les cèl·lules epitelials (63). L'acumulació d'aquests esdeveniments inflamatoris i d'alteracions moleculars i genètiques genera una sèrie de canvis preneoplàstics previs a la displàsia, també anomenat camp de cancerització, que afavoreixen la seva aparició i progressió a carcinoma (61) (Fig. 6).

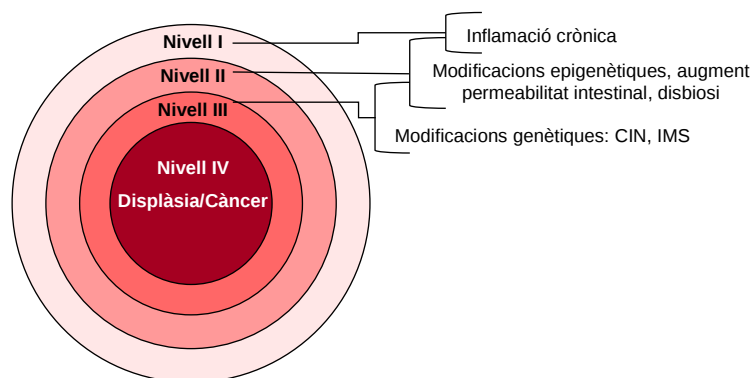


Figura 6. Esquema que representa la suma de les diferents alteracions inflamàtores, epigenètiques i moleculars que afavoriran l'aparició del Càncer. El camp afecte, generat per la inflamació, pot ser pensat com àrees concèntriques on el seu microambient específic, creat per l'acumulació de cèl·lules immunitàries i els seus productes, generen una pressió selectiva que afavoreix l'adquisició progressiva de característiques associades a l'aparició de displàsia. Esquema modificat de Fantini *et al.* (60).

1.2.3. Microambient inflamatori i tumoral

La mucosa intestinal és un component important del sistema immunològic (SI) i està formada per dos components, el sistema immunitari innat (SII) i l'adaptatiu (SIA). El SII està constituït per una barrera física formada per una capa de muc amb agents antimicrobians, i per les cèl·lules epitelials riques en receptors que exposen els agents patògens a les cèl·lules immunitàries de primera resposta com són neutròfils, macròfags i cèl·lules dendrítiques (64). Per altra banda, el SIA s'encarrega de fer arribar a la mucosa limfòcits B i T, poc freqüents en condicions normals, i que mantindran l'homeòstasi de l'intestí generant diverses citocines (65). A banda d'això, la microbiota intestinal també participa en l'homeòstasi del SI a través de la seva interacció amb ell, el que produeix l'alliberació de diversos metabòlits i components encarregats de protegir la mucosa i regular el SI (66).

Les cèl·lules epitelials, immunològiques i de l'estroma del microambient inflamatori es comuniquen entre elles per contacte directe o mitjançant la secreció de citocines que permeten coordinar la resposta inflamatòria a partir de vies autocrines i paracrines (60). Els efectes de la inflamació, així com també la resposta antitumoral i protumoral ve determinada per diversos mediadors immunològics i per l'abundància i l'estatus de les cèl·lules immunològiques de la zona (65). Aleshores, aquests dos factors coordinen el procés de transformació del microambient inflamatori a un microambient immunosupressor del tumor, el qual es troba format per infiltrats de cèl·lules immunitàries, cèl·lules de l'estroma i cèl·lules tumorals que són essencials per mantenir les senyals de proliferació, resistència a la mort cel·lular i induir l'angiogènesi (60). Aquest fet afavoreix l'adquisició progressiva de canvis histològics, morfològics i moleculars, on es troben gens implicats com *TP53*, entre d'altres, que provocarien l'aparició de canvis displàstics a l'epiteli intestinal. L'aparició d'una displàsia de baix grau pot progressar a displàsia d'alt grau i podria arribar a evolucionar a adenocarcinoma (67) (Fig.7).

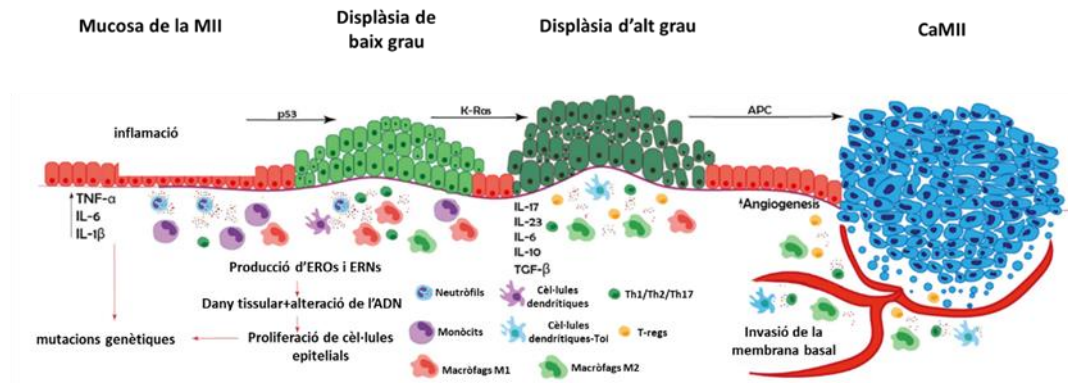


Figura 7. Representació esquemàtica dels efectes de la inflamació sobre la carcinogènesi. La inflamació crònica promou el reclutament de cèl·lules immunitàries a la mucosa que secreten citocines, interleucines i factors de necrosi tumoral. A més a més produeixen EROS i ERNs generant dany de l'ADN que afavoreix la proliferació cel·lular i les alteracions genètiques. Les mutacions de *TP53* afavoreixen l'aparició de la displàsia de baix grau, i posteriorment, es creu que la mutació de *KRAS* està implicada en l'evolució a displàsia d'alt grau. Finalment, les mutacions de l'*APC* provoquen la invasió. La inflamació crònica també activa mecanismes immunosupressors que afavoreixen la progressió del càncer (M2, T-regs, etc). A més a més també es produeix un increment de factors angiogènics i citocines antiinflamatòries que afavoreixen el seu creixement. Esquema extret de Frigerio *et al.* (67).

1.2.4 Alteracions moleculars relacionades amb el CaMII

Tot i seguir seqüències carcinogèniques diferents, les alteracions genètiques observades en el CaMII i el CCRnMII són molt similars, però existeixen diferències importants en la freqüència i el moment en que es produeixen (68).

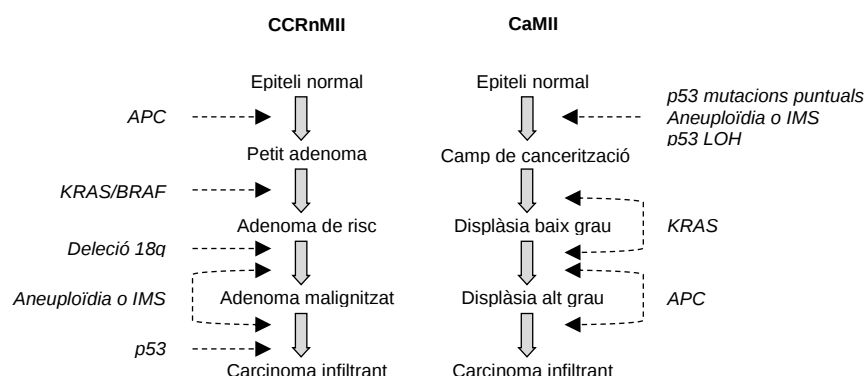


Figura 8. Alteracions moleculars del CaMII respecte al CCRnMII. Ambdues vies comparteixen varies alteracions genètiques, però difereixen en el moment que es produeixen. Les alteracions en *TP53* i l'aneuploidia es produeixen en fases inicials del CaMII, mentre al CCRnMII es produeixen en fases tardanes, i a la inversa pel que fa a les mutacions de l'*APC* i *KRAS*. Esquema modificat de Leedham *et al.* (69).

L'aneuploïdia, les mutacions de *TP53* i la IMS estan implicades en estadis inicials de la carcinogènesi del CaMII, a diferència del CCRnMII. D'altra banda les mutacions en gens d'*APC* i *KRAS* són menys freqüents i es produeixen en fases més tardanes al CaMII respecte al CCRnMII (60,82) (Fig. 8).

1.2.4.1 Alteracions genètiques en seqüències codificants de l'ADN

La inflamació de llarga durada a la mucosa intestinal de la MII produeix un camp de premalignització o cancerització en el qual es desenvolupen mutacions somàtiques que condueixen a l'aparició del CaMII (116). Aquestes mutacions, inexistents a l'epiteli sa, es troben presents a l'epiteli inflammat no displàstic i apareixen anys abans del desenvolupament de l'adenocarcinoma (117). Les alteracions genètiques més freqüents detectades a la mucosa inflamada, respecte a la mucosa sana, són les alteracions de *TP53* i esdeveniments d'aneuploïdia que sovint es troben associats a *TP53* (118). Recentment, estudis que perfilen el camp de cancerització de la mucosa inflamada han detectat més mutacions prèvies a la displàsia relacionades amb la inflamació, en els gens *KRAS*, *ARD1A* i *PIGR*, entre d'altres (119) (Taula 1).

Gen	CaMII	CCRnMII
p53	72%	55%
KRAS	12%	43%
TGFBR2	17%	5%
SMAD4	13%	11%
TRRAP	13%	11%
SOX9	10%	14%
PIK3CA	10%	29%
SMAD2	10%	5%
EP300	10%	7%
IDH1	11%	2%
FBXW7	7%	18%
APC	6%	72%
BRAF	4%	14%
CTNNB1	3%	7%

Taula 1. Principals alteracions genètiques del CaMII respecte al CCRnMII. Dades de "The Cancer Genoma Atlas Project" (70).

Les mutacions de *TP53* afavoreixen la proliferació cel·lular i la progressió cap a CaMII (71). Aquest és un esdeveniment molt freqüent i inicial, a diferència del CCRnMII, que es produeix en fases tardanes (70). A més a més, també s'ha descrit en fases inicials la pèrdua d'heterozigositat de p53, que té un paper clau en l'evolució de la displàsia de baix grau cap a carcinoma (72).

Els dos tipus d'inestabilitat genòmica descrits en CCR són la CIN i la IMS (73). Aquestes dues alteracions es troben en la mateixa freqüència al CaMII que al CCRnMII, 85% i 15% respectivament, però divergeixen en el temps d'aparició, sent un fenomen precoç al CaMII (74). Dels 15% dels CCR IMS 12% corresponen la via serrada, trobant-se en la majoria de CCR associats a aquesta via, i un 3% a la SL (33).

L'aneuploïdia s'ha vist relacionada també amb estadis inicials de la carcinogènesi del CaMII, i es va incrementant a mida que augmenta el grau de displàsia fins l'aparició de l'adenocarcinoma (70).

La pèrdua de la funció del gen *APC* és una alteració molt comú que inicia el CCR de la via clàssica. Al CaMII aquesta mutació és menys freqüent, i quan apareix ho fa en fases tardanes del procés de carcinogènesi (75). Pel que fa a les mutacions del gen *KRAS*, la seva prevalença al CaMII varia segons els estudis, però és menor que al CCRnMII i, com en aquest últim, és mútuament exclouent amb la mutació de *BRAF* (76).

A banda de les alteracions descrites, altres mutacions més freqüents al CaMII respecte al CCRnMII són l'amplificació del protooncogen *MYC*, i mutacions d'*IDH*, *TGFBR2* i *SMAD4* (77). A més a més, s'han trobat mutacions susceptibles de ser diana terapèutica com *PIK3CA* i *BRAF* (78) (Taula 1). Aquestes diferències en les alteracions genètiques de la via de CaMII respecte als CCRnMII, suggereixen camins diferents a nivell molecular que poden contribuir al procés oncogènic en cada via (68).

Tenint en compte la rellevància de l'estrès oxidatiu en la inflamació de la mucosa, una alteració molecular que té un paper important són els canvis a nivell de l'ADN mitocondrial. Al CaMII, l'increment d'aquestes mutacions proporciona un estatus precancerigen que accelera la transformació

oncogènica (79). Per tant, l'estudi de l'ADN mitocondrial en pacients amb MII podria ser útil per predir el risc de carcinogènesi i/o crear noves dianes terapèutiques (70).

1.2.4.2 Alteracions en seqüències no codificants de l'ADN

L'epigenètica fa referència a canvis en l'expressió gènica i l'organització de la cromatina que no són degudes a alteracions en la seqüència de l'ADN (70). Com al CCRnMII, especialment a la via serrada, l'esdeveniment epigenètic que caracteritza el CaMII és el perfil metilador de les illes CpG (CIMP), però en aquest cas també, la freqüència de les alteracions és diferent ambdós casos (61) (Taula 2).

Gen	CaMII	CCRnMII
p16 ^{INK4a}	100%	36%
CDH1	93%	87%
HPP1	59%	84%
MINT31	59%	11%
MINT1	50%	15%
p14 ^{ARF}	50%	33%
hMLH1	9%	5%
RUNX3	45%	23%
DAPK	28%	57%

Taula 2. Principals alteracions epigenètiques (metilacions) del CaMII respecte al CCRnMII.
Dades de "The Cancer Genoma Atlas Project" (70).

Les principals alteracions epigenètiques del CaMII són la metilació del promotor, i per tant la conseqüent silenciament, dels gens *p16NK4*, *p14ARF* i caderina 1 (*CDH1*) (70). Les dues primeres són esdeveniments precoços en la carcinogènesi del CaMII, i juguen un paper important en la inhibició del cicle cel·lular (80). *CDH1*, per altra banda, té un paper essencial en la classificació, migració i diferenciació cel·lular, i la metilació del seu promotor, provoca una desregulació del gen en estadis inicials de la carcinogènesi del CaMII (81). La hipermetilació de *MLH1* succeeix amb la mateixa freqüència al CaMII que al CCRnMII, en el context d'IMS (82).

A més a més, un progressiu increment en la metilació dels gens de la via Wnt estan implicats en la carcinogènesi del CaMII però en fases més tardanes que al CCR de la via clàssica (83). Aquesta alteració també està descrita en els CCR de la via serrada en fases tardades, en relació a la progressió dels AST (84)

Altres metilacions relacionades amb la carcinogènesi del CaMII, i involucrades en la supressió tumoral i la regulació del cicle cel·lular, són les dels gens *RUNX3*, *MINT1*, *MINT32*, *HPP1* i *DAPK* (85).

Una altra alteració epigenètica involucrada amb la via del CaMII és l'alteració dels microARNs (70). Els dos més rellevants són el miR-31 i el miR-224. El primer exhibeix un increment en pacients amb MII, prèvia a la displàsia, considerant-se un esdeveniment precoç del procés de cancerització; a més a més es troba en proporcions majors respecte al CCRnMII (86). D'altra banda, la sobreexpressió del miR-224 provoca una desregulació del cicle cel·lular (87). El miR-31, a diferència del CCR clàssic, també s'ha vist expressat en lesions serrades amb mutació de *BRAF* i *CIMP* (88).

1.2.5 Definició i evolució de les lesions precursors del CaMII

Els pacients amb MII tenen un alt risc de desenvolupar displàsia i per tant, acabar desenvolupant CCR (42). És per aquest motiu que la detecció precoç, un diagnòstic precís i el tractament de les formes de displàsia prèvies a l'aparició del CCR són el model a seguir per reduir la mortalitat per CCR en pacients amb MII (89).

Al 2015, la declaració de consens internacional sobre la Vigilància per a la Detecció i Gestió de Neoplàsia Endoscòpica Colorectal a la MII (SCENIC) va establir una sèrie de definicions amb l'ànim d'estandarditzar la classificació i el diagnòstic de la displàsia associada a MII (90). Aquest sistema SCENIC classifica les lesions com “visibles” i extirpables quan es poden identificar a través de biòpsies dirigides i tenen una mida $\leq$ a 2 cm (polipoides pedunculades, polipoides sèssils, superficialment elevades, planes o deprimides) o “invisibles” en cas de que siguin identificades a través de biòpsies aleatòries (91).

1.2.5.2 Histologia de la displàsia

La displàsia es defineix histològicament com una alteració neoplàsica inequívoca confinada a l'epiteli intestinal que no s'interpreta com reactiva (92).

El sistema de classificació histològica més utilitzat és el proposat al 1983 per Ridell *et al.* on l'epiteli es divideix en 4 categories: negatiu per displàsia (NEG), indefinit per displàsia (IND), displàsia de baix grau (DBG) i displàsia d'alt grau (DAG) (Fig. 9) (90).

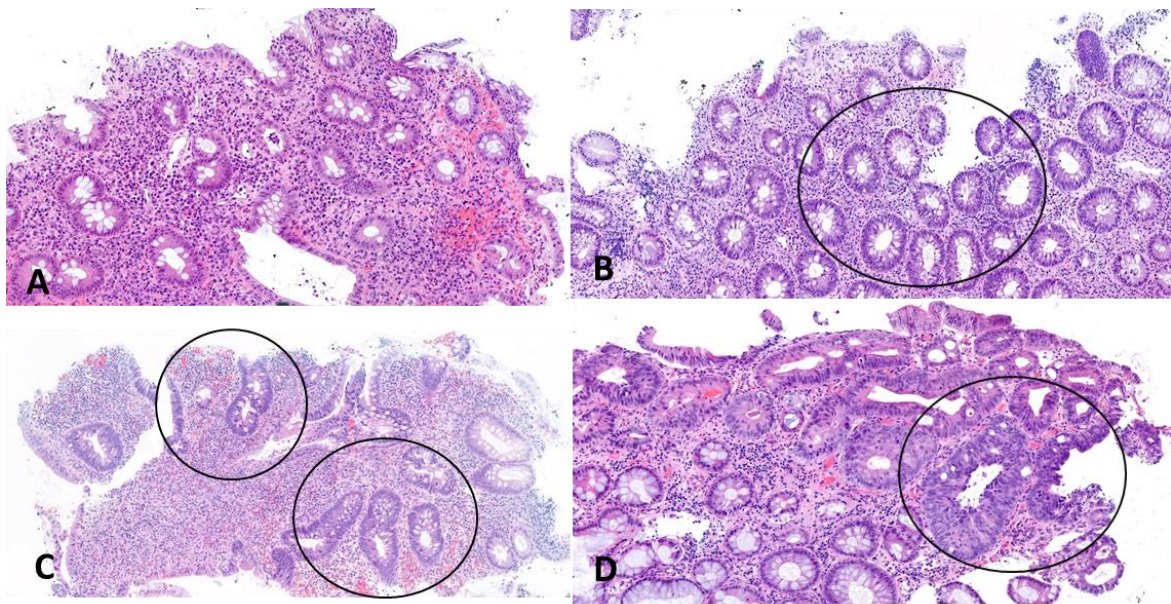


Figura 9. Imatges histològiques de la Classificació de Ridell. **A)** Negatiu per displàsia. La imatge mostra canvis reactius de l'epiteli còlic (HE, 20x). **B)** Indeterminat per displàsia. El cercle marca una àrea on l'epiteli presenta característiques d'atípia, sense poder determinar si es tracta de canvis reactius o displàstics (HE, 20x). **C)** Positiu per displàsia, displàsia de baix grau. Els cercles mostren com l'epiteli presenta atípia i pseudoestratificació, típica de la displàsia de baix grau (HE, 20x). **D)** Positiu per displàsia, displàsia d'alt grau. Els cercles mostren com l'epiteli presenta atípia franca i pèrdua de la polaritat nuclear, típica de la displàsia d'alt grau (HE, 20x).

La categoria NEG compren la mucosa normal, la mucosa amb canvis subtils que es podem veure en una MII en estat quiescent i la colitis activa (Fig. 9A). En principi no es difícil diferenciar un epiteli displàstic d'un epiteli reactiu perquè, entre altres característiques, en aquest últim, l'atípia citològica fluctua al llarg de l'epiteli de la mateixa manera que la intensitat de la inflamació local. Per contra, en la displàsia, les regions d'atípia es troben ben demarcades o són iguals o superiors en la superfície que en la base de les criptes (36). Per altra

banda, la categoria IND compren aquells casos on l'epiteli presenta una atípia citològica que no es pot categoritzar amb precisió perquè no es pot diferenciar entre epiteli reactiu i epiteli displàstic, o bé per factors tècnics de la mostra (36) (Fig. 9B). Finalment, dins de les categories positives per displàsia, morfològicament, el prototip clàssic intestinal de la categoria DBG és el de l'AT convencional, amb patrons de creixement ordenats, atípia citològica lleu i polaritat epitelial preservada (Fig. 9C). A mesura que la displàsia progressa cap a DAG, la pauta de creixement és desordenada, l'atípia citològica augmenta i la polaritat epitelial disminueix o desapareix (36) (Fig. 9D).

1.2.5.3 Displàsia no convencional

La displàsia intestinal o convencional (DC) és el tipus de displàsia que ha sigut més comunament observada, donat que els seus criteris morfològics es troben ben establerts. No obstant això, a la MII es troben altres models de displàsia, descrits recentment i anomenats displàsia no convencional (DNC), que presenten patrons morfològics poc reconeguts, difícils d'identificar i de classificar (42,93–95). El diagnòstic d'aquestes lesions és de vital importància ja que sovint són planes o invisibles endoscòpicament, tenen un major risc de desenvolupar DAG o CCR i habitualment presenten alteracions moleculars de neoplàsia avançada (43).

Comparació dels diferents sistemes de classificació proposats per la displàsia en MII

Harpaz et al (2017)	Gui et al (2020)	Choi et al (2020)
Tipus adenoma convencional	Adenomatosa	Tipus adenoma convencional
Deficiència de cèl·lules caliciformes	Eosinofílica	Deficiència de cèl·lules caliciformes
Diferenciació terminal	Desdiferenciat	Diferenciació de cèl·lules de la cripta
Hipermucinoso	Mucinoso	Hipermucinoso
		Diferenciació de cèl·lules de Paneth
Tipus lesió serrada sèsil	Tipus lesió serrada sèsil	Tipus lesió serrada sèsil
Tipus adenoma serrat tradicional	Tipus adenoma serrat tradicional	Tipus adenoma serrat tradicional
Serrada de tipus no específic	Serrada de tipus no específic	Serrada de tipus no específic
Inclassificable		

Taula 3. Comparativa dels principals sistemes de classificació realitzats sobre la displàsia a la MII.

Taula modificada extreta de Harpaz *et al.* (94).

La presència de patrons poc reconeguts en aquestes displàsies ha fet que existeixin diverses classificacions de displàsies no convencionals (42,43,94,95) (Taula 3). Totes aquestes classificacions comparteixen similituds, però en el

moment de la publicació dels articles d'aquesta tesi, la classificació de Choi *et al.*, publicada a la revista *Modern Pathology* l'any 2021, era la més recent tot i que la seva validesa no es troba demostrada a dia d'avui (41) .

Aquesta classificació identifica set subtipus de DNC en referència principalment a criteris morfològics, però també a criteris clínicopatològics i moleculars (Fig. 10 i 11):

a) Displàsia hipermucínosa: representa el 2% del total de les DNC i es considera que pot relacionar-se amb un major risc de neoplàsia avançada.

Morfològicament es caracteritza per presentar una arquitectura exofítica, tubulovelloso, amb prominents cèl·lules mucínoses en més del 50% de la lesió (42) (Fig. 10A).

b) Displàsia amb diferenciació de cèl·lules de la cripta: representa el 4% del total de les DNC. Morfològicament és una lesió tubular de cèl·lules entèriques, de citoplasma marcadament eosinòfil i nucli amb discreta atípia, limitades a la base de la cripta, sense que la superfície epitelial estigui involucrada o aparegui una arquitectura atípica (42) (Fig. 10B).

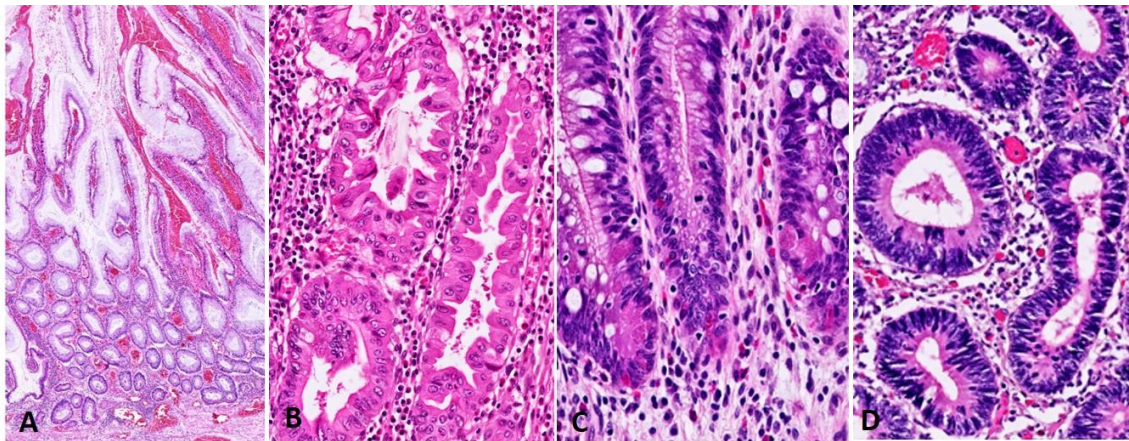


Figura 10. Lesions de DNC. A) Displàsia hipermucínosa . B) Displàsia amb diferenciació de cèl·lules de la cripta. C) Displàsia amb una diferenciació de cèl·lules Paneth. D) Displàsia deficient de cèl·lules caliciformes.

c) Displàsia amb una diferenciació de cèl·lules Paneth: representa el 13% del total de les DNC. Morfològicament es una lesió tubular amb displàsia que presenta un augment de la diferenciació de cèl·lules de Paneth en al menys dos criptes displàstiques contínues en dos focus diferents (42) (Fig. 10C).

d) Displàsia deficient de cèl·lules caliciformes: representa el 3% del total de les DNC. Morfològicament s'observen cèl·lules epitelials amb el nucli hiperchromàtic, de major mida, i es caracteritza principalment per una pèrdua total o quasi total de cèl·lules caliciformes (42) (Fig. 10D).

e) DNC de morfologia serrada (Fig. 11): compren les lesions tipus lesió serrada sèssil (LSS-like) (Fig. 11A), les lesions tipus adenoma serrat tradicional (AST-like) (Fig. 11B) i les lesions tipus lesió serrada no específica (LS, NOS-like) (Fig. 11C), que són els tres subtipus diferents de displàsies serrades. Aquestes lesions es presenten com a lesions poliposes amb característiques clínico-patològiques i moleculars similars a les dels seus equivalents esporàdics. A nivell histològic, presenten les mateixes característiques que les descrites relacionades amb la via serrada (42) (Fig. 13).

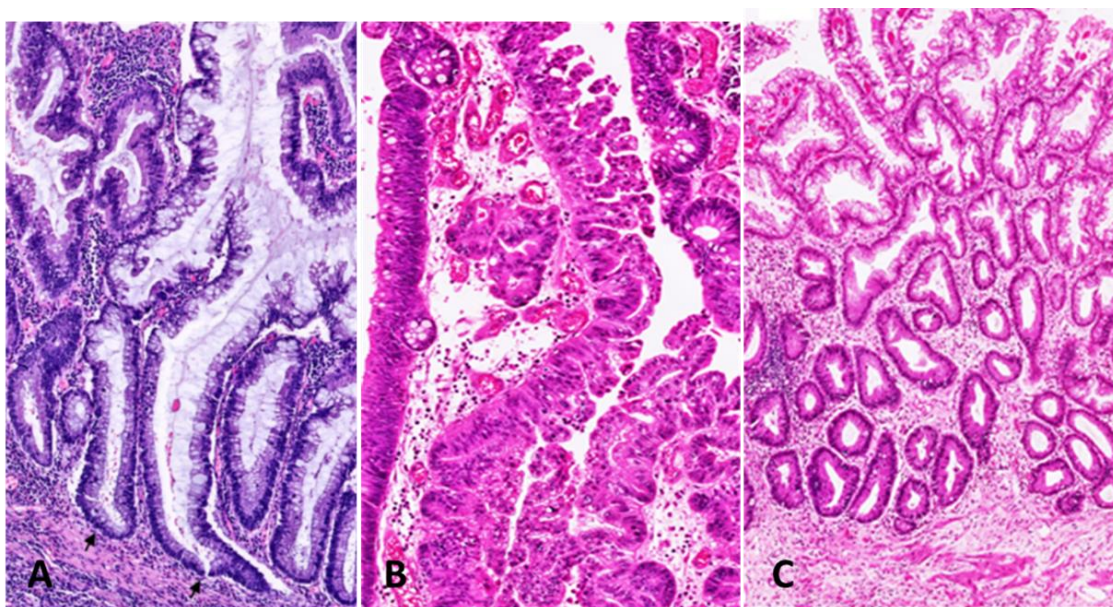


Figura 13. DNC de morfologia serrada. A) DNC tipus lesió serrada sèssil. B) DNC tipus adenoma serrat tradicional. C) DNC tipus lesió serrada, NOS.

De totes aquestes lesions, les dues primeres i la displàsia deficient en cèl·lules caliciformes són les que s'associen a un major risc de desenvolupar CaMII (42).

Recentment una nova classificació ha sorgit durant el transcurs del desenvolupament d'aquesta tesis. Aquesta classificació descrita per Harpaz l'any 2023 (94) és la continuació d'una classificació prèviament descrita pel mateix autor l'any 2017 (95) i comparteix característiques amb les altres dues classificacions existents (42,43). Aquesta última classificació de *Harpaz et al.*

engloba 3 grans categories atenent al tipus de diferenciació: displàsia intestinal, displàsia gàstrica i displàsia mixta (94) .

La displàsia intestinal engloba sis categories: adenomatosa, deficient en cèl·lules caliciformes, amb diferenciació de cèl·lules de la cripta i els tres tipus de displàsies serrades. Aquesta classificació exclou de les lesions precursors la displàsia amb diferenciació de cèl·lules de Paneth descrita per Choi *et al.* (42).

La displàsia gàstrica es defineix per tenir un epiteli de diferenciació mucinosa de tipus foveolar gàstric que expressa MUC5AC, i engloba dues categories: lesions mucinoses de creixement tubular, vellós o mixt, i lesions de creixement serrat (94). No obstant això, pocs són els casos d'aquesta displàsia informats a la literatura com entitats aïllades. Més aviat, aquestes displàsies s'han informat combinades amb la displàsia vellosa rica en cèl·lules intestinals, és a dir adenomatosa, i que representen la tercera categoria, displàsia mixta intestinal-gàstrica. Per tant, són necessaris més estudis sobre la història natural i les característiques biològiques d'aquests dos tipus de diferenciació per poder definir-les i diagnosticar-les correctament (96).

1.3. METAPLÀSIA I CARCINOGENESI

1.3.1 Introducció

La metaplàsia és la substitució d'una cèl·lula madura diferenciada, a una altra cèl·lula madura diferenciada que normalment no està present en un teixit específic (97,98). Aquest fenomen, encara que pot formar part del desenvolupament adult normal, sovint es produeix com a resposta a un estrès ambiental donat per l'exposició a estímuls anormals com determinades substàncies o agents infecciosos (99). En aquest context, les cèl·lules originals s'adapten a aquest estrès ambiental canviant d'identitat. Si l'estímul que causa la metaplàsia desapareix, pot succeir que la cèl·lula torni al seu estat inicial. Si l'estímul persisteix, la metaplàsia pot progressar a displàsia i ocasionalment a malignitat (98,99).

L'efecte carcinogènic directe o indirecte de la fase oncogènica sobre les cèl·lules metaplàsiques és conegut com la seqüència "metaplàsia-displàsia-càncer", un fet provat en diversos òrgans com el cervix uterí, la bufeta urinària, el tracte bronquial, l'esòfag, l'estómac i el pàncrees (100). L'estudi dels mecanismes que contribueixen a la progressió de la metaplàsia a displàsia poden revelar estratègies en la prevenció i detecció precoç de lesions primerenques (98).

El tipus de metaplàsia que es desenvoluparà es depenent del teixit resident. Actualment, les principals metaplàsies associades a la progressió a una fase oncogènica són: escamosa, intestinal i ductal (98) (Taula 4) (Fig. 12).

La metaplàsia escamosa és la metaplàsia més freqüent i té lloc principalment als epitelis de les vies respiratòries i al cervix, degut a l'exposició del tabac al pulmó, i a la infecció pel virus del papil·loma humà a la mucosa cervical (101). Aquesta metaplàsia es caracteritza per la substitució d'un epiteli mucinós, columnar, cuboidal o alveolar per un epiteli tipus escamós, amb múltiples capes, que el fan més resistent al dany al que està exposat l'epiteli original (98) (Fig. 12A). Si l'estímul nociu continua, perpetuant la inflamació, la metaplàsia escamosa desenvolupa una displàsia que pot acabar evolucionant a un carcinoma escamós (101,102).

Tipus metaplàsia	Estímul	Transició llinatge cel·lular
ESCAMOSA		
Vies respiratòries	Tabac	Columnar a escamós
Cèrvix	Baix pH vaginal, HPV	Columnar a escamós

INTESTINAL		
Esòfag	Àcid i/o bilis	Escamós a intestinal
Estómac	<i>H. pilory</i> , tabac/alcohol, gastritis autoimmune	Columnar a intestinal
Vesícula biliar	Litiasi, inflamació	Biliar a columnar o intestinal

DUCTAL		
Pàncrees	Inflamació	Acinar a ductal
Glàndula mamària	Inflamació	Acinar a ductal
Glàndula salival	Inflamació	Acinar a ductal

Taula 4. Tipus de teixit amb metaplàsia i dany ambiental que el produeix. Procés d'adaptació del teixit i relació de la metaplàsia com a lesió precursora de la seqüència metaplàsia-displàsia-càncer. Taula adaptada de Giroux *et al.* (98).

La metaplàsia intestinal és el segon tipus de metaplàsia més freqüent i té lloc principalment als epitelis de diferents parts del tub digestiu com l'esòfag, la unió gastroesofàgica i l'estómac, així com també a la bufeta biliar. L'estímul nociu que la produeix són el reflux d'àcids gàstrics a l'esòfag, la infecció per *Helicobacter pylori* i altres causes de gastritis a l'estómac i les litiasis a la bufeta biliar. Aquesta metaplàsia es caracteritza per la substitució de l'epiteli d'origen per un epiteli columnar amb cèl·lules caliciformes, amb o sense presència de la vora en raspall citoplasmàtic i/o cèl·lules de Paneth (103,104) (Fig. 12B). Tenint en compte que l'epiteli glandular té més capacitat proliferativa en un ambient àcid, provocat pels estímuls mencionats, aquesta metaplàsia pot progressar a displàsia i culminar en un adenocarcinoma (98,103,105–107).

La metaplàsia ductal té lloc principalment al pàncrees, degut a pancreatitis agudes de repetició o pancreatitis cròniques, i excepcionalment a la glàndula salival o a la mamària. Es defineix per la substitució dels àcins del parènquima per estructures ductals, a causa d'un procés inflamatori de llarga evolució, produint la pèrdua de la funció de les cèl·lules acinars d'origen (99) (Fig. 12C). Una inflamació persistent produeix una metaplàsia ductal que pot progressar a neoplàsia intraepitelial i desenvolupar un adenocarcinoma (108).

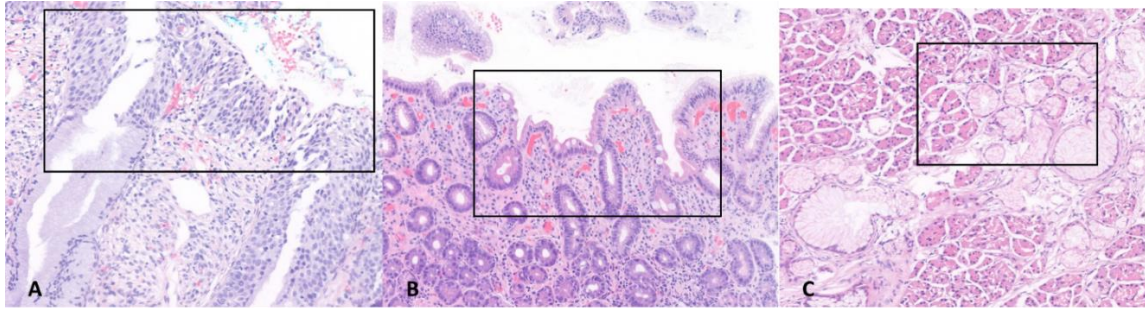


Figura 12. Tipus de metaplàsia. A) Metaplàsia escamosa al cèrvix (quadrat) (HE, 20x) . B) Metaplàsia intestinal a l'estómac (quadrat) (HE, 20x). C) Metaplàsia ductal al pàncrees (quadrat) (HE, 20x).

1.3.2 Mecanismes de transformació: inflamació-metaplàsia-displàsia

Els diferents factors que promouen la inflamació del teixit i que acaben provocant la metaplàsia poden tenir un efecte carcinogènic directe sobre les cèl·lules lesionades de manera crònica, o bé un efecte indirecte mitjançant mediadors inflamatoris derivats de les cèl·lules metaplàstiques i immunitàries. Aquest microambient metaplàstic pot influir a la diferenciació cel·lular i també induir canvis genètics i epigenètics que afavoreixen la progressió a càncer (98,100) (Fig. 13).

Les senyals proinflamàtòries i immunològiques que alliberen les cèl·lules immunitàries del microambient intervenen en les vies de senyalització de les cèl·lules epitelials i indueixen la metaplàsia (98). A més, l'epiteli metaplàstic per ell mateix, també afavoreix la producció d'aquestes senyals (100) (Fig. 13). El procés de progressió de la metaplàsia a la displàsia suposa una sèrie de modificacions que alliberen a les cèl·lules metaplàstiques dels mecanismes que regulen la seva proliferació cel·lular i l'apoptosi (100). L'ERN contribueix al desenvolupament de mutacions del gen *TP53*, el qual es un esdeveniment primerenc que precedeix a la invasió tumoral. Aquestes mutacions també afavoreixen un augment de la producció de d'òxid de nitrogen, donat que p53 és un inhibidor de la seva síntesi. Aquest cercle viciós porta al fet que es produeixi un augment del dany de l'ADN i acabin apareixent una varietat d'anormalitats cromosòmiques que van des de mutacions específiques a dany dels cromosomes (100). Els canvis més significatius en la transició de displàsia a metaplàsia són: 1) l'increment del grau d'hipometilació de l'ADN genòmic que

augmenta a mesura que la lesió prolifera de benigna a invasiva; 2) les modificacions postraduccionals d'histones que indueixen inflamació i reprimeixen gens supressors de tumors; i 3) la hipermetilació de gens que es troben involucrats amb el cycle cel·lular, la reparació de l'ADN, les interaccions cel·lulars, l'apoptosi i l'angiogènesi (100).

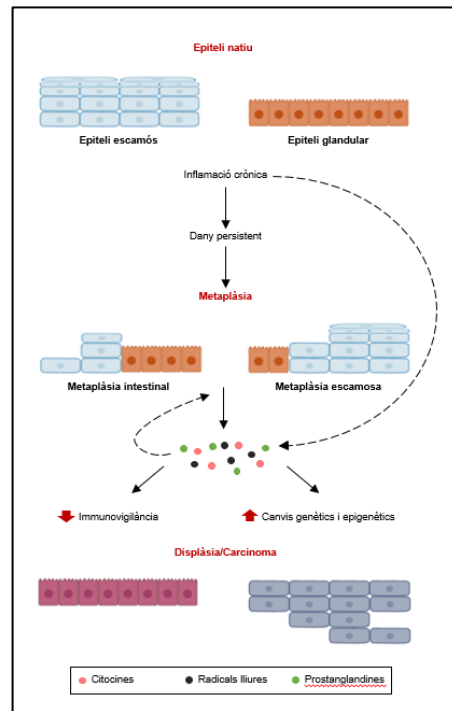


Figura 13. Esquema representatiu del desenvolupament de la metaplàsia associat a carcinogènesi.

En resposta al dany persistent i a una inflamació crònica es produeix una metaplàsia. Aquesta resposta adaptativa està associada a una expressió alterada de citocines, radicals lliures i factors immunosupressors. Aquests factors produïts tant per cèl·lules epitelials com inflamatòries promouen l'aparició de metaplàsia, i si es mantenen en el temps poden promoure l'aparició de displàsia i carcinoma. Esquema modificat de Herfs *et al.* (100).

1.3.3. Metaplàsia gàstrica com precursora de displàsia en MII

1.3.3.1. Metaplàsia gàstrica

La metaplàsia pilòrica, també anomenada pseudopilòrica, mucinosa o foveolar, representa la substitució de l'epiteli d'origen per un epiteli de cèl·lules columnars que recorda l'epiteli foveolar gàstric o pilòric, o l'epiteli glandular mucinós (109,110). No obstant això, el terme metaplàsia gàstrica (MG) seria el més acurat per englobar totes aquestes troballes histològiques (110,111). Aquest procés metaplàstic s'ha observat tant dins del propi epiteli del cos i

fundus gàstric com a altres òrgans del tracte gastrointestinal com són el duodè, l'intestí prim, el còlon, la bufeta biliar i el pàncrees(110).

Habitualment la MG s'origina a zones ulcerades, i es caracteritza per la presència d'un epitelí columnar, mucinós, amb un citoplasma pàl·lid i nuclis basals. A nivell immunohistoquímic, expressa mucines de l'epitelí gàstric com MUC5AC i MUC6, però no expressa mucines intestinals com MUC2, i presenta una expressió reduïda de CDX2, un marcador d'immunofenotip intestinal que s'expressa a la major part de les cèl·lules intestinals (110,112) (Fig. 14).

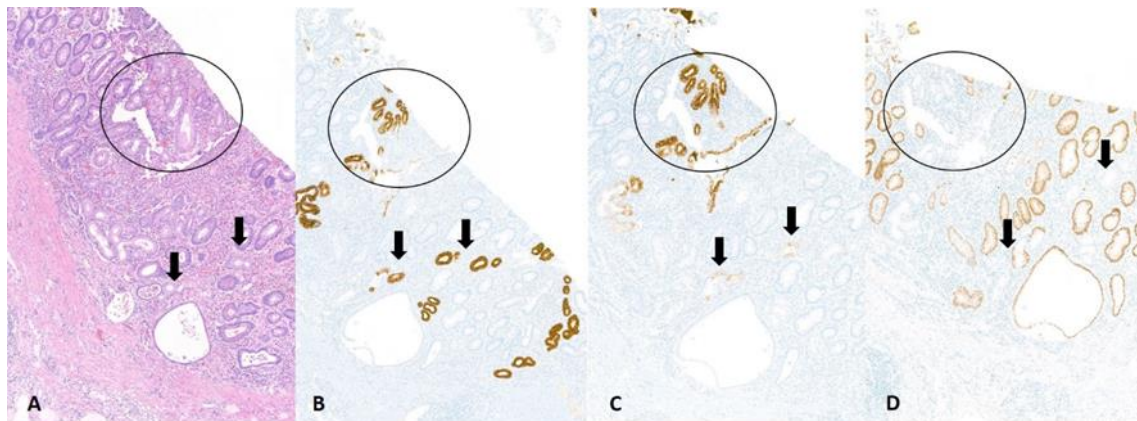


Figura 14. Imatge histològica i comportament immunohistoquímic de la MG de tipus foveolar (cercle) i de tipus pilòric (fletxes) en una mucosa còlica amb malaltia de Crohn. **A)** Secció histològica on s'identifica a la superfície la metaplàsia foveolar i a nivell més profund la metaplàsia pilòrica (HE, 5X). **B)** Tinció IHQ de MUC6, que mostra expressió intensa a la metaplàsia pilòrica i a la foveolar (5X). **C)** Tinció IHQ de MUC5AC, mostrant positivitat principalment a la metaplàsia foveolar, i positivitat dèbil a la pilòrica (5X). **D)** Tinció IHQ amb CDX2, que mostra positivitat a l'epitelí intestinal i pèrdua d'expressió a la metaplàsia gàstrica (5X).

La MG es considera una reacció defensiva de la mucosa contra un dany ulceratiu, ja que les mucines que produeix promouen factors de creixement i la restitució epitelial (109,110). A més a més, la MG pot persistir tot i haver finalitzat el procés de reparació, per tant, la seva presència es pot considerar un indicatiu d'un antecedent de dany inflamatori crònic a la mucosa (113).

Hi ha indicis de l'associació de la MG amb la displàsia a l'estómac, al duodè i a la bufeta biliar, on es creu que la seva presència és un pas previ a la metaplàsia intestinal que pot comportar evolució a displàsia i adenocarcinoma (107,109). En el cas de l'intestí prim i el còlon, la informació sobre el possible paper de la MG en la seqüència displàsia-carcinoma és escassa.

1.3.3.2. Metaplàsia gàstrica al còlon

a) Inflamació i metaplàsia gàstrica

La presència de MG a l'intestí és un indicador de cronicitat d'una malaltia o d'un procés inflamatori subjacent com a resposta adaptativa de la mucosa intestinal a un procés d'inflamació aguda o ulceració perllongat en el temps (114). Al còlon i íleum, està associada a diferents escenaris de dany crònic com infeccions, intervencions prèvies, presa d'AINEs i enteritis regionals com la MII, considerant-se aquesta última la causa més freqüent (109,111).

L'existència de MG a l'intestí de pacients amb MII primerament va ser descrita en pacients amb MC a nivell d'intestí prim, tot i que més endavant s'ha descrit també en diferents trams del còlon i en pacients amb CU (111). La seva prevalença és major en pacients menors de 50 anys que presenten una inflamació severa i activa de MC amb afectació d'intestí prim. En el cas de la CU, la MG s'observa més freqüentment en pacients més grans a nivell de còlon i recte (111). El fet que la MII cursi amb episodis recorrents d'inflamació severa, produeix una pèrdua epitelial i degradació de la matriu extracel·lular evidenciada per la presència d'erosions i úlceres, que provoca un regeneració constant de l'epiteli, produint-li canvis de cronicitat que van des de la distorsió de les criptes, la plasmocitosi basal, la infiltració difusa d'infiltrat inflamatori limfoplasmocitari a la làmina pròpia, els agregats limfoides, la metaplàsia de cèl·lules de Paneth, i finalment la MG (103).

b) Metaplàsia gàstrica i displàsia

Tant lesions precursors de la via de l'adenoma convencional clàssic com lesions de la via serrada s'han descrit en casos de displàsia associada a MII. No obstant això, sembla que és a les lesions de DNC associades a MII on s'ha observat que el desenvolupament de la displàsia es troba estretament relacionat amb la via inflamatòria de carcinogènesi del CCR (43–45,90,115). Aquest fet coincideix amb la recent descripció del fenotip gàstric en algunes de les DNC, realitzat per Harpaz *et al.*, i que pot correspondre a MG (94).

Recentment s'ha descrit a la via serrada de carcinogènesi del CCR, una possible relació amb la MG secundària a un procés inflamatori (116).

Morfològicament, la MG en pòlips serrats es pot veure pel seu recobriment a la superfície, que recorda histològicament a l'epiteli foveolar gàstric, així com també pel seu comportament immunohistoquímic, observant-se positivitat per MUC5AC a les lesions serrades sèssils i als pòlips hiperplàstics, i pèrdua parcial de CDX2 a ambdues lesions (116).

Chen *et al.* descriuen que s'ha observat una signatura genètica semblant a la mucosa gàstrica a les cèl·lules mare de les LSS, a diferència de les dels adenomes, que concorden més amb la mucosa còlica. Es postula que una disbiosi de la microbiota pot provocar un dany i reparació de la mucosa còlica donant lloc a una MG. Posteriorment, degut a un estrès oxidatiu, la MG mutaria en *BRAF* desenvolupant una LSS, i mitjançant la hipermetilació de *MLH1* acabaria generant l'adenocarcinoma com a resultat del seu perfil hipermutacional degut al microambient citotòxic (116,117) (Fig. 15).

Aquesta associació MG-CCR a través de LSS obre nous plantejaments del desenvolupament del CCR, i descriu per primera vegada al còlon la metaplàsia com a un esdeveniment previ a la displàsia. Basant-nos en aquest fet i tenint en compte que la presència de MG està descrita a la MII secundària a la inflamació perllongada, i també en algunes lesions de DNC considerades precursors associades al CaMII, es podria considerar que la MG podria jugar un paper rellevant en les etapes primerenques de la via carcinogènica de la MII, i ambdues vies, la serrada i la associada a MII, compartrien la MG com a pas previ a la displàsia, seguint la seqüència “inflamació crònica- metaplàsia- displàsia-carcinoma”, fet, que fins a dia d'avui, no s'ha explorat (Fig. 15).

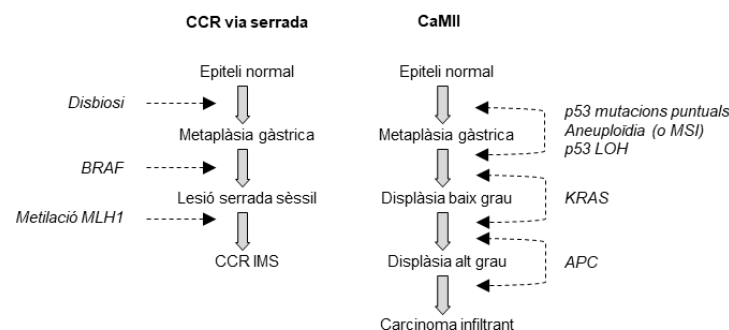


Figura 15. Paper de la metaplàsia gàstrica al CCR. Tant a la via serrada com a la via de la inflamació la MG inicia el procés de carcinogènesi previ a l'aparició de la displàsia per diferents mecanismes, seguit de diverses alteracions genètiques que difereixen segons la via de carcinogènesi. Esquema combinat de JSpeert *et al.* i Leedham *et al.* (69,117).

2. HIPÒTESI

El carcinoma colorectal associat a la malaltia inflamatòria intestinal es desenvolupa seguint la seqüència “inflamació crònica-displàsia-carcinoma” i es caracteritza principalment per alteracions precoces de *TP53*. La via de carcinogènesi serrada, per contra, no sol presentar aquesta mutació, i es caracteritza per mutacions de *BRAF* i presentar inestabilitat de microsatèl·lits. Recentment s’ha descrit en aquesta via, la presència de MG com a resultat de l’estrès crònic a la mucosa, on s’iniciaria la carcinogènesi serrada.

Donat que ambdues vies de carcinogènesi del CCR, la serrada i la inflamatòria, comparteixen la mateixa seqüència “inflamació crònica-displàsia- carcinoma” podem formular la hipòtesi que a la malaltia inflamatòria intestinal es poden trobar CCR originats a través de la via serrada. A més, com a ambdues vies existeix un substrat d’estrès al còlon podem hipotitzar que, tot i presentar alteracions moleculars diferents, comparteixen la MG com a mecanisme d’adaptació a l’estrès crònic de la mucosa i com a lesió on es desenvolupa la displàsia.

3.OBJECTIUS

3.1 OBJECTIU PRINCIPAL

Explorar la presència de marcadors moleculars de via serrada al CaMII per diferenciar ambdues vies i explorar si la metaplàsia gàstrica contribueix a la carcinogènesi de la via inflammatòria seguint la seqüència “inflamació crònica → metaplàsia gàstrica → displàsia → carcinoma” estudiant els carcinomes, les lesions precursors i la mucosa adjacent d’ambdues lesions en peces de colectomia afectes per MII.

3.2 OBJECTIUS SECUNDARIS

1. Identificar tipus de displàsies no convencionals i la seva distribució en peces de colectomia afectes per malaltia de Crohn i colitis ulcerosa amb i sense carcinomes concomitants.
2. Explorar l’expressió de marcadors de via serrada a les lesions de displàsia convencional i no convencionals per establir la seva relació amb el carcinoma associat a MII.
3. Identificar la presència de metaplàsia gàstrica a les lesions de displàsia convencional i no convencionals per establir quin paper juga a la via inflammatòria de carcinogènesi.

4. COMPENDI DE PUBLICACIONS

3.1. ARTICLE 1

Alterations in p53, Microsatellite Stability and Lack of MUC5AC Expression as Molecular Features of Colorectal Carcinoma Associated with Inflammatory Bowel Disease

Míriam Gené , Míriam Cuatrecasas , Irene Amat, Jesús Alberto Veiga, María Jesús Fernández Aceñero, Victòria Fusté Chimisana, Jordi Tarragona, Ismael Jurado, Rebeca Fernández-Victoria, Carolina Martínez Ciarpaglini, Cristina Alenda González, Carlos Zac, Pilar Ortega de la Obra 15, María Teresa Fernández-Figueras, Manel Esteller and Eva Musulen

International Journal of Molecular Sciences 2023. Vol 24, Num. 10, Pg 1-17

PMID: 37240002 PMCID: PMC10217841 DOI: 10.3390/ijms24108655

Factor d'impacte: 5.6

Quartil: 1 (Biochemistry and Molecular Biology)



Article

Alterations in p53, Microsatellite Stability and Lack of MUC5AC Expression as Molecular Features of Colorectal Carcinoma Associated with Inflammatory Bowel Disease

Miriam Gené ^{1,2,†}, Míriam Cuatrecasas ^{3,4,†}, Irene Amat ⁵, Jesús Alberto Veiga ⁶,
María Jesús Fernández Aceñero ⁷, Victòria Fusté Chimisana ⁸, Jordi Tarragona ⁹, Ismael Jurado ¹⁰,
Rebeca Fernández-Victoria ¹¹, Carolina Martínez Ciarpaglini ¹², Cristina Alenda González ¹³, Carlos Zac ¹⁴,
Pilar Ortega de la Obra ¹⁵, María Teresa Fernández-Figueras ^{16,17}, Manel Esteller ^{18,19,20,21}
and Eva Musulen ^{16,18,*}



Citation: Gené, M.; Cuatrecasas, M.; Amat, I.; Veiga, J.A.; Fernández Aceñero, M.J.; Fusté Chimisana, V.; Tarragona, J.; Jurado, I.; Fernández-Victoria, R.; Martínez Ciarpaglini, C.; et al. Alterations in p53, Microsatellite Stability and Lack of MUC5AC Expression as Molecular Features of Colorectal Carcinoma Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8655. <https://doi.org/10.3390/ijms24108655>

Academic Editor: Carmine Stolfi

Received: 29 March 2023

Revised: 7 May 2023

Accepted: 8 May 2023

Published: 12 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Pathology Department, Hospital Universitari Joan XXIII, 43005 Tarragona, Spain; miriamgehi@hotmail.com
- ² Surgery Department, Programme of Surgery and Morphological Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Barcelona, Spain
- ³ Pathology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Universitat de Barcelona (UB), 08007 Barcelona, Spain; mkuatrec@clinic.cat
- ⁴ School of Medicine, Campus Clínic, Universitat de Barcelona (UB), 08036 Barcelona, Spain
- ⁵ Pathology Department, Complejo Hospitalario de Navarra, 31008 Navarra, Spain; irene.amat.villegas@navarra.es
- ⁶ Pathology Department, Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol, 15405 Ferrol, Spain; jesus.alberto.veiga.barreiro@sergas.es
- ⁷ Pathology Department, Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain; mogg10167@gmail.com
- ⁸ Pathology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain; vfuste@santpau.cat
- ⁹ Pathology Department, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, 25198 Lleida, Spain; jtarragona@gss.cat
- ¹⁰ Pathology Department, Consorci Sanitari de Terrassa, 08227 Terrassa, Spain; ijurado@cst.cat
- ¹¹ Pathology Department, Hospital Álvaro Cunqueiro, 36312 Vigo, Spain; rebeca.fernandez.victoria@sergas.es
- ¹² Pathology Department, Hospital Clínic Universitario de Valencia, Valencia INCLIVA-Instituto de Investigación Sanitaria, Universidad de Valencia, 46010 Valencia, Spain; carolaciarpaglini@gmail.com
- ¹³ Pathology Department, Hospital General Universitario Dr. Balmis, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), 03010 Alicante, Spain; alenda.cris@gmail.com
- ¹⁴ Pathology Department, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, 46026 Valencia, Spain; carloszacromero@gmail.com
- ¹⁵ Pathology Department, Hospital General de Segovia, 40002 Segovia, Spain; mportegao@saludcastillayleon.es
- ¹⁶ Pathology Department, Hospital Universitari General de Catalunya-Grupo QuironSalud, Sant Cugat del Vallès, 08195 Barcelona, Spain; maite.ffigueras@quironsalud.es
- ¹⁷ School of Medicine, Campus Sant Cugat del Vallès, Universitat Internacional de Catalunya (UIC), Sant Cugat del Vallès, 08017 Barcelona, Spain
- ¹⁸ Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC), Badalona, 08916 Barcelona, Spain; mesteller@carrerasresearch.org
- ¹⁹ Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08010 Barcelona, Spain
- ²⁰ Faculty of Medicine and Health Sciences, Department of Physiological Sciences, Universitat de Barcelona (UB), 08007 Barcelona, Spain
- ²¹ Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC), 28029 Madrid, Spain
- * Correspondence: eva.musulen@quironsalud.es or emusulen@carrerasresearch.org
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Colitis-associated colorectal carcinoma (CAC) occurs in inflammatory bowel disease (IBD) because of the “chronic inflammation-dysplasia-cancer” carcinogenesis pathway characterized by p53 alterations in the early stages. Recently, gastric metaplasia (GM) has been described as the initial event of the serrated colorectal cancer (CRC) process, resulting from chronic stress on the colon mucosa. The aim of the study is to characterize CAC analyzing p53 alterations and microsatellite instability (MSI) to explore their relationship with GM using a series of CRC and the adjacent intestinal mucosa. Immunohistochemistry was performed to assess p53 alterations, MSI and MUC5AC expression as a surrogate for GM. The p53 mut-pattern was found in more than half of the CAC, most frequently stable (MSS) and MUC5AC negative. Only six tumors were unstable (MSI-H), being with p53

wt-pattern ($p = 0.010$) and MUC5AC positive ($p = 0.005$). MUC5AC staining was more frequently observed in intestinal mucosa, inflamed or with chronic changes, than in CAC, especially in those with p53 wt-pattern and MSS. Based on our results, we conclude that, as in the serrated pathway of CRC, in IBD GM occurs in inflamed mucosa, persists in those with chronic changes and disappears with the acquisition of p53 mutations.

Keywords: intestinal bowel disease; colorectal cancer; MUC5AC expression; gastric metaplasia; DNA-damage response

1. Introduction

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are pathologies with a two- to three-fold increased risk of colorectal cancer (CRC) [1,2]. Likewise, colitis-associated colorectal cancer (CAC) is the leading cause of death among long-standing inflammatory bowel disease (IBD) patients [3]. The continuous inflammatory stress of the colonic mucosa, with constant epithelial lesion repair and alterations of the microbiota, damage the colonic epithelia leading to dysplasia. As a result, CAC appears following the same pattern of distribution as inflammation in the different IBD subtypes. In CD, neoplasms are most often located in the small bowel or on the right side of the colon, whereas in UC tumors are usually located in the rectum and left colon. CACs are more frequently poorly differentiated, mucinous or signet ring cell carcinomas [4]. Recently, similar characteristics between CAC and CRC with microsatellite instability high (MSI-H), whether sporadic MSI-H or Lynch syndrome (LS)-related, have been described [5–7].

The sequence “chronic inflammation-dysplasia-cancer” should determine the driving genes that guide this carcinogenesis pathway of CRC, which is different from the canonical and serrated pathways [8]. In this “inflammatory” context the Wnt-signaling pathway is not involved, and *TP53* alterations appear early and with different hotspot mutations as opposed to the canonical pathway where *TP53* plays a role at later stages [9–12]. In addition, copy number alterations are frequently found involving genes such as *c-MYC*, *IRS2* and *HER2* as well as mutations in *BRAF* and *IDH1* and the activation of transforming growth factor β related to the epithelial-mesenchymal transition [10,13,14]. In LS, the mutation of genes of the mismatch repair (MMR) system (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*) are the hallmark of this hereditary cancer predisposition syndrome [15]. In the serrated pathway, the mutation of genes in the MAP kinases cascade, especially *BRAF*, and the methylation of CpG islands are the main effectors [16].

In CD the presence of metaplastic changes such as pyloric gland metaplasia or gastric foveolar metaplasia have been described in the small bowel mucosa or in pouchitis in long-standing disease [17–22]. Recently, gastric metaplasia (GM) has been identified as a substrate for the initiation of the serrated pathway of CRC, due to the continuous lesion of the colonic epithelium of the right colon [23]. Hence, considering that both the serrated and IBD-associated pathways share the sequence “inflammation-dysplasia-carcinoma”, we hypothesize that they could have a common origin in GM, as a mechanism of adaptation to colonic mucosal stress.

The aims of the study are to characterize CAC analyzing p53 alterations and microsatellite instability (MSI) and to explore their relation to GM.

2. Results

2.1. Patients and Specimens

A total of 57 CACs were studied from 38 (72%) men and 15 (28%) women, all Caucasian, aged between 34 and 90 years (mean 62.6), 34 (64%) with UC and 19 (36%) with CD.

According to location, CAC in patients with CD were more frequently located in the ileum (7/19, 37%) and the right colon (6/19, 31.5%), whereas CAC in patients with UC were more frequent in the left colon (15/38, 39.5%). This distribution was statistically

significant ($p = 0.003$). All eight (21%) synchronous tumors were found in UC which was statistically significant ($p = 0.042$). In most cases (29/53, 55%) the colectomy mucosa showed active inflammation. Regarding histology, the majority of CRC (47/57, 82.5%) were adenocarcinomas in both CD and UC. Intestinal mucosa adjacent to the tumor was identified in 35 (61.4%) cases mostly with chronic changes, especially in UC. According to staging, stage III was more frequent in CD (10/19, 52.6%) while in UC the most prevalent was stage II (17/38, 44.7%) (Table 1).

Table 1. Clinicopathological features of IBD patients and adenocarcinomas.

	Crohn's Disease (%)	Ulcerative Colitis (%)	Total (%)	<i>p</i> Value
Patients	19 (36)	34 (64)	53 (100)	
Age Mean years [range]	58.4 [35–88]	64.8 [34–90]	62.6 [34–90]	
Gender				1.000
Male	14 (74)	24 (71)	38 (72)	
Female	5 (26)	10 (29)	15 (28)	
IBD duration				0.244
Mean years [range]			13.2 [1–43]	
Concomitant *	5 (26)	2 (6)	7 (13.2)	
≤8 years	4 (21)	13 (38)	17 (32.1)	
9–15 years	3 (16)	7 (20.6)	10 (18.9)	
16–20 years	1 (5)	5 (14.7)	6 (11.3)	
>21 years	5 (26)	6 (17.6)	11 (20.8)	
Unknown	1 (5)	1 (3)	2 (3.8)	
IBD activity				0.780
Active	11 (58)	18 (53)	29 (55)	
Quiescent	8 (42)	16 (47)	24 (45)	
Synchronous CRC ($n = 57$)				0.042
Non synchronous CRC	19 (100)	30 (79)	49 (86)	
2 synchronous CRC	0	8 (21)	8 (14)	
Adenocarcinoma location ($n = 57$)				0.003
Ileum	7 (37)	0	7 (12.3)	
Right colon	6 (31.5)	11 (28.9)	17 (29.8)	
Left colon	3 (16)	15 (39.5)	18 (31.6)	
Rectum	1 (5)	6 (15.8)	7 (12.3)	
Colon	2 (10.5)	5 (13.2)	7 (12.3)	
Ileal reservoiry	0	1 (2.6)	1 (1.8)	
Histology ($n = 57$)				0.504
Adenocarcinoma NOS	15 (78.9)	32 (84.2)	47 (82.5)	
Mucinous	3 (15.8)	4 (10.5)	7 (12.3)	
Mucinous and signet ring cell	1 (5.3)	0	1 (1.8)	
Medullary	0	1 (2.6)	1 (1.8)	
Undifferentiated	0	1 (2.6)	1 (1.8)	
Histologic grade ($n = 57$)				1.000
Low-grade	15 (79)	31 (82)	46 (81)	
High-grade	4 (21)	7 (18)	11 (19)	
Adjacent mucosa to adenocarcinoma ($n = 57$)				0.077
Absent	10 (53)	12 (32)	22 (39)	
Present	9 (47)	26 (68)	35 (61)	
Active inflammation	0	4 (15)	4 (11.4)	
Chronic changes	4 (21)	15 (58)	19 (54.3)	
Normal	5 (26)	7 (27)	12 (34.3)	
Stage (8th ed) ($n = 57$)				0.305
I	3 (15.8)	9 (23.7)	12 (21)	
II	6 (31.6)	17 (44.7)	23 (40)	
III	10 (52.6)	12 (31.6)	22 (39)	

Abbreviations: IBD, intestinal bowel disease; NOS, not otherwise specified. Concomitant*, in this case the diagnosis of IBD was made at colectomy.

2.2. Immunohistochemistry

2.2.1. p53, MUC5AC and MSI in Adenocarcinoma

The p53-mut pattern (defined in Section 4) was found in more than half (29/57, 51%) of the adenocarcinomas (22 with overexpression and 7 with null pattern). The differences in the distribution of both expression patterns between CD and UC were not statistically significant (Table 2).

Table 2. Expression of p53, MSI and MUC5AC in CAC according to IBD subtypes.

		Crohn's Disease (%)	Ulcerative Colitis (%)	Total (%)	p Value
p53 pattern					0.914
mut-pattern	Overexpression	8 (42)	14 (37)	22 (39)	
	Null pattern	2 (11)	5 (13)	7 (12)	
wt-pattern	Focal nuclear staining	9 (47)	19 (50)	28 (49)	
Microsatellite instability					0.389
	MSI-H	3 (16)	3 (8)	6 (11)	
	MSS	16 (84)	35 (92)	51 (89)	
MUC5AC					0.511
Negative		10 (52.6)	22 (57.9)	32 (56.1)	
Positive	Extensive	2 (10.5)	7 (18.4)	9 (15.8)	
	Focal	7 (36.8)	9 (23.7)	16 (28.1)	

Abbreviation: mut, mutation; wt, wild type; MSI-H, microsatellite instability high grade; MSS, microsatellite stable.

When MSI was analyzed, we identified only six (11%) tumors that were unstable (MSI-H), all with a lack of expression for MLH1/PMS2, with the same distribution in both IBD subtypes (Table 2).

MUC5AC staining was identified in 44% of CACs, 9 adenocarcinomas with positivity in more than 50% of the tumor (extensive expression) and 16 with focal expression. The differences in the distribution of both expression patterns between CD and UC were not statistically significant (Table 2).

2.2.2. Relation of the Three IHC Markers in Adenocarcinoma

Analyzing p53 expression with MSI, we observed that the six unstable tumors were p53 wt-pattern (100%), and most of the stable tumors presented a p53 mut-pattern (29/51, 57%) establishing a statistically significant relation ($p = 0.010$) (Table 3).

Table 3. Relation between p53 immunohistochemical patterns and MSI.

	Microsatellite Instability			
	MSI-H (%)	MSS (%)	Total (%)	p Value
p53 pattern				0.010
mut-pattern	0	29 (57)	29 (51)	
wt-pattern	6 (100)	22 (43)	28 (49)	

Abbreviation: MSI-H, microsatellite instability high-grade; MSS, microsatellite stable; mut, mutation; wt, wild type.

When we analyzed p53 according to MUC5AC expression, we found that 60% of CACs with MUC5AC expression had a p53 wt-pattern. In contrast, 59% of CACs with p53 mut-pattern were MUC5AC negative. Nevertheless, this distribution was not statistically significant (Table 4 and Figure 1).

Table 4. Relation of p53 and MUC5AC expression in CAC.

	MUC5AC		Total (%)	p Value
	Negative (%)	Positive (%)		
p53 pattern				0.186
mut-pattern	19 (59)	10 (40)	29 (51)	
wt-pattern	13 (41)	15 (60)	28 (49)	

Abbreviation: mut, mutation; wt, wild type.

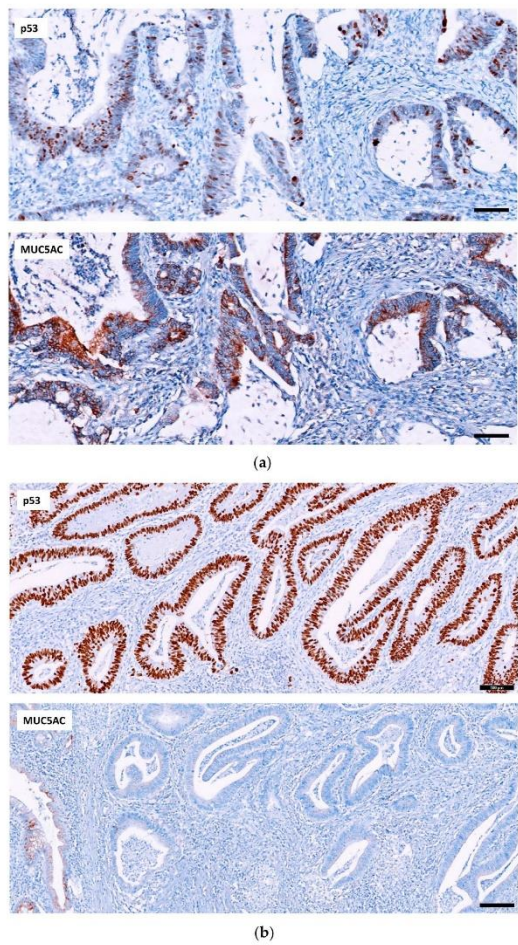


Figure 1. Two CACs with different expression of p53 and MUC5AC. (a) p53 shows a wt-pattern with focal nuclear staining in tumor cells. In the same tumor, MUC5AC expression is diffuse (20×, scale bar 50 μm). (b) In this other tumor, nuclear overexpression is observed in the form of mut-pattern staining of p53 while MUC5AC is negative. Note the MUC5AC positivity in non-dysplastic glands on the left side (10×, scale bar 100 μm).

Analyzing the relation between MUC5AC expression and MSI, a statistically signifi-
cation was found, with all MSI-H CACs being positive for MUC5AC and all MSS CACs
being MUC5AC negative (Table 5).

Table 5. Relation between MUC5AC expression and MSI.

	MUC5AC		Total (%)	p Value
	Negative (%)	Positive (%)		
Microsatellite instability				0.005
MSI-H	0	6 (24)	6 (11)	
MSS	32 (100)	19 (76)	51 (89)	

Abbreviation: MSI-H, microsatellite instability high-grade; MSS, microsatellite stable.

The clinicopathological characteristics and IHC expression of MSI-H CAC are shown
in Figure 2 and Table 6. Of notice, these adenocarcinomas were in the ileum or right
colon and showed histological features characteristic of sporadic MSI-H or LS-associated
CRC—i.e., medullary, mucinous or signet ring cell carcinomas.

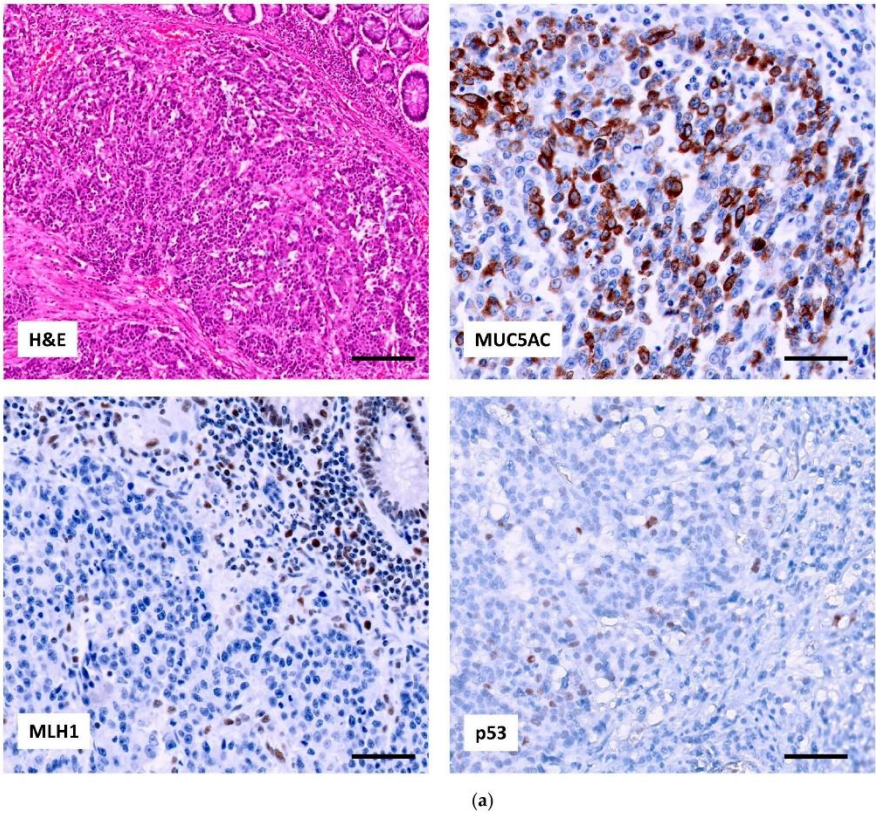


Figure 2. Cont.

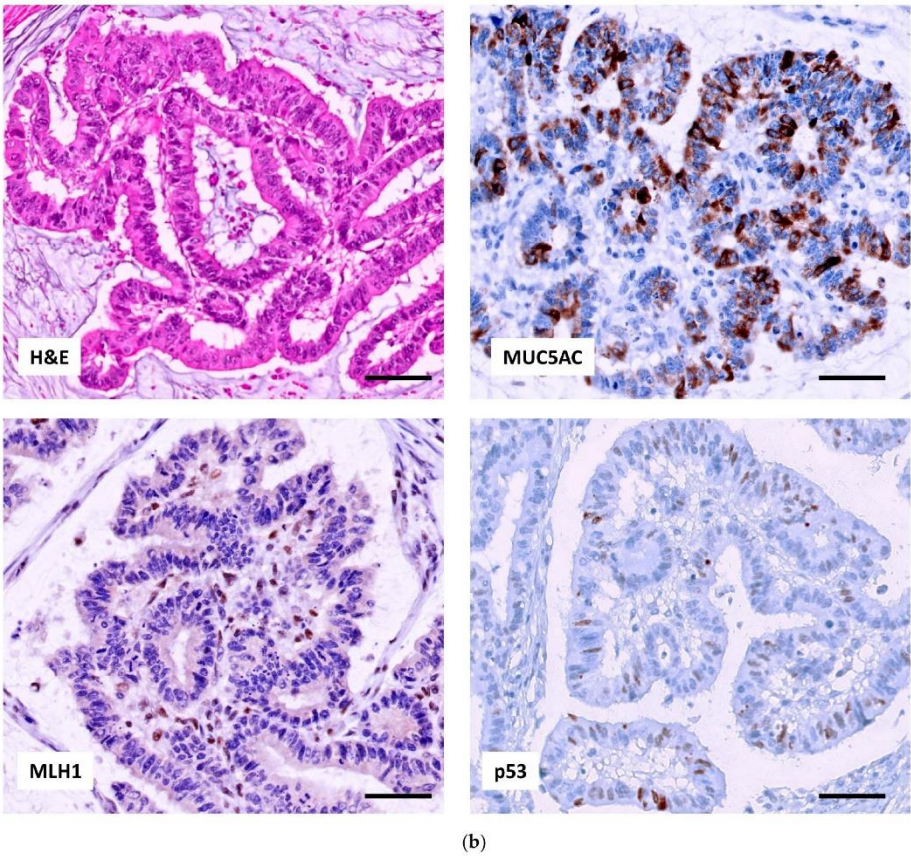


Figure 2. Two examples of MSI-H CAC. (a) medullary and (b) mucinous. In both adenocarcinomas p53 showed scattered nuclear positivity corresponding to a wt-pattern, MUC5AC expression was focal positive, and MLH1 showed an absence of nuclear staining in tumor cells. Note in both MLH1 staining the positive internal control in lymphocytes (20×, scale bar 50 µm).

Table 6. Clinicopathological and IHC features of unstable CRC.

Patient	Age (Years)	Gender	IBD	IBD Duration (Years)	Location	Histology	p53 Pattern	MUC5AC	MLH1	BRAF Status	MLH1 Methylation	Predisposition to Cancer
8	73	Male	UC	12	Right colon	Medullary	wt	Focal positive	Negative	V600E	NP	Sporadic vs. IBD-associated
8					Right colon (transvers)	NOS with mucinous component	wt	Focal positive	Negative	V600E	NP	Sporadic vs. IBD-associated
14	52	Male	UC	4	Right colon	NOS	wt	Extensive positive	Negative	wt	No methylated	Lynch syndrome

Table 6. Cont.

Patient	Age (Years)	Gender	IBD	IBD Duration (Years)	Location	Histology	p53 Pattern	MUC5AC	MLH1	BRAF Status	MLH1 Methylation	Predisposition to Cancer
20	50	Male	CD	Concomitant	Ileum	NOS with mucinous component	wt	Extensive positive	Negative	wt	NP	Unknown
24	54	Male	CD	1	Ileum	NOS	wt	Focal positive	Negative	wt*	NP	Unknown
53	52	Female	CD	2	Right colon	Mucinous and signet ring cell	wt	Extensive positive	Negative	wt	NP	Unknown

Abbreviations: IBD, Intestinal bowel disease; UC, ulcerative colitis; CD, Crohn's disease; wt, wild type; IHC, immunohistochemistry; NP, not performed. wt*, in this case a G13D mutation in *KRAS* was identified.

Only one patient with MSH-H CAC was affected by LS, and another had two synchronous sporadic tumors harboring the V600E *BRAF* mutation. The remaining unstable CRCs were *BRAF* wild type, and the hypermethylation of *MLH1* was not performed.

2.2.3. p53 and MUC5AC Expression in the Mucosa Adjacent to Adenocarcinomas

To determine whether p53 and MUC5AC staining were present in the non-tumoral intestinal mucosa, we explored the mucosa adjacent to the adenocarcinomas, which was available in 35 cases, 1 from the small intestine and 34 from the colon.

p53 immunostaining showed focal positivity in the nuclei of the glands surrounding the adenocarcinomas in all cases, corresponding to wt-pattern.

MUC5AC immune-expression was found in 77% (27/35) of the mucosa adjacent to CAC, being in the ileum (100%, 1/1), in 70% (7/10) of the mucosa located in the right colon, in 80% in the left colon (12/15) and in 100% (4/4) of the rectal mucosa. Regarding the type of lesion, MUC5AC was positive in all cases with active inflammation, in 79% (15/19) of the mucosa with chronic changes and in 67% (8/12) of the mucosa without morphological lesions, although these differences were not statistically significant (Figure 3).

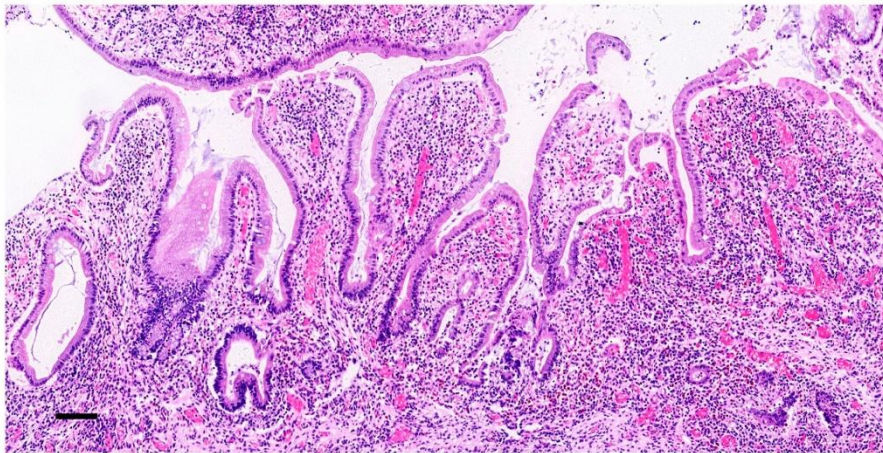


Figure 3. Cont.

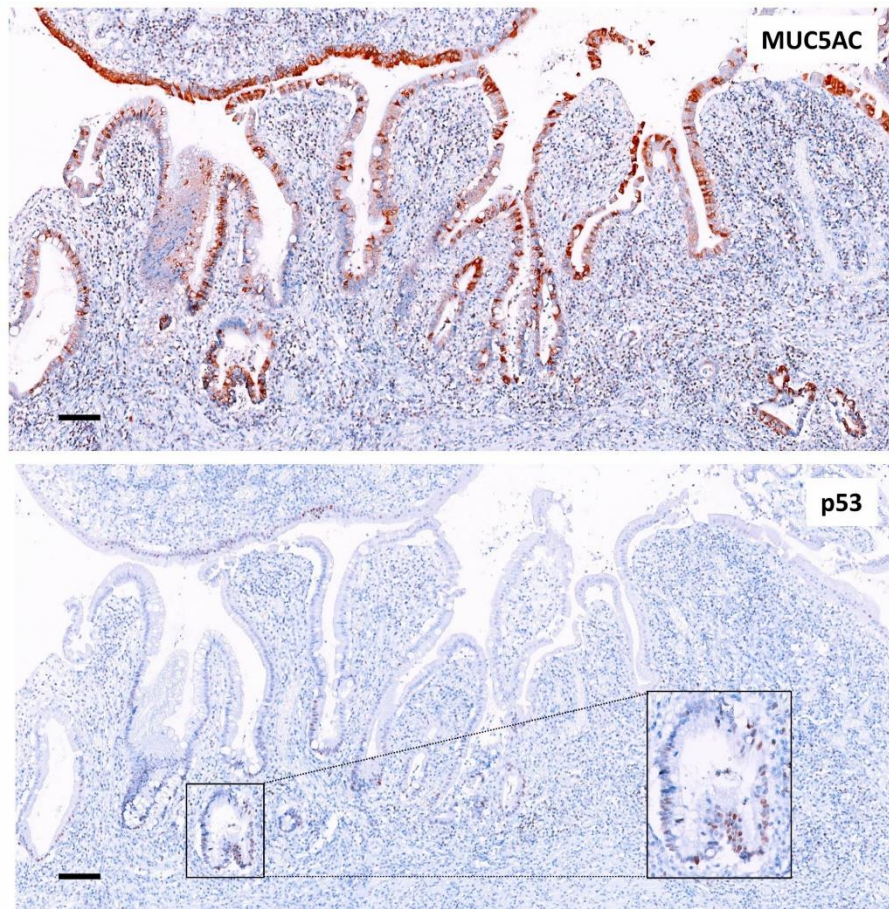


Figure 3. Colon mucosa adjacent to a CAC. Severe distortion of colonic epithelia with chronic inflammation, glandular atrophy and granulation tissue (H&E, 10 $\times$, scale bar 100 μ m). Strong expression of MUC5AC was seen in the epithelium re-epithelizing the granulation tissue and in part of the irregular glands (10 $\times$, scale bar 100 μ m). p53-wt pattern showed few positive nuclei in the surface epithelium and in the glands (10 $\times$, scale bar 100 μ m; in magnification, 40 $\times$).

The relation between MUC5AC expression in adenocarcinoma and adjacent mucosa was not statistically significant. MUC5AC-positive non-tumoral mucosa was adjacent to negative adenocarcinoma in more than 60% (16/27), and MUC5AC-negative mucosa was adjacent to positive or negative adenocarcinoma in the same proportion (50%, 4/8) (Table 7 and Figure 4).

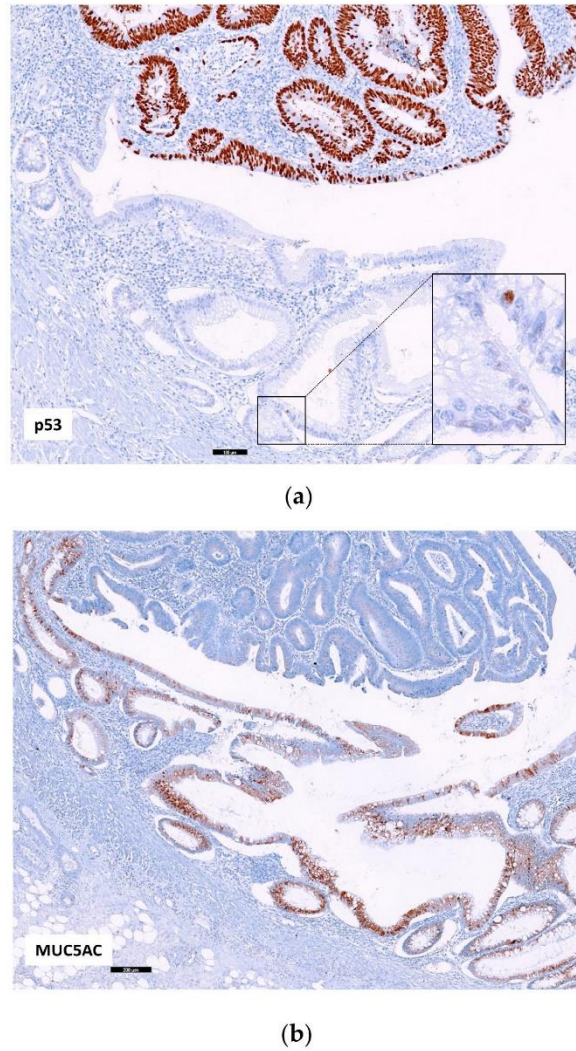


Figure 4. Colonic mucosa with chronic changes adjacent to a CAC. (a) p53 staining showed a wt-pattern with few positive nuclei (in magnification) in the colon glands adjacent to an adenocarcinoma with p53 nuclei overexpression (p53 mut-pattern) (10 $\times$, scale bar 100 μ m). (b) MUC5AC strongly positive in the colon mucosa adjacent to a negative neoplasm (5 $\times$, scale bar 200 μ m).

Table 7. Expression of MUC5AC in mucosa adjacent to adenocarcinomas.

	MUC5AC			p Value
	Negative (%)	Positive (%)	Total (%)	
Adjacent mucosa (n = 35)				1.000
Location				
Colon	8 (100)	26 (96)	34 (97)	
Small bowel	0	1 (4)	1 (3)	
Specific location				0.614
Ileum	0	1 (4)	1 (3)	
Right	3 (37.5)	7 (26)	10 (29)	
Left	3 (37.5)	12 (44)	15 (43)	
Rectum	0	4 (15)	4 (11)	
Colon	2 (25)	3 (11)	5 (14)	
Status				0.374
Active inflammation	0	4 (14.8)	4 (11.4)	
Chronic changes	4 (50)	15 (55.6)	19 (54.3)	
Normal	4 (50)	8 (29.6)	12 (34.3)	
MUC5AC in adenocarcinoma				0.700
Negative	4 (50)	16 (59)	20 (57)	
Positive	4 (50)	11 (41)	15 (43)	

3. Discussion

Colitis-associated colorectal cancer (CAC) is the result of the alteration of genes involved in the sequence of “chronic inflammation-dysplasia-cancer” which draw a different landscape from the other colorectal cancer pathways.

It is well known that p53 alterations appear in early stages even in the colon mucosa without dysplastic changes, contributing to establish a field cancerization [9,14]. In line with published data, in our series a pattern of p53 mutation was present in more than half of the CAC, independently of the IBD subtype [9–14]. However, not any of the p53 mut-patterns were found in any adjacent intestinal mucosa.

MSI-H in IBD, especially in UC, has been reported between 3 and 18% [5–7,24–30]. In our study, MSI-H was found in 10.5%, within the described range and with the same incidence in CD and UC. Furthermore, we found a statistical significance between p53 and MSI, such as that all p53 mut-pattern were stable tumors and all MSI-H CAC showed a p53 wt-pattern. Therefore, our results support a role for MSI in a subset of CAC. In addition, our unstable tumors had other clinical and pathological features of MSI-H CRC, such as the right location in the colon and histology of mucinous, medullary or signet ring cell carcinomas, in line with previous observations of other authors [5–7]. In our study, LS was excluded in one patient older than 70 years with UC and two synchronous tumors, since the molecular characteristics of both CRC and family history did not support LS diagnosis. Multifocal neoplasms are present in 38% of UC patients, and these synchronous neoplasms are usually heretogeneous [14]. In contrast, our patient had two MSI-H CACs which shared the molecular alterations and histological features probably due to both neoplasms appearing in the same side of the colon.

The other four patients with MSI-H CRC were in their 50s. One was a LS with UC of 4-year duration. The CRC was probably the result of the summatory risk of the two conditions. The presence of IBD and LS in the same patient is a rare situation given the scarce literature reporting these cases [31–37] and the low rate of germline mutations found in IBD patients [12]. Nevertheless, it is important to exclude LS in those MSI-H CACs to define the outcome in patients with early onset CRC, which is worse in the IBD-related group, intermediate in the sporadic group and best in the hereditary group [35]. In the

remaining three patients with MSI-H CRC, short course IBD and tumors with wt-*BRAF*, LS cannot be ruled out.

MUC5AC staining, characteristic of gastric foveolar epithelium [38], was identified in less than half (44%) of the CACs but was retained in 77% of the 35 available adjacent intestinal mucosa. The MUC5AC-positive CACs were more frequently those with a p53 wt-pattern and MSS, although MUC5AC expression was present in all cases with MSI-H. Furthermore, considering that most of the tumors with p53 mut-pattern lack MUC5AC expression, it can be deduced that the appearance of gastric epithelial change occurs in the inflamed mucosa, persists in those with chronic-regenerative changes and is maintained in CAC without p53 mutation, to finally disappear in parallel to the acquisition of p53 mutations. Our results agree with the recently published data by Chen et al. who identified GM as a substrate for the initiation of the serrated pathway of CRC, due to continuous injury of the colonic epithelium of the right colon [23]. Therefore, we could argue that GM is the change shared by CAC and serrated CRC in which the sequence “chronic inflammation-dysplasia-cancer” is initiated. Considering all this, we cannot rule out that the group of MSI-H CRC that appear in IBD, with characteristics like MSI-H sporadic tumors with *MLH1* hypermethylation, are nothing more than serrated pathway CRCs that appear in a context of continuous colon injury.

Further studies are needed to explore the expression of MUC5AC in dysplastic epithelia IBD-associated, an intermediate step between colon mucosa with chronic changes and the onset of neoplastic events of CAC.

4. Materials and Methods

We retrospectively reviewed a series of 53 IBD colectomies with CAC from 14 hospitals. Specimens were classified as CD or UC based on histology, radiological studies and clinical information collected from patient histories. Intestinal mucosa adjacent to the tumor was evaluated for the presence of inflammatory activity or chronic changes.

4.1. Immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections were analyzed using standard IHC techniques. The primary antibodies used were anti-p53 (clone DO-7, Ventana Medical Systems, Inc., 1910 E. Innovation Park Drive, Tucson, AZ, USA), anti-MUC5AC (clone MRQ-19, Ventana Medical Systems), anti-MLH1 (clone ES05, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK), anti-MSH2 (clone 79H11, Leica Biosystems), anti-MSH6 (clone EP49, Leica Biosystems) and anti-PMS2 (clone EP51, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK). Immunostaining was performed automatically using a Ventana BenchMark ULTRA machine (Roche, Basel, Switzerland) for p53 and MUC5AC and a Bond-III machine (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK) for the MMR antibodies. Immunostaining was independently evaluated by two pathologists (M.G. and E.M.).

For the evaluation of p53 immunostaining, we used the 3-level scores described by Köbel et al. that correlated with *TP53* alterations: the overexpression pattern, when strong and intense p53 staining was observed in all nuclei, and the complete absence (null pattern), when a total absence of nuclear staining was observed, were considered as surrogates for *TP53* mutation (p53-mut pattern) [39]. The wild-type pattern, corresponding to focal nuclear positivity of varying intensity, was considered normal (p53-wt pattern), even knowing that it could be a false negative for a mutated *TP53* [39] (Figure 5). An external positive control was included on each slide.

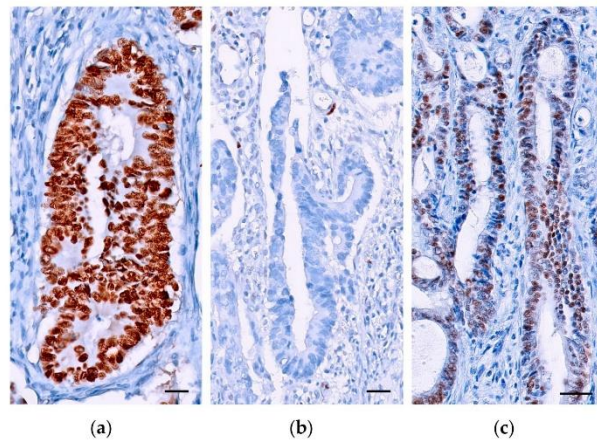


Figure 5. Three patterns of p53 staining. (a) Overexpression pattern, all tumor nuclei are strongly positive (scale bar 10 μ m). (b) Null pattern, no staining is observed in tumor cell nuclei in the presence of a positive internal control in stromal cells (scale bar 10 μ m). (c) Wild-type pattern, focal nuclear positivity of varying intensity in tumor cell nuclei (scale bar 50 μ m).

Positive staining for the MMR antibodies were in the nucleus of the neoplastic cells. We considered the tumor stable if nuclear staining was retained in tumor cells for all four MMR antibodies and unstable if one or more of the four markers lacked nuclear expression in tumor cells. Nuclear immunoreaction in lymphocytes, normal colonic mucosa or stromal cells served as the internal anti-MMR positive control. Loss of MMR staining was considered when the nuclei of all neoplastic cells were negative.

MUC5AC in adenocarcinomas was considered positive extensively if more than 50% of the tumor glands showed positive staining in the cytoplasm, focally positive if less than 50% of the glands had expression in the cytoplasm and negative if 100% of the tumor glands lacked expression. MUC5AC in the mucosa adjacent to the CRC was considered positive if more than 50% of the gland showed cytoplasmic staining. An external positive control was included on each slide.

Microscopy images were acquired with a digital slide scanner (Ultra Fast Scanner 1.8, Philips, Amsterdam, The Netherlands).

4.2. Statistical Analysis

Analysis was carried out using SPSS software version 26.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). The χ^2 test was used to analyze the association between qualitative variables, whereas the Fisher's exact test and the Student's *t*-test or the Mann–Whitney test were used for quantitative variables. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

5. Conclusions

Our results reflect that CAC shows a molecular profile characterized by p53 alterations and an absence of both MSI and MUC5AC staining, which differentiate it from CRC of the canonical and serrated carcinogenesis pathways. In relation to the expression of MUC5AC in CAC and surrounding intestinal mucosa, we could hypothesize that the appearance of GM occurs in inflamed mucosa, persists in those with chronic-regenerative changes and disappears with the acquisition of p53 mutations (Figure 6).

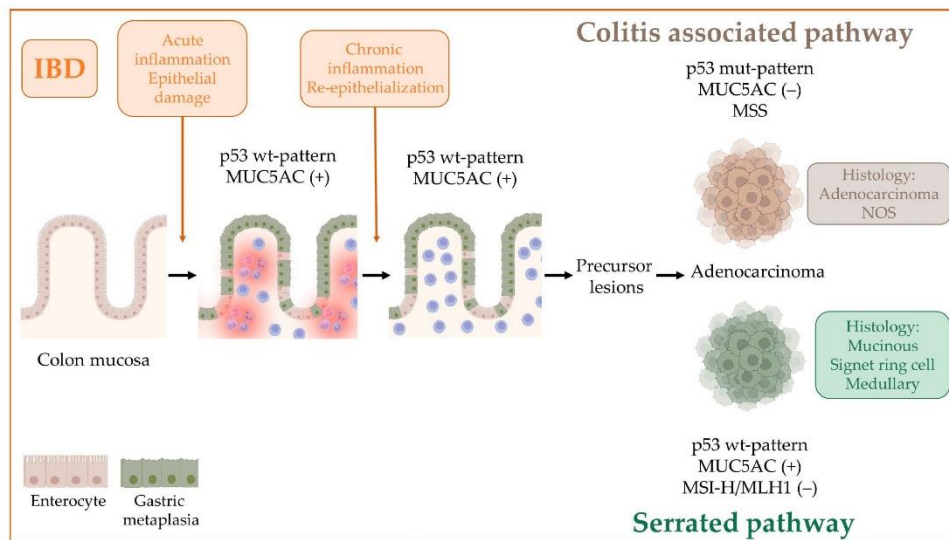


Figure 6. Pathways of CRC carcinogenesis in IBD. GM appears in the inflamed colic mucosa as an adaptive mechanism to continued stress, persists in the mucosa with chronic changes and disappears with the acquisition of p53 mutations. CACs are characterized by p53 alterations, a lack of MUC5AC expression and MSS, whereas those CRCs with MSI-H, MUC5AC expression and p53 wt-pattern could represent sporadic CRC of the serrated pathway that appear in a context of “chronic inflammation-dysplasia-cancer” from a gastric metaplastic epithelium. Figure created with BioRender.com.

Author Contributions: Conceptualization, M.G., M.C. and E.M.; methodology, M.G., M.C. and E.M.; formal analysis, M.G., M.C. and E.M.; data curation, M.G., M.C., E.M., I.A., J.A.V., M.J.F.A., V.F.C., J.T., I.J., R.F.-V., C.M.C., C.A.G., C.Z. and P.O.d.I.O.; writing—original draft preparation, M.G.; writing—review and editing, M.C., E.M., M.T.F.-F. and M.E.; funding acquisition, E.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Roche through a collaboration agreement for research in Oncology (activity code: SP210830002).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the ethics committee of the Hospital Universitari General de Catalunya (2020/139-APA-HUGC-HUSC-HQV and 10 November 2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We want to particularly acknowledge the patients and the technical staff of the Hospital Universitari General de Catalunya-Grupo Quironsalud and Patologia Integrada, S.L. Work supported by the Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya sponsored by Pla Director d’Oncologia de Catalunya (XBTC).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

CAC	colitis-associated colorectal carcinoma
IBD	inflammatory bowel disease
GM	gastric metaplasia
CRC	colorectal cancer
MSI	microsatellite instability
CD	Crohn's disease
UC	ulcerative colitis
MSI	microsatellite instability
MSI-H	microsatellite instability high
MSS	microsatellite stability
LS	Lynch syndrome
MMR	mismatch repair

References

1. Lutgens, M.W.; van Oijen, M.G.; van der Heijden, G.J.; Vleggaar, F.P.; Siersema, P.D.; Oldenburg, B. 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Jess, T.; Gamborg, M.; Matzen, P.; Munkholm, P.; Sørensen, T.I. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: A meta-analysis of population-based cohort studies. *Am. J. Gastroenterol.* **2005**, *100*, 2724–2729. [\[CrossRef\]](#)
3. Mattar, M.C.; Lough, D.; Pishvaian, M.J.; Charabaty, A. Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Gastrointest. Cancer Res.* **2011**, *4*, 53–61. [\[PubMed\]](#)
4. Lu, C.; Schardey, J.; Zhang, T.; Crispin, A.; Wirth, U.; Karcz, K.W.; Bazhin, A.V.; Andrassy, J.; Werner, J.; Kühn, F. Survival Outcomes and Clinicopathological Features in Inflammatory Bowel Disease-associated Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann. Surg.* **2022**, *276*, e319–e330. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Svrcek, M.; El-Bchiri, J.; Chalastanis, A.; Capel, E.; Dumont, S.; Buhard, O.; Oliveira, C.; Seruca, R.; Bossard, C.; Mosnier, J.F.; et al. Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 4231–4238. [\[CrossRef\]](#)
6. Liu, X.; Goldblum, J.R.; Zhao, Z.; Landau, M.; Heald, B.; Pai, R.; Lin, J. Distinct clinicohistologic features of inflammatory bowel disease-associated colorectal adenocarcinoma: In comparison with sporadic microsatellite-stable and Lynch syndrome-related colorectal adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **2012**, *36*, 1228–1233. [\[CrossRef\]](#)
7. Svrcek, M.; Fontugne, J.; Duval, A.; Fléjou, J.F. Inflammatory bowel disease-associated colorectal cancers and microsatellite instability: An original relationship. *Am. J. Surg. Pathol.* **2013**, *37*, 460–462. [\[CrossRef\]](#)
8. Rajamäki, K.; Taira, A.; Katainen, R.; Välimäki, N.; Kuosmanen, A.; Plaketti, R.M.; Seppälä, T.T.; Ahtiainen, M.; Wirta, E.V.; Vartiainen, E.; et al. Genetic and Epigenetic Characteristics of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **2021**, *161*, 592–607. [\[CrossRef\]](#)
9. Leedham, S.J.; Graham, T.A.; Oukrif, D.; McDonald, S.A.; Rodriguez-Justo, M.; Harrison, R.F.; Shepherd, N.A.; Novelli, M.R.; Jankowski, J.A.; Wright, N.A. Clonality, founder mutations, and field cancerization in human ulcerative colitis-associated neoplasia. *Gastroenterology* **2009**, *136*, 542–550.e6. [\[CrossRef\]](#)
10. Robles, A.I.; Traverso, G.; Zhang, M.; Roberts, N.J.; Khan, M.A.; Joseph, C.; Lauwers, G.Y.; Selaru, F.M.; Popoli, M.; Pittman, M.E.; et al. Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology* **2016**, *150*, 931–943. [\[CrossRef\]](#)
11. Du, L.; Kim, J.J.; Shen, J.; Chen, B.; Dai, N. KRAS and TP53 mutations in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 22175–22186. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Chatila, W.K.; Walch, H.; Hechtman, J.F.; Moyer, S.M.; Sgambati, V.; Faleck, D.M.; Srivastava, A.; Tang, L.; Benhamida, J.; Ismailgeci, D.; et al. Integrated clinical and genomic analysis identifies driver events and molecular evolution of colitis-associated cancers. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Hartman, D.J.; Binion, D.G.; Regueiro, M.D.; Miller, C.; Herbst, C.; Pai, R.K. Distinct Histopathologic and Molecular Alterations in Inflammatory Bowel Disease-Associated Intestinal Adenocarcinoma: C-MYC Amplification is Common and Associated with Mucinous/Signet Ring Cell Differentiation. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2018**, *24*, 1780–1790. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Hirsch, D.; Hardt, J.; Sauer, C.; Heselmeyer-Haddad, K.; Witt, S.H.; Kienle, P.; Ried, T.; Gaiser, T. Molecular characterization of ulcerative colitis-associated colorectal carcinomas. *Mod. Pathol.* **2021**, *34*, 1153–1166. [\[CrossRef\]](#)
15. Peltomäki, P.; Nyström, M.; Mecklin, J.P.; Seppälä, T.T. Lynch Syndrome Genetics and Clinical Implications. *Gastroenterology* **2023**, *164*, 783–799. [\[CrossRef\]](#)
16. Crockett, S.D.; Nagtegaal, I.D. Terminology, Molecular Features, Epidemiology, and Management of Serrated Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology* **2019**, *157*, 949–966.e4. [\[CrossRef\]](#)

17. Koukoulis, G.K.; Ke, Y.; Henley, J.D.; Cummings, O.W. Detection of pyloric metaplasia may improve the biopsy diagnosis of Crohn's ileitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **2002**, *34*, 141–143. [\[CrossRef\]](#)
18. Kariv, R.; Plesec, T.P.; Gaffney, K.; Lian, L.; Fazio, V.W.; Remzi, F.H.; Lopez, R.; Goldblum, J.R.; Shen, B. Pyloric gland metaplasia and pouchitis in patients with ileal pouch-anal anastomoses. *Aliment. Pharm. Ther.* **2010**, *31*, 862–873. [\[CrossRef\]](#)
19. Agarwal, S.; Stucchi, A.F.; Dendrinos, K.; Cerda, S.; O'Brien, M.J.; Becker, J.M.; Heeren, T.; Farraye, F.A. Is pyloric gland metaplasia in ileal pouch biopsies a marker for Crohn's disease? *Dig. Dis. Sci.* **2013**, *58*, 2918–2925. [\[CrossRef\]](#)
20. Tokuyama, M.; Dhingra, S.; Polydorides, A.D. Clinicopathologic Features and Diagnostic Implications of Pyloric Gland Metaplasia in Intestinal Specimens. *Am. J. Surg. Pathol.* **2021**, *45*, 365–373. [\[CrossRef\]](#)
21. Ikezono, G.; Yao, K.; Imamura, K.; Kanemitsu, T.; Miyaoka, M.; Hirano, A.; Takeda, K.; Hisabe, T.; Ueki, T.; Tanabe, H.; et al. Gastric metaplasia of the duodenal mucosa in Crohn's disease: Novel histological and endoscopic findings. *Endosc. Int. Open* **2021**, *9*, E181–E189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Li, H.; Arslan, M.E.; Lee, E.C.; Qualia, C.M.; Mikula, M.W.; Fu, Z.; Petchers, A.; Arker, S.H.; Kmeid, M.; Boguniewicz, A.; et al. Pyloric gland metaplasia: Potential histologic predictor of severe pouch disease including Crohn's disease of the pouch in ulcerative colitis. *Pathol. Res. Pract.* **2021**, *220*, 153389. [\[CrossRef\]](#)
23. Chen, B.; Scurrah, C.R.; McKinley, E.T.; Simmons, A.J.; Ramirez-Solano, M.A.; Zhu, X.; Markham, N.O.; Heiser, C.N.; Vega, P.N.; Rolong, A.; et al. Differential pre-malignant programs and microenvironment chart distinct paths to malignancy in human colorectal polyps. *Cell* **2021**, *184*, 6262–6280. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Umetani, N.; Sasaki, S.; Watanabe, T.; Shinozaki, M.; Matsuda, K.; Ishigami, H.; Ueda, E.; Muto, T. Genetic alterations in ulcerative colitis-associated neoplasia focusing on APC, K-ras gene and microsatellite instability. *Jpn. J. Cancer Res.* **1999**, *90*, 1081–1087. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Lyda, M.H.; Noffsinger, A.; Belli, J.; Fenoglio-Preiser, C.M. Microsatellite instability and K-ras mutations in patients with ulcerative colitis. *Hum. Pathol.* **2000**, *31*, 665–671. [\[CrossRef\]](#)
26. Fleisher, A.S.; Esteller, M.; Harpaz, N.; Leytin, A.; Rashid, A.; Xu, Y.; Liang, J.; Stine, O.C.; Yin, J.; Zou, T.T.; et al. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4864–4868. [\[PubMed\]](#)
27. Schulmann, K.; Mori, Y.; Croog, V.; Yin, J.; Oлару, A.; Sterian, A.; Sato, F.; Wang, S.; Xu, Y.; Deacu, E.; et al. Molecular phenotype of inflammatory bowel disease-associated neoplasms with microsatellite instability. *Gastroenterology* **2005**, *129*, 74–85. [\[CrossRef\]](#)
28. Vanoli, A.; Di Sabatino, A.; Furlan, D.; Klersy, C.; Grillo, F.; Fiocca, R.; Mescoli, C.; Rugge, M.; Nesi, G.; Fociani, P.; et al. Small Bowel Carcinomas in Crohn's Disease: Clinico-pathological, Molecular, and Prognostic Features. A Study From the Small Bowel Cancer Italian Consortium. *J. Crohn's Colitis* **2017**, *11*, 942–953. [\[CrossRef\]](#)
29. Giuffrida, P.; Arpa, G.; Grillo, F.; Klersy, C.; Sampietro, G.; Ardizzone, S.; Fociani, P.; Fiocca, R.; Latella, G.; Sessa, F.; et al. PD-L1 in small bowel adenocarcinoma is associated with etiology and tumor-infiltrating lymphocytes, in addition to microsatellite instability. *Mod. Pathol.* **2020**, *33*, 1398–1409, Erratum in: *Mod Pathol.* **2020**, *33*, 1453. [\[CrossRef\]](#)
30. Mäki-Nevala, S.; Ukwattage, S.; Olkinuora, A.; Almusa, H.; Ahtiainen, M.; Ristimäki, A.; Seppälä, T.; Lepistö, A.; Mecklin, J.P.; Peltomäki, P. Somatic mutation profiles as molecular classifiers of ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **2021**, *148*, 2997–3007. [\[CrossRef\]](#)
31. Matsuda, K.; Watanabe, T.; Shinozaki, M.; Yokoyama, T.; Sasaki, S.; Furukawa, Y.; Kanazawa, T.; Masaki, T.; Muto, T. Ulcerative colitis patients with a family history of colorectal cancer should be subjected to close and careful surveillance. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **1999**, *29*, 448–451. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Minami, N.; Yoshino, T.; Nakase, H. Unique endoscopic findings of colitis-associated colorectal cancer in a patient with ulcerative colitis and lynch syndrome. *J. Crohn's Colitis* **2014**, *8*, 336–337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. McNamara, K.L.; Aronson, M.D.; Cohen, Z. Is there a role for prophylactic colectomy in lynch syndrome patients with inflammatory bowel disease? *Int. J. Color. Dis.* **2016**, *31*, 9–13. [\[CrossRef\]](#)
34. Derikx, L.A.; Smits, L.J.; van Vliet, S.; Dekker, E.; Aalfs, C.M.; van Kouwen, M.C.; Nagengast, F.M.; Nagtegaal, I.D.; Hoogerbrugge, N.; Hoentjen, F. Colorectal Cancer Risk in Patients With Lynch Syndrome and Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *15*, 454–458.e1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Arif, A.A.; Chahal, D.; Ladua, G.K.; Bhang, E.; Salh, B.; Rosenfeld, G.; Loree, J.M.; Donnellan, F. Hereditary and Inflammatory Bowel Disease-Related Early Onset Colorectal Cancer Have Unique Characteristics and Clinical Course Compared with Sporadic Disease. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2021**, *30*, 1785–1791. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Barberio, B.; Savarino, E.; Verstockt, B.; Fumery, M.; Pugliese, D.; Bertani, L.; Buda, A.; Dragoni, G.; Goren, I.; Laish, I.; et al. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes and Inflammatory Bowel Diseases: An ECCO CONFERENCE Multicentre Case Series. *J. Crohn's Colitis* **2022**, *16*, 1845–1852. [\[CrossRef\]](#)
37. Ayeni, A.A.; Waterland, P.; Evans, M.; Singhal, S.; Patel, R.K.; Akingboye, A. Case Report: Multiple colorectal cancers in a patient with Ulcerative colitis and Lynch syndrome: Is there a role for prophylactic colectomy? A short report and review of literature. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 1031606. [\[CrossRef\]](#)

38. Rico, S.D.; Mahnken, M.; Büscheck, F.; Dum, D.; Luebke, A.M.; Kluth, M.; Hube-Magg, C.; Hinsch, A.; Höflmayer, D.; Möller-Koop, C.; et al. MUC5AC Expression in various tumor types and nonneoplastic tissue: A tissue microarray study on 10,399 tissue samples. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2021**, *20*, 15330338211043328, Erratum in: *Technol. Cancer Res. Treat.* **2022**, *21*, 15330338221099574. [\[CrossRef\]](#)
39. Köbel, M.; Piskorz, A.M.; Lee, S.; Lui, S.; LePage, C.; Marass, F.; Rosenfeld, N.; Mes Masson, A.M.; Brenton, J.D. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of *TP53* mutation in ovarian carcinoma. *J. Pathol. Clin. Res.* **2016**, *2*, 247–258. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4.2 ARTICLE 2

Gastric metaplasia as a precursor of nonconventional dysplasia in inflammatory bowel disease

Eva Musulen, Míriam Gené, Míriam Cuatrecasas, Irene Amat, Jesús Alberto Veiga, María Jesús Fernández-Acenero, Victòria Fusté Chimisana, Jordi Tarragona, Ismael Jurado, Rebeca Fernández-Victoria, Carolina Martínez-Ciarpaglini, Cristina Alenda González, Carlos Zac, María Teresa Fernández-Figueras, Manel Esteller

Human Pathology 2024. Vol 143. Pg 50-61.

PMID: 38000679 DOI: 10.1016/j.humpath.2023.11.011

Factor d'impacte: 0.934

Quartil: Q1 (Pathology and Forensic Medicine)



Contents lists available at ScienceDirect

Human Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humpathHuman
PATHOLOGY

Gastric metaplasia as a precursor of nonconventional dysplasia in inflammatory bowel disease

Eva Musulen^{a,b,*}, Míriam Gené^{c,d}, Míriam Cuatrecasas^{e,f}, Irene Amat^g, Jesús Alberto Veiga^h,
María Jesús Fernández-Aceñeroⁱ, Victòria Fusté Chimisana^j, Jordi Tarragona^k, Ismael Jurado^l,
Rebeca Fernández-Victoria^m, Carolina Martínez-Ciarpagliniⁿ, Cristina Alenda González^o,
Carlos Zac^p, María Teresa Fernández-Figueras^{a,q}, Manel Esteller^{b,r,s,t}

^a Pathology Department, Hospital Universitari General de Catalunya-Grupo QuironSalud, 08915 Sant Cugat Del Valles, Barcelona, Spain^b Institut de Recerca Contra La Leucèmia Josep Carreras (IJC), 08916 Badalona, Barcelona, Spain^c Pathology Department, Hospital Universitari Joan XXIII, 43005 Tarragona, Spain^d Surgery Department, Programme of Surgery and Morphological Sciences, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Cerdanyola Del Valles, Spain^e Pathology Department, Hospital Clínic, 08036 Barcelona, Spain^f Department of Basic Clinical Practice, University of Barcelona (UB), 08036 Barcelona, Spain^g Pathology Department, Complejo Hospitalario de Navarra, 31008 Navarra, Spain^h Pathology Department, Complejo Hospitalario Universitario de Ferrol, 15405 Ferrol, Spainⁱ Pathology Department, Hospital Clínico San Carlos, 28040 Madrid, Spain^j Pathology Department, Hospital de La Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain^k Pathology Department, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, 25198 Lleida, Spain^l Pathology Department, Consorci Sanitari de Terrassa, 08227 Terrassa, Spain^m Pathology Department, Hospital Álvaro Cunqueiro, 36312 Vigo, Spainⁿ Pathology Department, Hospital Clínico Universitario de Valencia, INCLIVA- Instituto de Investigación Sanitaria, Universidad de Valencia, 46010 Valencia, Spain^o Pathology Department, Hospital General Universitario Dr. Balmis, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), 031010 Alicante, Spain^p Pathology Department, Hospital Universitari I Politècnic La Fe, 46026 Valencia, Spain^q School of Medicine, Campus Sant Cugat Del Valles, Universitat Internacional de Catalunya (UIC), 08917 Sant Cugat Del Valles, Spain^r Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08010 Barcelona, Spain^s Faculty of Medicine and Health Sciences, Department of Physiological Sciences, Universitat de Barcelona (UB), 08007 Barcelona, Spain^t Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer (CIBERONC), 28029 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Gastric metaplasia
Nonconventional dysplasia
Conventional dysplasia
Inflammatory bowel disease
CRC serrated pathway

ABSTRACT

Gastric metaplasia in colonic mucosa with inflammatory bowel disease (IBD) develops as an adaptation mechanism. The association between gastric metaplasia and nonconventional and/or conventional dysplasia as precursors of colitis-associated colorectal cancer is unknown. To address this question, we retrospectively reviewed a series of 33 IBD colectomies to identify gastric metaplasia in 76 precursor lesions.

We obtained 61 nonconventional and 15 conventional dysplasias. Among nonconventional dysplasia, 31 (50.8 %) were low-grade (LGD), 4 (6.5 %) were high-grade (HGD), 9 (14.8 %) had both LGD and HGD, and 17 (27.9 %) had no dysplasia (ND), while 14 (93 %) conventional dysplasias had LGD, and 1 (7 %) had LGD and HGD.

Gastric metaplasia was assessed by concomitant immunoeexpression of MUC5AC and loss of CDX2 staining. Expression of a p53-mut pattern was considered as a surrogate for gene mutation, and complete loss of MLH1 staining as presence of MLH1 hypermethylation.

In nonconventional dysplasia, MUC5AC immunoeexpression decreased as the degree of dysplasia increased, being 78 % in LGD and 39 % in HGD ($p = 0.006$). CDX2 was lost in epithelial glands with high expression of MUC5AC ($p < 0.001$). The p53-mut pattern was observed in 77 % HGD, 45 % LGD, and in 6 % with ND ($p < 0.001$). Neither nonconventional nor conventional dysplasia showed complete loss of MLH1 staining. Gastric metaplasia was also present in mucosa adjacent to nonconventional dysplasia with chronic changes or active

* Corresponding author. Hospital Universitari General de Catalunya-Grupo QuironSalud Pathology Department C/ Pedro i Pons, 1 08915 Sant Cugat del Valles Barcelona, Spain Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras (IJC), Grup d'Epigenètica del Càncer, Josep Carreras Building, Ctra de Can Ruti, Camí de les Escoles, s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain

E-mail addresses: emusulen@carrerasresearch.org, eva.musulen@quironsalud.es (E. Musulen).

<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2023.11.011>

Received 24 July 2023; Received in revised form 18 October 2023; Accepted 17 November 2023

Available online 23 November 2023

0046-8177/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

inflammation. Our results show that gastric metaplasia appears in IBD-inflamed colon mucosa, it is the substrate of most nonconventional dysplasia and occurs prior to p53 alterations.

1. Introduction

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are conditions with a 2- to 3-fold increased risk of colorectal cancer (CRC) [1,2] and colitis-associated colorectal cancer (CAC) is the main cause of death in long-standing inflammatory bowel disease (IBD) [3]. Certain factors such as severity of the disease, extensive involvement of the colon (pancolitis), young age at diagnosis, more than 8 years of disease, and the presence of extracolonic manifestations, especially primary sclerosing cholangitis, have been associated with a higher risk of malignancy [4,5]. In IBD, chronic inflammation inducing injury-repair processes and microbiota dysbiosis generate continuous stress on the colon mucosa. Repeated damage in extensive areas of the colon leads to the transformation of the mucosa into a cancerization field [6] with the appearance of multiple precursor lesions which may have no morphological dysplastic features, but that harbor molecular alterations capable of initiating CAC carcinogenesis [7].

To prevent the occurrence of CAC, surveillance colonoscopies are performed to identify dysplasia, traditionally considered the precursor lesion of CAC [8,9]. In 2017, Harzac et al. [10] described seven different categories which they termed *dysplasia* associated to IBD, and were named as follows: dysplasia with terminal epithelial differentiation, sessile serrated polyp/adenoma-like dysplasia, traditional serrated adenoma-like dysplasia, conventional adenoma-like dysplasia, hypermucinous dysplasia, goblet cell depleted dysplasia, and serrated dysplasia not otherwise specified (NOS). Currently, most of these entities are included under the designation of nonconventional dysplasia, to differentiate them from the conventional dysplasia, i.e., tubular adenoma (or tubular adenoma-like) and tubulovillous adenoma (or tubulovillous adenoma-like) [11]. Some of the above entities have been renamed, such as the former dysplasia with terminal epithelial differentiation by crypt cell atypia/dysplasia [12], and the serrated dysplasia NOS by serrated lesion NOS [11]. Other new categories have been recently recognized, such as the dysplasia with increased Paneth cell differentiation [11] and some new non-adenomatous lesions [13], and the serrated epithelial change has been redefined [14]. Moreover, there has been increasing interest in characterizing the molecular alterations of these recently described types of dysplasia to better understand the contribution of each entity to CAC carcinogenesis [7,12–19].

Gastric metaplasia has been identified as a substrate for the initiation of the serrated pathway of CRC, due to a multifactorial continuous injury of the right colon epithelium [20]. In addition, in the context of IBD, both foveolar and pseudopyloric gastric metaplasia can be seen. We have previously shown by analyzing a series of CAC and the surrounding colonic mucosa that gastric metaplasia occurs in colonic inflamed mucosa, it persists in chronic changes, and disappears with the acquisition of dysplasia and p53 mutations. Furthermore, we identified a subset of CRC in IBD related to the serrated pathway and characterized by the absence of mutated p53 pattern, microsatellite instability and MUC5AC expression [21]. Since the relationship between gastric metaplasia and nonconventional dysplasia as a precursor of CAC is unknown, we aimed to study a series of IBD colectomies to explore the presence of gastric metaplasia in nonconventional and conventional dysplasias.

2. Materials and methods

2.1. Patients and specimens

Thirty-three colectomies of IBD patients from 13 hospitals were retrospectively reviewed to identify precursor lesions of CAC. To characterize them, we used the following definitions: a) Goblet cell deficient

dysplasia: flat, tubular lesion, with unequivocal dysplastic crypts characterized by complete or nearly-absence of goblet cells; b) Crypt cell atypia/dysplasia: flat lesion showing crypts with cells with round-to-oval, non-stratified nuclei with loss but not complete absence of goblet cells. The atypia can be located at the base of the crypt but does not affect the superficial epithelium; c) Dysplasia with increased Paneth cell differentiation: characterized by dysplastic crypts lined by hyperchromatic, mostly elongated nuclei with reduced goblet cells showing increased Paneth cell differentiation involving more than two contiguous crypts; e) Serrated epithelial change: flat or slightly elevated lesion with markedly distorted architecture and loss of crypt orientation, not perpendicularly aligned to the muscularis mucosae, and often chronic inflammation between the base of the crypt and the muscularis mucosae; f) Hypermucinous dysplasia: villous or tubulovillous lesion with prominent mucinous differentiation involving more than 50 % of the lesion; g) Sessile serrated lesion-like: polypoid growth of crypts with prominent serration, base dilatation and horizontal growth along the muscularis mucosae; h) Traditional serrated adenoma-like: polypoid proliferation showing slit-like serration with tall columnar cells with intensely

Table 1
Clinicopathological features of IBD patients and adenocarcinomas.

	Crohn's disease (%)	Ulcerative colitis (%)	Total (%)	p value
Patients	9 (100)	24 (100)	33 (100)	
Age				
Mean years [range]	59.7 [32–82]	63.8 [30–85]	62.6 [30–85]	0.137
Gender				
Male	9 (100)	19 (79)	28 (85)	
Female	0	5 (21)	5 (15)	0.408
IBD duration				
Mean years [range]	15.4 [1–25]	12.5 [1–34]	14.8 [1–34]	
Concomitant	2 (22.2)	2 (8)	4 (12.1)	
<8 years	1 (11.1)	7 (29)	8 (24.2)	
9–15 years	4 (44.4)	5 (21)	9 (27.3)	
16–20 years	1 (11.1)	6 (25)	7 (21.2)	
>21 years	1 (11.1)	4 (17)	5 (15.2)	0.407
IBD activity				
Active	5 (56)	17 (71)	22 (67)	
Quiescent	4 (44)	7 (29)	11 (33)	0.350
Multifocal dysplasia				
No	4 (44)	15 (62.5)	19 (58)	
Yes	5 (56)	9 (37.5)	14 (42)	0.924
Type of dysplasia				
Only NCD	6 (67)	15 (62.5)	21 (64)	
Only CD	2 (22)	5 (20.8)	7 (21)	
NCD and CD	1 (11)	4 (16.7)	5 (15)	0.716
Concomitant adenocarcinoma				
No	4 (44)	9 (37.5)	13 (39)	
Yes	5 (56)	15 (62.5)	20 (61)	0.278
Adenocarcinoma per colectomy (n = 20)				
1	5 (100)	12 (80)	17 (85)	
2	0	3 (20)	3 (15)	0.394
Adenocarcinoma location (n = 23)				
Right colon	3 (60)	4 (22)	7 (30.4)	
Left colon	1 (20)	6 (33)	7 (30.4)	
Rectum	0	3 (17)	3 (13)	
Colon	1 (20)	5 (28)	6 (26.1)	0.620
Histology (n = 23)				
NOS	5 (100)	13 (72.2)	18 (78.3)	
Mucinous	0	3 (16.7)	3 (13)	
Poorly differentiated	0	1 (5.6)	1 (4.3)	
Undifferentiated	0	1 (5.6)	1 (4.3)	

Table 2
Clinicopathological features of nonconventional and conventional dysplasia according to the type of IBD.

		Nonconventional dysplasia (n = 61)				Conventional dysplasia (n = 15)			
		Crohn's disease (n = 10)	Ulcerative colitis (n = 51)	Total (%)	p value	Crohn's disease (n = 6)	Ulcerative colitis (n = 9)	Total (%)	p value
Gender	Male	10	43	53 (87)	0.332	6	9	15 (100)	
	Female	0	8	8 (13)		0	0	0	
IBD duration					0.365				0.138
	Concomitant	1	4	5 (8.2)		5	2	7 (46.7)	
	<8 years	2	8	10 (16.4)		0	1	1 (6.7)	
	9–15 years	4	10	14 (23)		1	1	2 (13.3)	
	16–20 years	1	22	23 (37.7)		0	4	4 (26.7)	
IBD activity	>21	2	7	9 (14.8)	0.912	0	1	1 (6.7)	0.264
	Active	8	40	48 (79)		1	4	5 (33)	
Location of inflammation	Quiescent	2	11	13 (21)	0.000	5	5	10 (67)	0.003
	Right colon	4	0	4 (6.5)		5	0	5 (33)	
	Left colon	0	24	24 (39)		1	6	7 (47)	
	Rectum	0	1	1 (1.5)		0	0	0	
	Pancolitis	2	18	20 (33)		0	3	3 (20)	
Type of dysplasia		NS	4	8	0.455	0	0	0	
Nonconventional dysplasia									
		HM	2	12					
		GCD	3	9					
		SL NOS	2	7					
		SSL-like	0	7					
		CCA/D	0	7					
		SEC	1	6					
		TSA-like	2	2					
		DPD	0	1					
Conventional dysplasia					0.776				0.398
		TA-like				6	8	14 (93)	
		TVA-like				0	1	1 (7)	
Dysplasia morphology		Flat	5	28		0	0	0	
		Polypoid	5	23		6	9	15 (100)	
Location of dysplasia					0.040				0.144
	Right colon	4	10	14 (23)		4	1	5 (33)	
	Left colon	2	8	10 (16.4)		1	3	4 (27)	
	Rectum	0	17	17 (28)		0	2	2 (13)	
	Colostomy	1	0	1 (1.5)		0	0	0	
Grade of dysplasia	NS	3	16	19 (31)	0.186	1	3	4 (27)	0.398
	LGD	8	23	31 (50.8)		6	8	14 (93)	
	HGD	0	4	4 (6.6)		0	0	0	
	LGD and HGD	0	9	9 (14.8)		0	1	1 (7)	
	ND	2	15	17 (27.9)		0	0	0	
GM in type of dysplasia (n = 70)					0.097				0.1875
		Yes	2	30		1	2	3 (19)	
		No	8	30		5	8	13 (81)	
Adjacent mucosa to the dysplasia					0.205				0.114
		Yes	5	36		6	6	12 (80)	
		No	5	15		0	3	3 (20)	
		Active inflammation	2	10		0	0	0	
		Chronic inflammation/changes	2	20		2	0	2 (17 %)	
		Normal	1	6		4	6	10 (83 %)	
GM in adjacent mucosa to the dysplasia (n = 41)					1000				
		Yes	3	21		0	0	0	
		No	2	15		6	6	12 (100)	
		Active inflammation	1	7		0	0	0	
		Chronic inflammation/changes	1	13		0	0	0	
		Normal	1	1		0	0	0	
Concomitant adenocarcinoma					0.595				0.114
		Yes	4	16		6	6	12 (80)	
		No	6	35		0	3	3 (20)	

Abbreviations: NS, not specified; HM, hypermucinous; GCD, goblet cell deficient; SL NOS, serrated lesion not otherwise specified; CCA/D, crypt cell atypia/dysplasia; SEC, serrated epithelial change; SSL-like, sessile serrated lesion like; TSA-like, traditional serrated adenoma like; DPD, dysplasia with increased Paneth cell differentiation; TA-like, tubular adenoma like; TVA-like, tubulovillous adenoma like; LGD, low-grade dysplasia; HGD, high-grade dysplasia; ND, no dysplasia; GM, gastric metaplasia.

eosinophilic cytoplasm and ectopic crypt formation, frequently with low grade dysplasia (LGD); i) Serrated lesion not otherwise specified (serrated lesion NOS): those polypoid lesions without definite features of traditional serrated adenoma-like or sessile serrated lesion-like.

Histologic evaluation was performed separately by three expert pathologists in gastrointestinal pathology (M.G., M.C. and E.M.). Cases with discordant diagnoses were reviewed together to reach a consensus on the final diagnosis.

Information about the endoscopic appearance of the lesions was not available for all cases since the lesions were obtained from colectomies. Thus, those lesions that did not protrude more than half the thickness of the mucosa were considered flat. The rest were considered flat or polypoid by definition, such as serrated epithelial change as flat, or tubulovillous adenoma-like as polypoid.

2.2. Immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections were analyzed using standard immunohistochemistry (IHC) techniques. Immunostaining was performed automatically using a Ventana BenchMark ULTRA machine (Roche, Basel, Switzerland) for *anti*-p53 (clone DO-7, Ventana Medical Systems, Inc., 1910 E. Innovation Park Drive, Tucson, Arizona 85,755 USA) and *anti*-MUC5AC (clone MRQ-19, Ventana Medical Systems, Inc., 1910 E. Innovation Park Drive, Tucson, Arizona 85,755 USA), and a Bond-III machine (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK) for *anti*-CDX2 (clone EP25, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK) and *anti*-MLH1 (clone ES05, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK). An external positive control was included on each slide. Immunostaining was independently evaluated by three pathologists (M.G., M.C. and E.M.).

For the evaluation of p53 immunostaining we used the 3-level scores described by Köbel et al. [22]. Strong and intense p53 staining in all nuclei (overexpression pattern) and total absence of nuclear staining (null pattern) were considered as surrogates for TP53 mutation (p53-mut pattern). Focal nuclear positivity with variable intensity was considered as normal or wild-type pattern (p53-wt pattern).

MUC5AC identified foveolar gastric epithelium with a strong cytoplasmic staining [23]. MUC5AC was considered positive if more than 50 % of the gland epithelium showed cytoplasm positive staining. CDX2 was considered negative when a focal loss of staining was seen in more than 10 % of the nuclei of a gland. Foveolar gastric metaplasia was considered in glands with MUC5AC expression and loss of CDX2 staining.

Nuclear positive staining for MLH1 was considered positive, and complete loss of MLH1 expression was defined when all nuclei of dysplastic cells were negative, and considered as a surrogate for MLH1 promotor hypermethylation. Nuclear immunoreactivity in lymphocytes, normal colonic mucosa or stromal cells served as a positive internal control for *anti*-p53 and *anti*-MLH1.

In lesions with LGD and high-grade dysplasia (HGD), IHC evaluation was performed separately in each dysplastic area for all markers.

2.3. Statistical analysis

Analysis was carried out using SPSS software version 26.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). The χ^2 test was used to analyze the association between qualitative variables, whereas the Fisher's exact test and the Student's t-test or the Mann-Whitney test were used for quantitative variables. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Patients and specimens

Thirty-three colectomy specimens were retrospectively reviewed, 9 (27 %) with CD and 24 (73 %) with UC, from 28 (85 %) men and 5 (15

%) women, aged between 30 and 85 years-old (mean 62.6 years-old). Duration of IBD ranged from 1 to 34 years (mean 14.8 years). In 4 (12.1 %) cases the diagnosis of IBD was made on the colectomy specimen. Acute inflammation was present in 22 (67 %) colectomies. Most of the dysplastic lesions were found in colectomies affected by UC. Twenty-one colectomies (64 %) showed only nonconventional dysplasia, and 7 (21 %) presented only conventional dysplasia. In 5 (15 %) colectomies, 4 (80 %) corresponding to UC, nonconventional and conventional dysplasia occurred simultaneously. Thirteen of the 21 (13/21, 62 %) colectomies with only nonconventional dysplasia had multiple lesions located both in the same and in different sections of the colon. Adenocarcinoma was present in 20 (61 %) specimens. (Table 1).

3.1.1. Nonconventional dysplasia

Sixty-one nonconventional dysplasias were identified, being more frequent in UC (51/61, 84 %), found either alone 36 (59 %), or simultaneously with conventional dysplasia 25 (41 %). In UC a trend was observed between the number of nonconventional dysplasia in relation to disease duration, which was not as evident in CD. The distribution of nonconventional dysplasia according to the location of inflammation was statistically significant ($p = 0.000$). In CD, most of the nonconventional dysplasia were found in the right colon (4/10, 40 %), while in UC they were in the rectum (17/51, 33.4 %) ($p = 0.040$) (Table 2).

The most frequent nonconventional dysplasia were hypermucinous 14 (23 %), goblet cell depleted 12 (19.7 %), and serrated lesion NOS 9 (14.8 %), found mostly in mucosa with active inflammation, especially in UC (Table 2). Histological examples of each nonconventional dysplasia are shown in Fig. 1. The morphologic appearance of the lesions was flat in most nonconventional dysplasia (54 %). Regarding the grade of dysplasia, most nonconventional dysplasia had LGD 31/61 (50.8 %) and all HGD 13/61 (21 %) was observed in UC patients, either alone or with areas of LGD. Nine nonconventional dysplasias (9/61, 14.8 %) presented areas of LGD and HGD, and were distributed as follow: 2/4 (50 %) traditional serrated adenoma-like, 3/7 (43 %) serrated lesion NOS, 3/7 (43 %) sessile serrated lesion-like, and 1/12 (8 %) goblet cell depleted dysplasia. No histological features of dysplasia were found in 17/61 (27.9 %) lesions, corresponding to 10/14 (71 %) hypermucinous dysplasia, 4/7 (57 %) serrated epithelial change, and 3/9 (33 %) serrated lesion NOS (Table 3). Twenty (33 %) nonconventional dysplasias were found concomitant with adenocarcinoma, 9 (15 %) on the same side of the colon, being mostly goblet cell depleted dysplasia (4/12, 33 %), traditional serrated adenoma-like (1/4, 25 %), and hypermucinous dysplasia (3/14, 21 %); and 5 (8.2 %) were found adjacent to the neoplasm, being 2/14 (14 %) hypermucinous dysplasia, 1/7 (14 %) serrated epithelial change, 1/7 (14 %) sessile serrated lesion-like and 1/12 (8 %) goblet cell depleted dysplasia.

3.1.2. Conventional dysplasia

Fifteen conventional dysplasias were identified, 5 (33.3 %) of them simultaneously with nonconventional dysplasia. Seven colectomies showed exclusively conventional dysplasia, being 5 UC and 2 CD. One of the CD specimens had four tubular adenoma-like lesions and the other had only one tubular adenoma-like. Each of the 5 UC colectomies had one tubular adenoma-like.

A statistically significant relation was found between the distribution of conventional dysplasia and the location of inflammation ($p = 0.003$). However, unlike what was observed in nonconventional dysplasia, the relationship between the location of conventional dysplasia with respect to type of IBD was not statistically significant (0.144) (Table 2).

Conventional dysplasia lesions mostly appeared in UC, in specimens with quiescent activity (67 %) and with adenocarcinoma (80 %). Of the 15 conventional dysplasia, 14 (93 %) were tubular adenoma-like with LGD and 1 (7 %) was a tubulovillous adenoma-like with LGD and HGD (Table 2).

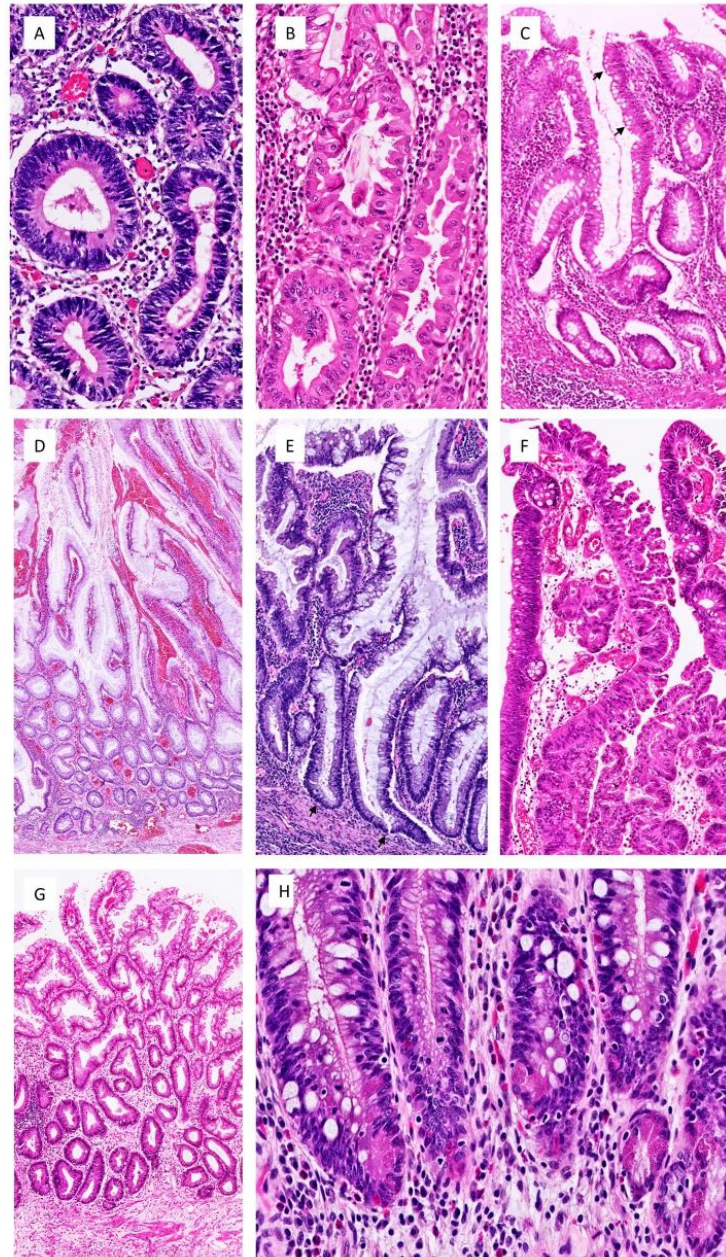
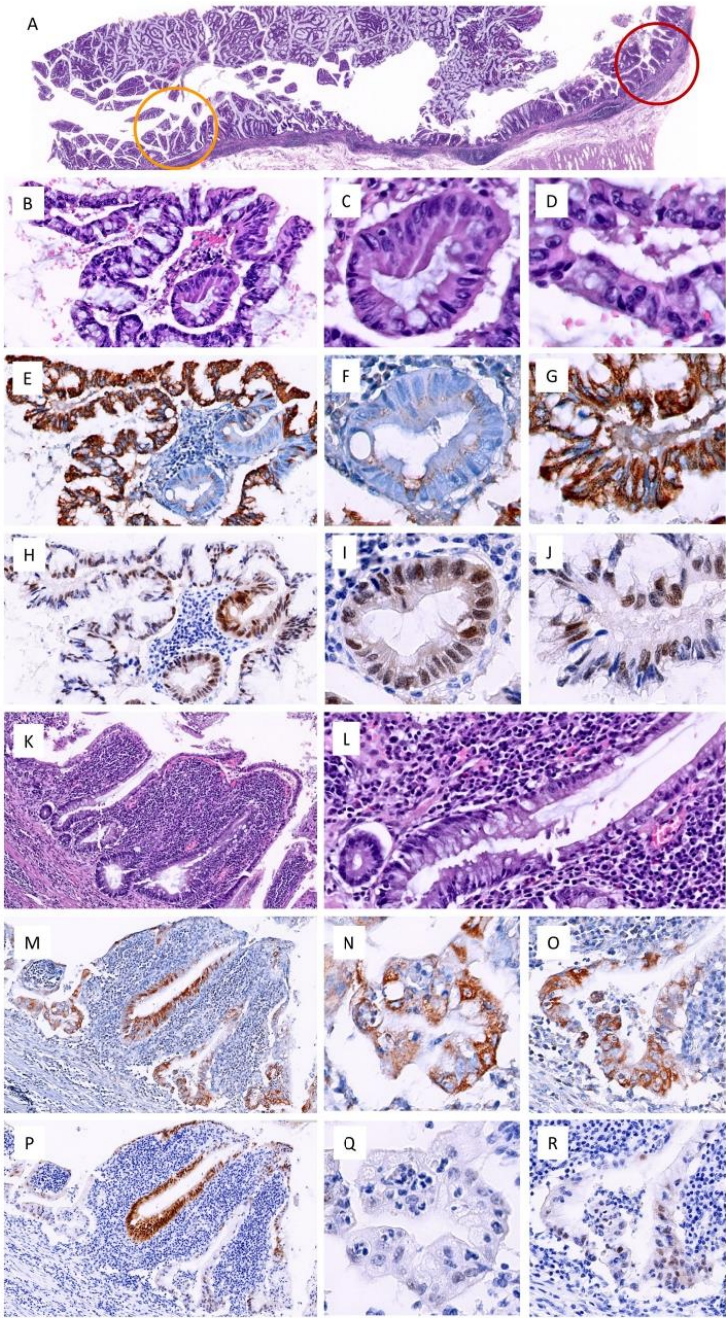


Fig. 1. Histological types of nonconventional dysplasia. Goblet cell deficient dysplasia with unequivocal dysplastic crypts with absence of goblet cells (A). Crypt cell atypia/dysplasia characterized by cells with round-to-oval with non-stratified nuclei (B). Serrated epithelial change with a markedly distorted architecture in which the crypts, some with mild serration (arrows), have lost orientation and were no longer aligned perpendicularly with the muscularis mucosae. Note the chronic inflammation on the lower left side (C). Hypermucinous dysplasia as tubulovillous lesion with prominent mucinous differentiation (D). Sessile serrated lesion-like showing crypts with prominent serrations, dilatations on the base and horizontal growth along the muscularis mucosae (arrows) (E). Traditional serrated adenoma-like with LGD, showing slit-like serration with tall columnar cells with intensely eosinophilic cytoplasm and ectopic crypts formation (F). Serrated lesion NOS, serrated lesion without definite features of traditional serrated adenoma or sessile serrated lesion (G). Dysplasia with increased Paneth cell differentiation showing dysplastic crypts with hyperchromatic nuclei, reduced goblet cells and increased Paneth cell differentiation affecting more than two contiguous crypts (H).

Table 3
MUC5AC, CDX2, p53 and MLH1 IHC expression according to dysplasia type and grade.

	MUC5AC			CDX2			p53			MLH1			
	Positive	Negative	p value	Positive	Negative	p value	wt pattern	Mutated pattern		p value	Positive	Partial loss	Complete loss
								Overexpression pattern	Null pattern				
Nonconventional dysplasia			0.006			0.064				0.003			
HM (n = 14)													
ND = 10	9	1		3	7		9	0	1		0	10	0
LGD = 3	3	0		1	2		1	1	1		0	3	0
HGD = 1	1	0		0	1		0	0	1		0	1	0
GCD (n = 13)													
ND = 0	0	0		0	0		0	0	0		0	0	0
LGD = 10	6	4		7	3		1	4	5		0	10	0
HGD = 3	0	3		3	0		0	1	2		0	3	0
SL NOS (n = 12)													
ND = 3	3	0		0	3		3	0	0		0	3	0
LGD = 6	4	2		4	2		5	0	1		0	6	0
HGD = 3	1	2		2	1		0	1	2		0	3	0
CCA/D (n = 7)													
LGD = 6	5	1		2	4		1	3	2		0	6	0
HGD = 1	0	1		1	0		0	0	1		0	1	0
SEC (n = 7)													
ND = 4	3	1		2	2		4	0	0		0	4	0
LGD = 3	3	0		2	1		3	0	0		0	3	0
SSL-like (n = 10)													
LGD = 7	7	0		2	5		7	0	0		0	7	0
HGD = 3	3	0		1	2		3	0	0		0	3	0
TSA-like (n = 6)													
LGD = 4	3	1		4	0		3	1	0		0	4	0
HGD = 2	0	2		2	0		0	2	0		0	2	0
DPD (n = 1)													
LGD = 1	0	1		1	0		1	0	0		0	1	0
Conventional dysplasia			0.025			0.175							
TA-like (n = 14)													
LGD = 14	1	13		9	5		14	0	0		5	9	0
TVA-like (n = 2)													
LGD = 1	1	0		0	1		1	0	0		0	1	0
HGD = 1	1	0		0	1		1	0	0		0	1	0

Abbreviations: HM, hypermucinous; GCD, goblet cell deficient; SL NOS, serrated lesion not otherwise specified; CCA/D, crypt cell atypia/dysplasia; SEC, serrated epithelial change; SSL-like, sessile serrated lesion-like; TSA-like, traditional serrated adenoma-like; DPD, dysplasia with increased Paneth cell differentiation; TA-like, tubular adenoma-like; TVA-like, tubulovillous adenoma-like; LGD, low-grade dysplasia; HGD, high-grade dysplasia; ND, no dysplasia.



(caption on next page)

Fig. 2. Illustrations of a sessile serrated lesion-like and the adjacent mucosa with MUC5AC and CDX2 IHC. Low power image of a sessile serrated lesion-like (yellow circle) and inflammatory changes in the adjacent mucosa (red circle) (A). Serrated epithelium with LGD containing a gland with HGD with eosinophilic cytoplasm, enlarged nuclei and loss of goblet cells (B). Gland with HGD magnified (C) and epithelia with LGD magnified (D). MUC5AC IHC of the previous lesion (E) showing loss of staining in HGD gland (F) and expression in the epithelium with LGD (G). CDX2 immunostaining in the same lesion (H) with positive staining in the HGD gland (I) and negative or less intensity of the staining in the cells of serrated epithelium with LGD (J). Mucosa with acute and chronic inflammation, erosion, reactive changes and crypt atrophy (K), re-epithelialized epithelium (L) and marked MUC5AC expression (M) with intense staining in the same crypts with acute inflammation (magnified in N and O). CDX2 immunostaining in the same inflamed mucosa (P) with loss of staining in the same crypts with acute inflammation and MUC5AC expression (magnified in Q and R). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

3.1.3. Adjacent mucosa to the dysplastic lesions

Presence of colon mucosa was detected more frequently adjacent to conventional dysplasia (80 %, 12/15) than to nonconventional dysplasia (67 %, 41/61). Acute inflammation was seen in only 12 (29 %) cases, all in relation to nonconventional dysplasia; chronic inflammation/changes also occurred more frequently with nonconventional dysplasia (54 % vs 17 %), while normal mucosa was seen more frequently with conventional dysplasia (83 % vs 17 %) (Table 2).

3.2. Immunohistochemistry

3.2.1. Immunohistochemistry in nonconventional dysplasia

Once the precursor lesions were identified, we used MUC5AC, a well-recognized marker of the foveolar gastric epithelium, to distinguish gastric metaplasia [23]. MUC5AC expression was mostly observed in hypermucinous dysplasia, serrated epithelial change, and serrated lesion NOS without dysplasia (15/17, 88 %). Interestingly, the MUC5AC immunorexpression level decreased with the increase of the grade of dysplasia, being 78 % (31/40) in LGD, and 39 % (5/13) in HGD ($p = 0.006$) (Table 3 and Fig. 2E, F, 2G, 3B, 3F, 3J). Dysplasia with increased Paneth cell differentiation was the only nonconventional dysplasia without MUC5AC expression.

Considering that the loss of CDX2 in the colon is associated with the presence of gastric epithelium, we next analyzed CDX2 expression in the same IBD series. Lack of CDX2 was detected in 12/17 (71 %) lesions without dysplasia, in 17/40 (43 %) LGD and in 4/13 (31 %) HGD ($p = 0.064$) (Table 3 and Fig. 2H, I, 2J, 3C). CDX2 was partially lost or showed less intensity in glands with high expression of MUC5AC ($p < 0.001$) (Table 4).

To investigate the role of gastric metaplasia as a precursor of CAC, we evaluated p53 expression as a surrogate of *TP53* mutation, considering that dysregulation of p53 in one of the most frequent events in this carcinogenesis pathway. The p53-mut pattern (overexpression or null) was observed in 10/13 (77 %) HGD and in 18/40 (45 %) LGD, in contrast to the presence of focal nuclear positivity in almost all the nonconventional dysplasia without dysplasia (16/17, 94 %) ($p < 0.001$) (Table 3 and Fig. 3D, G, 3K).

Finally, to unmask the role of microsatellite instability, we evaluated MLH1 expression as a surrogate for the presence of *MHL1* promoter hypermethylation. We did not find complete loss of nuclear expression in any nonconventional dysplasia, but rather a focal loss of nuclear staining of irregular distribution was observed (Table 3 and Fig. 3H, L).

Once we had determined the expression of the markers in all nonconventional dysplasias, we next assessed the association between MUC5AC and either CDX2 and p53 expression. MUC5AC positivity was associated with the loss of CDX2 expression ($p < 0.001$) (Table 4). Gastric metaplasia was identified in 32 (46 %) nonconventional dysplastic lesions, especially in hypermucinous dysplasia and sessile serrated lesion-like ($p = 0.034$) (Table 5). Regarding to p53 and MUC5AC expression, MUC5AC positive lesions showed mostly a p53-wt

pattern (34/51, 67 %), whereas those lacking MUC5AC exhibited mainly a p53-mut pattern (12/19, 63 %) ($p = 0.031$) (Table 4).

3.2.2. Immunohistochemistry in conventional dysplasia

MUC5AC was expressed in one (7 %) tubular adenoma-like with LGD and in the tubulovillous adenoma-like (100 %) in areas of LGD and HGD (Table 3 and Fig. 3N). CDX2 was lost in 5 (71 %) of the tubular adenoma-like with LGD and in the tubulovillous-like (100 %), in both LGD and HGD. Gastric metaplasia was identified in one (7 %) tubular adenoma-like with LGD and in the tubulovillous-like (100 %) in areas of LGD and HGD ($p = 0.1875$).

All conventional dysplasia showed a p53-wt pattern (Table 3 and Fig. 3O), 5 tubular adenoma-like retained MLH1 staining and the remaining 9 tubular adenoma-like and the tubulovillous adenoma-like showed partial loss of MLH1 expression (Table 3 and Fig. 3P).

3.2.3. Immunohistochemistry in adjacent mucosa to the dysplastic lesions

In mucosa with acute or chronic inflammation, MUC5AC staining was observed at superficial epithelium lining granulation tissue, and in irregular crypts with nuclear stratification and loss of goblet cells (Fig. 2M, N, 2O), whereas CDX2 showed conserved or less intense nuclear expression in the same areas (Fig. 2P, Q, 2R) as corresponds to the definition of foveolar gastric metaplasia. Gastric metaplasia was identified in the adjacent mucosa of 24 (24/41, 59 %) nonconventional dysplasia, 21 (21/36, 58 %) with UC and 3 (3/5, 60 %) with CD, 8 (8/24, 33.3 %) with active inflammation, 14 (14/24, 58.3 %), chronic changes, and in 2 (2/24, 8.3 %) normal mucosa. No gastric metaplasia was identified in the 12 colon mucosa adjacent to conventional dysplasias (Table 2). A p53-wt pattern was identified in all adjacent mucosa, while MLH1 staining was lost in the superficial epithelium of normal mucosa, as well as in those with active inflammation or chronic changes.

4. Discussion

The aim of this study was to explore the presence of gastric metaplasia and its relationship with dysplasia in a series of nonconventional and conventional dysplastic lesions identified retrospectively from IBD colectomies.

We identified differences in the distribution of both types of dysplasia. While as described in other studies, nonconventional dysplasias were more frequently located in colectomies with acute inflammation, following the characteristic distribution of inflammation according to the type of IBD [24], and observed in specimens without adenocarcinoma, conventional dysplasias were more frequently found in specimens with quiescent activity, unrelated to the inflammation distribution in the colon according to the type of IBD, and with concomitant adenocarcinoma. In contrast to our findings, other authors have found nonconventional dysplasia more frequently associated with advanced neoplasms [19]. However, some of the early precursors such as hypermucinous dysplasia or serrated epithelial were observed

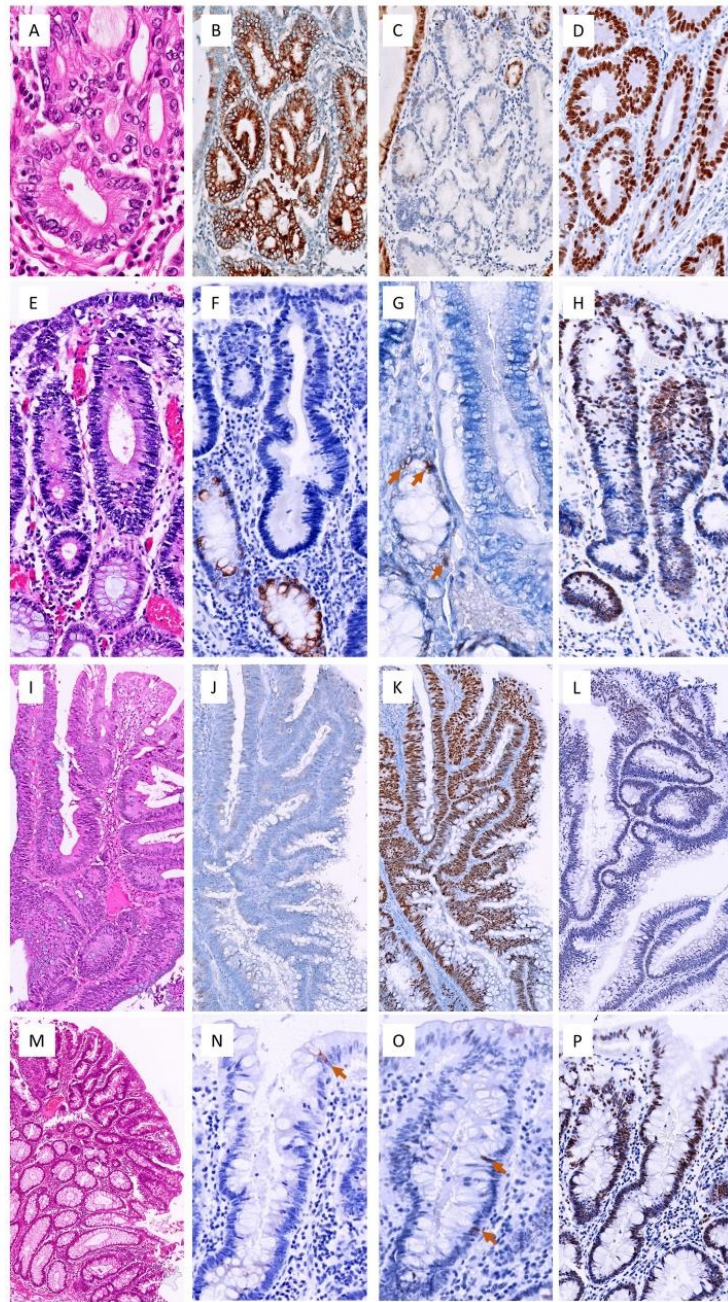


Fig. 3. Examples of IHC in nonconventional and conventional dysplasias. Crypt cell atypia/dysplasia (A) with intense and diffuse cytoplasmic expression of MUC5AC (B), loss of CDX2 (C) and p53-mut pattern (overexpression) (D). Goblet cell depleted dysplasia (E) with loss of MUC5AC (note the positive cytoplasmic staining in adjacent normal glands) (F), p53-mut pattern (null pattern) with positive scattered nuclei in normal glands (arrows) as internal positive control (G) and partial loss of MLH1 expression (H). Traditional serrated adenoma-like (I) without MUC5AC expression (J), p53-mut pattern (overexpression) (K) and partial loss of MLH1 expression (L). Tubular adenoma-like (M) with MUC5AC negative with presence of a single positive cell (arrow) in the surface epithelium (N), p53-wt pattern with scattered positive nuclei (arrows) (O) and MLH1 expression (P).

Table 4
Relation between MUC5AC expression with CDX2 and p53 staining in nonconventional dysplasias.

		MUC5AC			p value
		Positive (%)	Negative (%)	Total (%)	
CDX2	Positive	19 (37)	18 (95)	37 (53)	<0.001
	Negative	32 (63)	1 (5)	33 (47)	
Total		51 (73)	19 (27)	70 (100)	
p53	wt-pattern	34 (67)	7 (37)	41 (59)	0.031
	mut-pattern	17 (33)	12 (63)	29 (41)	
Total		51 (73)	19 (27)	70 (100)	

adjacent to neoplasms, thus confirming the precursor status of these early lesions [7]. No relation was observed in both types of dysplasia with the duration of IBD although there was a trend between UC patients and nonconventional dysplasia.

We found 61 nonconventional dysplastic lesions in 33 IBD specimens. Given the retrospective nature of the studies describing nonconventional dysplasia, the number and type of nonconventional dysplasia identified is highly variable. The number of lesions identified depends directly on the sampling of colectomies and the expertise of the pathologist, since many of them are flat lesions, invisible to macroscopic inspection, and different types are often found in the same specimen [11, 17–19,25,27]. Multiple nonconventional dysplasia was present in 13 patients, located on the same and different sides of the colon, as other authors have reported [11,18], while only one patient had multiple conventional dysplastic lesions on the same side of the colon.

The presence of foveolar gastric metaplasia was assessed by the immunoeexpression of MUC5AC and loss of CDX2 in the same gland. We observed gastric metaplasia in the superficial epithelia of colon mucosa re-epithelializing granulation tissue, as well as in areas of mucosa with chronic changes, confirming our previous observations about the appearance of gastric metaplasia as an adaptive mechanism to inflammatory damage [21]. In addition, gastric metaplasia was identified mainly in nonconventional dysplasia and its adjacent mucosa with chronic changes in colectomies with UC. We detected gastric metaplasia in all types of nonconventional dysplasia, except for dysplasia with increased Paneth cell differentiation, located in a quiescent UC in the rectosigmoid colon. Considering that crypts with Paneth cells characterize intestinal metaplasia and help identify long-standing IBD when found in the left colon, the absence of gastric metaplasia observed supports its intestinal origin. Gastric metaplasia was mostly observed in nonconventional dysplasia without dysplasia such as hypermucinous dysplasia and in sessile serrated lesion-like but also in crypt cell atypia/dysplasia characterized by dysplastic features. As for conventional dysplasia, gastric metaplasia was identified less frequently than in nonconventional dysplasia (19 % vs. 46 %) and was not detected in any adjacent mucosa, suggesting that gastric metaplasia is not the substrate of origin for conventional dysplasia.

In our study, there was a strong significant association between MUC5AC expression and partial loss of CDX2 supporting the foveolar gastric metaplasia condition. Loss of colonic markers, SATB2 and CDX2, was previously reported by Ma et al. identifying loss of SATB2 in

dysplasia and IBD-associated CRC, but not in sporadic patients [28,29]. However, loss of colonic markers was not associated in their studies with the presence of gastric metaplasia.

We observed a progressive decrease in MUC5AC expression with the appearance and increase of the degree of dysplasia. *TP53* gene is the most frequently involved in the early pathway of IBD “inflamed-dysplasia-carcinoma” sequence [7,30,31]. The p53-mut pattern of immunoeexpression was identified more frequently in HGD nonconventional dysplasia lacking MUC5AC. Importantly, the fact that MUC5AC expression showed a p53-wt pattern supports that gastric metaplasia precedes the appearance of *TP53* mutations. Expression changes in MUC5AC and p53 reflect the molecular alterations that transform the metaplastic epithelium into dysplastic. Our results support a role for *TP53* in the earliest events of the CAC pathway. We observed altered p53 expression in both low-risk and high-risk nonconventional dysplasia, with increasing rates in higher-grade dysplasia but not in adjacent colonic mucosal or in non-dysplastic nonconventional dysplasia. However, *TP53* mutations, missense and nonsense, had been reported in serrated epithelial change without dysplasia using a NGS approach [7]. The fact that these mutations may be subclonal and the lack of a perfect correlation between the presence of *TP53* mutations and p53 expression could explain the observed discordances [22].

Regarding microsatellite instability, we identified a lack of MLH1 expression in the surface epithelium in both normal mucosa and mucosa with active inflammation or chronic changes. The lack of MLH1 staining in the more mature colon epithelium could be the expression of inactivation of mismatch repair genes in nonproliferating cells. Furthermore, our results agree with previous reports showing the absence of a relevant role of mismatch repair genes in DNA repair phenomena occurring in IBD colonic mucosa [32,33].

Recently, we have shown that CRC characterized by lack of p53 alterations, presence of MUC5AC expression, and complete loss of MLH1 expression appears in IBD probably following the serrated pathway [21]. Although we have demonstrated the presence of foveolar gastric metaplasia in most nonconventional dysplasia, we have not seen a complete loss of MLH1 in any of them that would allow us to identify the precursor lesions of CRC of the serrated pathway. The methylation changes that occur in precursor lesions affect different genes in a non-random manner [34,26]. In sessile serrated lesion, complete loss of MLH1 expression correlates with a threshold for promoter methylation and coincides with the onset of dysplasia [34]. The presence of partial loss of MLH1 staining could be the expression of MLH1 hypermethylation heterogeneity that occurs in both types of precursor lesions [26].

Finally, the pattern of MUC5AC and CDX2 expression observed in conventional dysplasia, especially in tubulovillous adenoma-like, favors the diagnosis of serrated lesions, illustrating the morphological overlap that occurs between both types of lesions [35].

In summary, our results support that foveolar gastric metaplasia appears in IBD colon mucosa as an adaptive mechanism to chronic inflammatory damage, and is the substrate of most nonconventional dysplasia prior to the appearance of *TP53* alterations and is the initial event of CAC and serrated pathway CRC appearing in IBD.

Table 5
Relation of the presence of gastric metaplasia according to the type of nonconventional dysplasias.

Gastric metaplasia	Type of nonconventional dysplasia							Total	p value
	HM	GCD	SL NOS	CCA/D	SEC	SSL-like	TSA-like		
No	4 (29)	10 (77)	7 (58)	3 (43)	4 (57)	3 (30)	6 (100)	38 (54)	0.034
Yes	10 (71)	3 (23)	5 (42)	4 (57)	3 (43)	7 (70)	0	32 (46)	

Abbreviations: HM, hypermucinous; GCD, goblet cell deficient; SL NOS, serrated lesion not otherwise specified; CCA/D, crypt cell atypia/dysplasia; SEC, serrated epithelial change; SSL-like, sessile serrated lesion like; TSA-like, traditional serrated adenoma like; DPD, dysplasia with increased Paneth cell differentiation.

Funding

This work was supported by Roche, Switzerland (activity code: SP210830002).

Ethics approval/consent to participate

This study has been approved by the ethics committee of the Hospital Universitari General de Catalunya (2020/139-APA-HUGC-HUSC-HQV) as well as by the respective ethics committees of the participating centers.

Author contribution statement

M.G., M.C. and E.M., conceptualization, data curation, formal analysis, methodology, investigation; M.G., original draft; M.C. and E.M., writing; E.M., review & editing and funding acquisition; I.A., J.A.V., M. J.F.-A., V.F.-C., J.T., I.J., R.F.-V., C.M.-C., C.A.G., C.Z., data curation; M. T.F.-F. and M.E., resources. All authors read and approved the final paper.

Data availability statement

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

We want to particularly acknowledge the patients and the technical staff of the Hospital Universitari General de Catalunya-Grupo Quironsalud and Patologia Integrada, S.L. Work technically supported by Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya (XBTC).

References

- [1] 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;19:789–99. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e31828029c0>.
- [2] Jess T, Gomborg M, Matzen P, et al. Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2724–9. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.00287.x>.
- [3] Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, et al. Current management of inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2011;4:53–61.
- [4] Linson EA, Hanauer SB. Epidemiology of colorectal cancer in inflammatory bowel disease - the evolving landscape. *Curr Gastroenterol Rep* 2021;23:16. <https://doi.org/10.1007/s11894-021-00816-3>.
- [5] Da Cunha T, Vaziri H, Wu GY. Primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease: a review. *J Clin Transl Hepatol* 2022;10:531–42. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00344>.
- [6] Galandiuk S, Rodriguez-Justo M, Jeffery R, et al. Field cancerization in the intestinal epithelium of patients with Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 2012;142:855–64. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.004>.
- [7] Singh AD, Waters KM, Makhoul EP, et al. Targeted next-generation sequencing supports serrated epithelial change as an early precursor to inflammatory bowel disease-associated colorectal neoplasia. *Hum Pathol* 2021;112:9–19. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2021.03.002>.
- [8] Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2000;47:251–5. <https://doi.org/10.1136/gut.47.2.251>.
- [9] Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983;14:931–68. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(83\)80175-0](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(83)80175-0).
- [10] Harpaz N, Goldblum JR, Shepherd N, et al. Novel classification of dysplasia in IBD. *Mod Pathol* 2017;30:174A. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51268-2_6.
- [11] Choi WT, Yozu M, Miller GC, et al. Nonconventional dysplasia in patients with inflammatory bowel disease and colorectal carcinoma: a multicenter clinicopathologic study. *Mod Pathol* 2020;33:933–43. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0419-1>.
- [12] Wen KW, Umetsu SE, Goldblum JR, et al. DNA flow cytometric and interobserver study of crypt cell atypia in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 2019;75:578–88. <https://doi.org/10.1111/his.13923>.
- [13] Gui X, Köbel M, Ferraz JGP, et al. Newly recognized non-adenomatous lesions associated with enteric carcinomas in inflammatory bowel disease - report of six rare and unique cases. *Ann Diagn Pathol* 2020;44:151455. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2019.151455>.
- [14] Waters KM, Singh AD, Montgomery EA. Exploring the spectrum of serrated epithelium encountered in inflammatory bowel disease. *Hum Pathol* 2023;132:126–34. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2022.06.018>.
- [15] Johnson DH, Taylor WR, Abelsoud MM, et al. DNA Methylation and mutation of small colonic neoplasms in ulcerative colitis and Crohn's colitis: implications for surveillance. *Inflamm Bowel Dis* 2016;22:1559–67. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000795>.
- [16] Choi WT, Wen KW, Rabinovitch PS, et al. DNA content analysis of colorectal serrated lesions detects an aneuploid subset of inflammatory bowel disease-associated serrated epithelial change and traditional serrated adenomas. *Histopathology* 2018;73:464–72. <https://doi.org/10.1111/his.13652>.
- [17] Kamarádová K, Vošmiková H, Rozkošová K, et al. Non-conventional mucosal lesions (serrated epithelial change, villous hypermucinous change) are frequent in patients with inflammatory bowel disease-results of molecular and immunohistochemical single institutional study. *Virchows Arch* 2020;476:231–41. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02627-4>.
- [18] Gui X, Köbel M, Ferraz JG, et al. Histological and molecular diversity and heterogeneity of precancerous lesions associated with inflammatory bowel diseases. *J Clin Pathol* 2020;73:391–402. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-206247>.
- [19] Lee H, Rabinovitch PS, Mattis AN, et al. Non-conventional dysplasia in inflammatory bowel disease is more frequently associated with advanced neoplasia and aneuploidy than conventional dysplasia. *Histopathology* 2021;78:814–30. <https://doi.org/10.1111/his.14298>.
- [20] Chen B, Scurrell CR, McKinley ET, et al. Differential pre-malignant programs and microenvironment chart distinct paths to malignancy in human colorectal polyps. *Cell* 2021;184:6262–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.031>.
- [21] Gené M, Cuatrecasas M, Amat I, et al. Alterations in p53, microsatellite stability and lack of MUC5AC expression as molecular features of colorectal carcinoma associated with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Sci* 2023;24:8655. <https://doi.org/10.3390/ijms24108655>.
- [22] Köbel M, Piskorz AM, Lee S, et al. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *J Pathol Clin Res* 2016;2:247–58. <https://doi.org/10.1002/cjp2.53>.
- [23] Rico SD, Mahnen K, Büschel F, et al. MUC5AC Expression in various tumor types and nonneoplastic tissue: a tissue microarray study on 10399 tissue samples. *Technol Cancer Res Treat* 2021;20:15330338211043328. <https://doi.org/10.1177/15330338211043328>. Erratum in: *Technol Cancer Res Treat*. 2022 Jan-Dec;21:15330338221099574.
- [24] Nguyen ED, Wang D, Lauwers GY, et al. Increased histologic inflammation is an independent risk factor for nonconventional dysplasia in ulcerative colitis. *Histopathology* 2022;81:644–52. <https://doi.org/10.1111/his.14765>.
- [25] Zhang R, Lauwers GY, Choi WT. Increased Risk of Non-Conventional and Invisible Dysplasias in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2022;16:1825–34. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjac090>.
- [26] Dhir M, Yachida S, Van Neste L, et al. Sessile serrated adenomas and classical adenomas: an epigenetic perspective on premalignant neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 2011;129:1889–98. <https://doi.org/10.1002/ijc.25847>.
- [27] Bahceci D, Lauwers GY, Choi WT. Clinicopathologic features of undetected dysplasia found in total colectomy or proctocolectomy specimens of patients with inflammatory bowel disease. *Histopathology* 2022;81:183–91. <https://doi.org/10.1111/his.14673>.
- [28] Ma C, Olevian D, Miller C. SATB2 and CDX2 are prognostic biomarkers in DNA mismatch repair protein deficient colon cancer. *Mod Pathol* 2019;32:1217–31. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0265-1>.
- [29] Ma C, Henn P, Miller C, et al. Loss of SATB2 Expression Is a biomarker of inflammatory bowel disease-associated colorectal dysplasia and adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2019;43:1314–22. <https://doi.org/10.1097/pas.0000000000001330>.
- [30] Leedham SJ, Graham TA, Oukrif D, et al. Clonality, founder mutations, and field cancerization in human ulcerative colitis-associated neoplasia. *Gastroenterology* 2009;136:542–50. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.086>.

E. Musulen et al.

Human Pathology 143 (2024) 50–61

- [31] Robles AI, Traverso G, Zhang M, et al. Whole-exome sequencing analyses of inflammatory bowel disease – associated colorectal cancers. *Gastroenterology* 2016;150:931–43. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.036>.
- [32] De Angelis PM, Dorg L, Pham S, et al. DNA repair protein expression and oxidative/nitrosative stress in ulcerative colitis and sporadic colorectal cancer. *Anticancer Res* 2021;41:3261–70. <https://doi.org/10.21873/anticancer.15112>.
- [33] Cawkwell L, Sutherland F, Murgatroyd H, et al. Defective hMSH2/hMLH1 protein expression is seen infrequently in ulcerative colitis associated colorectal cancers. *Gut* 2000;46:367–9. <https://doi.org/10.1136/gut.46.3.367>.
- [34] Liu C, Fennell LJ, Bettington ML, et al. DNA methylation changes that precede onset of dysplasia in advanced sessile serrated adenomas. *Clin Epigenet* 2019;11:90. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0691-4>.
- [35] Cansız Ersöz C, Kiremitçi S, Savas B, et al. Differential diagnosis of traditional serrated adenomas and tubulovillous adenomas: a compartmental morphologic and immunohistochemical analysis. *Acta Gastroenterol Belg* 2020;83:549–56.

5. RESUM GLOBAL DE **RESULTATS**

Per respondre a l'objectiu principal, estudiar el comportament dels marcadors que caracteritzen la via serrada als carcinomes desenvolupats a la MII i explorar la contribució de la MG a la carcinogènesi de la via inflamatòria, es van estudiar 57 adenocarcinomes i 35 mucoses adjacents en peces de budell prim i còlon afectades per MII, 19 amb MC i 38 amb CU, i es van analitzar les següents alteracions moleculars: la mutació de *TP53*, amb l'expressió immunohistoquímica de la proteïna p53 com a subrogat de les mutacions del gen; la IMS, a través de l'expressió de las proteïnes dels gens reparadors de l'ADN, i la presència d'un fenotip gàstric amb l'expressió de MUC5AC, tant a l'adenocarcinoma com a la mucosa adjacent.

Els resultat obtinguts van ser:

1. La distribució dels carcinomes es correlacionava amb el tram afectat per la MII, de manera que la majoria dels adenocarcinomes a la MC es trobaren a l'íleon (7/19, 37%) i còlon dret (6/19, 31.5%), mentre que a la CU els tumors eren més freqüents al còlon esquerre (15/38, 39,5%) ($p = 0.003$).
2. El 51% (29/57) dels carcinomes van presentar un patró mutat de p53 (p53-mut), 22 amb patró de sobreexpressió i 7 casos amb patró nul.
3. L'11% (6/57) dels carcinomes eren tumors inestables, amb pèrdua d'expressió de MLH1 i de PMS2.
4. Tots els tumors inestables tenien un patró de p53 de tipus no mutat (p53-wt) (6/6, 100%) ($p = 0.010$).
5. MUC5AC era positiu extens o focal en el 44% dels adenocarcinomes (25/57).
6. La majoria d'adenocarcinomes amb expressió de MUC5AC presentaven un patró de p53-wt (15/25, 60%) ($p = 0,186$), i tots els tumors inestables expressaven aquest marcador (6/6, 100%) ($p = 0.005$).
7. Els tumors inestables tenien característiques histològiques i una distribució similar als adenocarcinomes que s'originen a la via serrada o a la SL, que es va confirmar en 1 dels 4 pacients amb aquesta sospita (MLH1 negatiu/*BRAF*-wt).
8. La mucosa adjacent al carcinoma presentava patró de p53-wt en tots els casos (100%).

9. L'expressió de MUC5AC a la mucosa adjacent mostrava positivitats en el 77% dels casos (27/35). Segons el tipus de lesió, l'expressió de MUC5AC va ser positiva en el 100% (4/4) dels casos amb mucosa amb inflamació activa, 79% (15/19) amb inflamació crònica i 67% (8/12) a la mucosa sense alteracions morfològiques ($p = 0.374$).

A través de l'anàlisi d'aquests resultats es conclou que és a la mucosa afectada d'inflamació crònica on apareix el CaMII, que aquesta mucosa amb dany crònic es reepitelitza a través de l'aparició de MG, i és en aquest epitel·li metaplàstic on s'inicia la transformació que condueix a la displàsia, a través de les alteracions de *TP53* i sense la participació de la IMS.

D'aquesta manera es defineix un perfil molecular del CaMII caracteritzat per la mutació de *TP53*, absència d'IMS i sense expressió de MUC5AC.

D'altra banda la positivitats de MUC5AC a tots els tumors inestables amb absència d'expressió de p53, alteracions compatibles amb la via serrada de carcinogènesi, recolza la hipòtesi que la MG és també el substrat on s'inicia aquesta via, i que comparteix la seqüència "inflamació crònica-displàsia-carcinoma" amb la via inflamatòria que origina el CaMII.

Per tal de conèixer com es desenvolupa la via inflamatòria de carcinogènesi a través de les lesions precursors s'estudiaren 33 peces de còlon amb MII, 9 amb MC i 24 amb CU, per identificar els diferents tipus de displàsies, DC i DNC, analitzar el seu perfil immunohistoquímic i comparar-lo amb el de la mucosa adjacent.

S'estudià l'expressió de la proteïna p53 com a marcador subrogat de la mutació de *TP53*, alteració inicial relacionada amb el CaMII, i la pèrdua d'expressió total de MLH1, com a conseqüència de la hipermetilació del gen *MLH1*.

Per identificar la MG es va analitzar de forma concomitant l'expressió de MUC5AC, com a marcador d'epitel·li gàstric, i la pèrdua d'expressió CDX2, marcador de diferenciació intestinal.

Els resultats més rellevants van ser els següents:

1. Es van identificar 61 DNC sobretot en peces amb CU (51/61, 84%), de forma aïllada (39/61, 59%) o amb DC (25/61, 41%).

2. La presència de la DNC seguia el mateix patró de distribució que el de la inflamació, a la MC al còlon dret (4/10, 40%) i al recte a la CU (17/51, 33%) ($p = 0.000$).
3. Entre les DNC, els tipus més freqüents foren la hipermucinoso (14, 23%), la depleció de cèl·lules caliciformes (12, 19,7%) i les LSS-NOS (9, 14,8%).
4. La majoria de les DNC (48/61, 79%) es trobaren en relació a una mucosa amb inflamació activa, sobretot a la CU (40/51, 78%) ($p = 0,912$).
5. La majoria de les DNC (33/61, 54%) tenien una morfologia plana.
6. La major part de les DNC (31/61, 50,8%) presentaven DBG i només 13 (21%) DAG, totes elles a la CU.
7. Només 9 (14,8%) de les DNC presentaven DBG i DAG: AST-like (2), LS,NOS-like (3), LSS-like (3) i depleció de cèl·lules caliciformes (1).
8. Disset DNC no presentaven àrees de displàsia.
9. La DNC es va trobar concomitantment amb CCR en el 33% (20/61) dels casos.
10. Es van identificar 15 DC, 14 (93%) AT-like amb DBG i 1 (7%) ATV-like amb DBG i DAG.
11. La majoria de les DC es van trobar a peces amb CU amb activitat quiescent (67%) i amb adenocarcinoma (80%).
12. S'identificà MG en un 46% (32/61) de les DNC, especialment a la displàsia hipermucinoso i a les lesions tipus LSS, que a la vegada són les lesions més freqüentment observades de DNC.
13. El nivell d'expressió de MUC5AC en la DNC decreixia amb l'augment del grau de la displàsia ($p = 0,006$).
14. L'expressió de CDX2 a les DNC es perdia parcialment i disminuïa la seva intensitat de manera inversament proporcional als canvis d'expressió de MUC5AC ($p = 0,001$).
15. La majoria de lesions de DNC amb expressió de MUC5AC presentaven un patró de p53-wt (34/51, 67%) mentre que aquelles sense expressió de MUC5AC mostraren un patró de p53-mut (nul o sobreexpressat) (12/19, 63%) ($p = 0,031$).
16. S'identificà MG en el 7% (1/14) dels AT i al ATV, ambdues amb pèrdua de CDX2.

17. Es va identificar MG a la mucosa adjacent de les DNC en el 59% (24/41) dels casos, però mai en relació a les DC.

18. Totes les mucoses adjacents estudiades presentaren un patró de p53-wt.

19. No s'observà pèrdua total d'expressió de MLH1 en cap de les lesions precursors ni a la mucosa adjacent.

Amb aquests resultats podem concloure que la majoria de lesions de DNC s'inicien a la mucosa amb MG sobre la que apareixen alteracions de *TP53*.

Si analitzem els resultats en global podem extreure que es confirma la relació de la MG amb la carcinogènesi del CaMII per la seva presència tant a la mucosa adjacent a les DNC com a la de l'adenocarcinoma. El fet que la MG a la mucosa adjacent només s'observi en relació a les DNC ens indica que són aquestes les lesions precursors del CaMII. També es constata aquest fet a través de les alteracions de *TP53*, una alteració inicial característica al CaMII, ja que són només les DNC les que de forma precoç expressen p53, l'expressió de la qual augmenta a mida que s'incrementa el grau de displàsia.

6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ

El CaMII és el resultat de l'alteració de gens implicats a la seqüència “inflamació crònica-displàsia-càncer”, i malgrat que comparteix aquest fet amb la via serrada, mostra un escenari d'anomalies diferent del que presenten les vies canònica i serrada de carcinogènesi del CCR.

La via inflamatòria, en el transcurs de la MII perllongada, es caracteritza per les alteracions de *TP53* que apareixen en estadis primerencs, fins i tot a la mucosa del còlon sense canvis displàstics, contribuint a establir un camp de cancerització (118,119). A la nostra sèrie de CCR en peces de MII estudiada, i d'acord amb les dades publicades, es va observar un patró de p53-mut en més de la meitat dels tumors, independentment del subtipus de MII (42,43,94,95). No obstant això, no es va trobar cap patró de p53-mut a la mucosa intestinal adjacent als adenocarcinomes, per la qual cosa no vam poder constatar la presència d'un camp de cancerització.

Pel que fa a la IMS, s'ha descrit la presència d'IMS als CCR amb MII, especialment a la CU, entre el 3 i el 18% dels casos (52,82,120–123). Al nostre estudi, es va trobar IMS en el 10,5% dels CCR, dins del rang descrit, i amb la mateixa incidència a la MC que a la CU. A més, vam trobar una significació estadística entre l'expressió de p53 i la IMS, de manera que tots els carcinomes amb patró de p53-mut eren estables i tots els que eren inestables mostraven un patró de p53-wt. Per tant, els nostres resultats donen suport al paper de la IMS en un subconjunt de tumors desenvolupats en el context de la MII. A més, aquests tumors inestables tenien altres característiques clíniques i patològiques de CCR amb IMS idèntics als descrits a la via serrada, com la localització dreta al còlon i una histologia concreta, carcinomes mucinosos, medul·lars o de cèl·lules en anell de segell, d'acord amb observacions prèvies d'altres autors (124–126). Val a dir que aquesta sèrie de característiques també es descriuen als CCR associats a la SL. Al nostre estudi, es va excloure la SL en un pacient major de 70 anys amb CU i dos tumors sincrònics, ja que les característiques moleculars de tots dos CCR i els antecedents familiars no recolzaven el diagnòstic d'aquesta síndrome. Les neoplàsies multifocals són presents al 38% dels pacients amb CU i aquestes neoplàsies sincròniques solen ser heterogènies (46). Per contra, el nostre pacient tenia dos CCR inestables que compartien les alteracions moleculars i les característiques histològiques

probablement pel fet que ambdues neoplàsies apareixien al mateix costat del còlon. Els altres 4 pacients amb CCR inestables tenien uns 50 anys. Un era un SL amb CU de 4 anys de durada. El CCR va ser probablement el resultat del risc sumatori de les dues afeccions. La presència de MII i SL al mateix pacient és una situació poc freqüent atesa l'escassa literatura que informa d'aquests casos (127–132) i la baixa taxa de mutacions de línia germinal trobades en pacients amb MII (133). No obstant això, és important excloure la SL en aquells CCR amb IMS per definir el pronòstic en pacients amb CCR d'aparició primerenca, donat que tenen pitjor pronòstic els CCR relacionats amb MII, és intermedi en els esporàdics i millor en el grup hereditari (130). En els tres pacients restants amb CCR inestables, MII de curta durada i amb *BRAF*-wt, no es pot descartar que estiguin associats a la SL per la impossibilitat de conèixer l'estatus d'hipermetilació de *MLH1*.

La tinció MUC5AC, característica de l'epiteli foveolar gàstric (110,112), es va identificar en menys de la meitat (44%) dels CCR, però es va mantenir en el 77% dels 35 casos a la mucosa intestinal adjacent disponible. Els carcinomes positius per a MUC5AC eren més freqüentment aquells amb un patró de p53-wt i estables, encara que l'expressió de MUC5AC era present en tots els casos amb IMS. A més, tenint en compte que la majoria dels tumors amb patró de p53-mut no tenien expressió de MUC5AC, es pot deduir que l'aparició del canvi epitelial gàstric es produeix en la mucosa inflamada, persisteix en aquella amb canvis crònics i regeneratius, i es manté als CCR sense mutació de *TP53*, però es perd en els CCR p53-mut.

En base als resultats obtinguts, podem caracteritzar als CaMII que es desenvolupen a través de la via inflamatòria per la presència de les següents característiques moleculars: un patró de p53-mut, manca d'IMS i manca d'expressió de MUC5AC.

Si extrapolem l'expressió de MUC5AC, marcador de l'epiteli foveolar gàstric, a la presència de MG, els nostres resultats concorden amb les dades recentment publicades per Chen *et al.* que identifiquen la MG com a substrat per a l'inici de la via serrada del CCR, com a resultat de l'adaptació a la lesió contínua de l'epiteli del còlon dret (116). Per tant, en base als nostres resultats podem argumentar que la MG és el canvi compartit pels CaMII i el CCR serrat en què

s'inicia la seqüència "inflamació crònica-displàsia-càncer". D'altra banda poden afirmar que els CCR que apareixen a la MII i que mostren un perfil inestable amb patró de p53-wt i expressió de MUC5AC, diferent al dels CaMII, són CCR de la via serrada, un cop exclosa la possibilitat d'estar associats a la SL.

Un cop caracteritzats els CaMII i identificada la presència d'epiteli gàstric a la mucosa adjacent als carcinomes a través de l'expressió de MUC5AC, vam voler conèixer com es comportaven les lesions precursors dels CaMII a la MC i la CU estudiant els mateixos marcadors amb els que havíem diferenciat les vies inflamatòria i serrada, i afegint l'expressió de CDX2 per a definir millor la MG.

L'objectiu era explorar la presència de MG i la relació amb la displàsia en una sèrie de DNC i DC identificades retrospectivament a partir de colectomies amb MII amb o sense CCR concomitant.

A la MII, la displàsia es genera sobre una mucosa inflamada, creant múltiples lesions planes, moltes vegades no visibles a la colonoscòpia, per la qual cosa aquests pacients requereixen controls estrets (10). La DC és la forma més reconeguda de displàsia, tot i que recentment, s'han descrit noves lesions de patrons histològics diversos anomenades DNC (43). Entre les diverses classificacions de DNC que existeixen (42,43,94,95), vam escollir la de *Choi et al*, per a classificar les lesions del nostre estudi, identificant 15 lesions de DC i 61 de DNC en 33 peces de colectomies de pacients amb MII. La dificultat de mostreig de les peces degut a que moltes lesions no són visibles, la presència de múltiples lesions a la mateixa peça, la poca reproductibilitat d'aquestes classificacions, i la manca d'experiència del patòleg en la seva identificació, fa variar enormement en nombre de DNC trobades (41–45). Pel que fa al nostre estudi, 13 dels pacients estudiats tenien múltiples lesions de DNC en diferents llocs del còlon.

En primer lloc vam identificar diferències a la distribució dels dos tipus de displàsies. Mentre que les DNC es van localitzar amb més freqüència en colectomies amb inflamació aguda, i seguint la distribució característica de la inflamació segons el tipus de MII i en espècimens sense adenocarcinoma, tal i com es descriu en altres estudis (42,43,134), les DC es van trobar amb més

freqüència en espècimens amb activitat quiescent, sense relació amb la distribució de la inflamació al còlon segons el tipus MII i amb adenocarcinoma concomitant. A diferència de les nostres troballes, altres autors han trobat les DNC més freqüentment associades a neoplàsies avançades (139). Tot i així, vam observar alguns dels precursors com la hiperplàsia hiper mucinosa o les lesions de DNC de tipus lesió serrada, fins i tot sense displàsia, adjacents a neoplàsies, confirmant l'estatus precursor d'aquestes lesions primerenques, com ja s'havia descrit prèviament (162). No es va observar cap relació entre ambdós tipus de displàsia i la durada de la MII, encara que si s'observa una tendència entre la presència de DNC i la CU.

Els nostres resultats reporten com a lesions més freqüents de DNC la displàsia hiper mucinosa, les lesions tipus LSS i la displàsia amb deficiència de cèl·lules caliciformes. Les primeres es caracteritzen per no presentar displàsia, i es en aquestes on principalment es va observar MG, tot i que també es va identificar el perfil immunohistoquímic de MG a la displàsia de cèl·lules de la cripta, caracteritzada per trets displàstics. Tant en la hiperplàsia mucinosa com en la DNC tipus LSS vam observar un clar fenotip gàstric, morfològic i immunohistoquímic. Aquest fet concorda amb l'última classificació de Harpaz *et al.*, sobre les DNC, que engloba dins un fenotip gàstric la displàsia hiper mucinosa i lesions serrades de fenotip gàstric (94) i reforça la hipòtesi que les DNC, en especial les que presenten fenotip gàstric, són l'evolució de la MG observada a la mucosa adjacent d'aquests pacients.

A la DC, la MG es va identificar amb menys freqüència que a la DNC (19% davant del 46%) i no es va detectar en cap mucosa adjacent, cosa que suggereix que la MG no és el substrat on s'origina la DC. Per altra banda, la presència de MG, que afavoreix el diagnòstic de lesió serrada, especialment al TVA-like, il·lustra el solapament morfològic que es produeix entre els dos tipus de displàsies (135).

Al nostre estudi observarem una disminució progressiva de l'expressió de MUC5AC a mesura que apareixia i augmentava el grau de displàsia. El gen *TP53* és el més freqüentment implicat a la via primerenca de la seqüència "inflamació crònica-displàsia-carcinoma" a la MII (136–138). El patró de p53-mut es va identificar amb més freqüència a la DNC amb DAG i sense MUC5AC. És important destacar que el fet que l'expressió de MUC5AC

mostrés un patró de p53-wt recolza que la MG precedeix l'aparició de mutacions de *TP53*. Els canvis a l'expressió de MUC5AC i p53 reflecteixen les alteracions moleculars que transformen l'epiteli metaplàstic en displàsic.

Els nostres resultats donen suport al paper de *TP53* en els esdeveniments més primerencs de la via inflamatòria, ja que hem trobat una expressió alterada de p53 tant a la DNC amb DBG com a la DAG, amb taxes creixents a la displàsia de més grau. La mucosa inflamada o sana adjacent a les lesions tenia expressió de p53-wt, fet que suposa una discordança respecte a les dades trobades a la literatura que mostren alteracions de *TP53* a mucosa inflamada (73,74,136) i mutacions, *missense* i *nonsense*, a DNC de tipus serrat sense displàsia utilitzant un enfocament NGS (136). El fet que aquestes mutacions puguin ser subclonals i la manca d'una correlació perfecta entre la presència de mutacions *TP53* i l'expressió de p53 podrien explicar la discordança observada (139) .

Tot i que vam demostrar la presència de MG a les DNC, no vam observar una pèrdua completa d'expressió de MLH1 a cap d'elles que ens permetés identificar les lesions precursors del CCR de la via serrada. Els canvis de metilació que es produeixen a les lesions precursors afecten diferents gens de forma no aleatòria (140,141). A la LSS, la pèrdua completa de l'expressió de MLH1 es correlaciona amb un llindar de metilació del promotor i coincideix amb l'inici de la displàsia (140). El fet d'observar pèrdua parcial de tinció de MLH1 podria ser l'expressió de l'heterogeneïtat d'hipermetilació de *MLH1* que es produeix en ambdós tipus de lesions precursors (82,142).

En relació a la IMS a la mucosa adjacent a les lesions, identifiquem una manca d'expressió de MLH1 a l'epiteli superficial tant a la mucosa normal com a la mucosa amb inflamació activa o amb canvis crònics. La manca de tinció de MLH1 a l'epiteli de còlon més madur podria ser l'expressió de la inactivació dels gens del sistema MMR a les cèl·lules no proliferants. D'altra banda, els nostres resultats concorden amb estudis previs que mostren l'absència d'un paper rellevant dels gens del sistema MMR en els fenòmens de reparació de l'ADN que tenen lloc a la mucosa còlica a la MII (143,144).

En resum, els nostres resultats recolzen que la MG apareix a la mucosa del còlon amb MII com un mecanisme adaptatiu al dany inflamatori crònic i és el substrat de la majoria de les DNC on l'aparició de les alteracions de *TP53* inicien la via de carcinogènesi del CaMII.

Concloem doncs, que la MG és un canvi que comparteixen la via inflamatòria que origina el CaMII i la via serrada, que apareix com a fenomen d'adaptació al l'estrès crònic de la mucosa i previ a l'aparició de la displàsia, confirmant la seqüència “inflamació crònica-metaplàsia gàstrica-displàsia-carcinoma”.

7. CONCLUSIONS

Així doncs, amb els nostres resultats concloem que:

1. El CaMII es caracteritza molecularment per les alteracions en el gen *TP53*, l'estabilitat de microsatèl·lites i la manca d'expressió de MUC5AC.
2. La positivitat de MUC5AC en tumors amb inestabilitat de microsatèl·lites i patró de p53 no mutat a la MII suggereix que es tracta de carcinomes associats a la via serrada.
3. La DNC, especialment les de tipus hipermucinosos i les lesions serrades, és una lesió precursora del CaMII que es desenvolupa sobre un substrat de MG.
4. La presència de MG a la mucosa adjacent del CaMII i de les DNC, així com en algunes d'aquestes lesions, juntament amb la seva desaparició progressiva amb l'augment del grau de displàsia, suggereix que la MG és un procés reparador de la mucosa còlica sotmesa a un dany crònic perllongat.
5. La MG apareix com a pas previ a la displàsia i dona suport a la seqüència "inflamació crònica → metaplàsia gàstrica → displàsia → carcinoma".

8. LÍNIES DE FUTUR

El nostre estudi remarca el paper de la MG com a pas previ a la displàsia en la via de la inflamació del CCR, formant part de la seqüència “inflamació crònica-metaplàsia gàstrica-displàsia-càncer” en pacients amb MII. Aquest procés ha estat descrit en altres localitzacions del tracte gastrointestinal com a l'esòfag o l'estómac, però no s'ha descrit fins ara al còlon.

Una de les línies interessants a desenvolupar és seguir amb l'estudi d'altres alteracions relacionades amb estadis inicials del CaMII, diferents a la mutació de *TP53*, com *KRAS*, *ARID1* i *PtGR*. Saber quina d'aquestes alteracions estan presents en lesions precursors amb MG ens ajudaria a confirmar que són lesions precursors del CaMII i recolzaria la nostra hipòtesi sobre la relació de la MG amb aquesta via.

Un altre camí a explorar és estudiar el canvi que es produeix en el microambient o camp de cancerització abans i després de l'aparició de la MG en pacients amb MII, i establir possibles vies d'inflamació que afavoreixin l'aparició d'aquesta, per tal de buscar dianes per bloquejar-les, evitant l'aparició de la metaplàsia, i per tant, el substrat on s'inicia la progressió a carcinoma.

Per altra banda, com ja hem mencionat, no hi ha una classificació robusta i reproducible de les DNC a la MII. Un anàlisi més detallat a nivell molecular ens ajudaria a discernir millor quina d'aquestes està clarament relacionada amb el CaMII. Cal veure si totes les DNC són secundàries a un procés inflamatori perllongat o bé algunes d'elles coexisteixen en pacients amb MII, però no tenen relació amb la malaltia. La morfologia de les DNC descrites sovint es solapa amb els adenomes de la via clàssica i les lesions serrades pròpies de la via serrada, el que fa difícil saber si han sorgit com a resposta a la inflamació o bé de forma concomitant, sense una clara relació amb aquesta.

Per acabar, Chen et al. relacionen la MG amb la via serrada, pel que podria ser interessant comparar la mucosa sana de pacients amb lesions serrades amb la mucosa sana de pacients amb MII per veure si comparteixen alteracions semblants pel que fa a les vies inflamatòries i alteracions moleculars diferents de *TP53* que intervenen en el camp de cancerització i poden ser responsables de l'aparició de la MG. Per altra banda, algunes lesions fenotípicament serrades que s'han detectat al nostre estudi i que mostraven MG podrien

formar part de la via serrada. Per aquest fet, hem decidit continuar el nostre estudi caracteritzant una sèrie de lesions serrades (LSS, LSSD, AST i PH), mitjançant l'estudi immunohistoquímic de l'expressió de MUC5AC i PDX1 per demostrar el seu fenotip gàstric, i determinant la mutació de *BRAF*, com alteració característica d'aquesta via, i comparar-les amb adenomes convencionals. Pel que fa a l'estudi immunohistoquímic està clar que la majoria de lesions serrades presenten fenotip gàstric, a diferencia dels adenomes convencionals (annex 10.1 i 10.2). Actualment estem finalitzant l'estudi molecular de *BRAF*, on els estudis preliminars, confirmen la hipòtesi de la relació de la MG amb aquesta via.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–49.
2. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka EN, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE, et al. cancers A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
3. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66(4):683–91.
4. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. Available from: <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
5. Jiang Y, Yuan H, Li Z, Ji X, Shen Q, Tuo J, et al. Global pattern and trends of colorectal cancer survival: a systematic review of population-based registration data. Vol. 19, *Cancer Biology and Medicine*. Cancer Biology and Medicine; 2022. p. 175–86.
6. Chen S, Cao Z, Prettner K, Kuhn M, Yang J, Jiao L, et al. Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories from 2020 to 2050. *JAMA Oncol.* 2023;9(4).
7. Sullivan T, Sullivan R, Ginsburg OM. Screening for Cancer: Considerations for Low- and Middle-Income Countries. *Dis Control Priorities, Third Ed (Volume 3) Cancer* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2023 Oct 24];211–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343622/>
8. Garg R, Cheng V, Ellis U, Verma V, McTaggart-Cowan H, Peacock S, et al. Direct medical costs of young-onset colorectal cancer: a worldwide systematic review. *BMC Health Serv Res.* 2022;22(1).
9. Baidoun F, Elshiwly K, Elkeraie Y, Merjaneh Z, Khoudari G, Sarmini MT,

- et al. Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Curr Drug Targets*. 2020 Nov 19;22(9):998–1009.
10. Keum NN, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. Vol. 16, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Research; 2019. p. 713–32.
 11. Song M, Hu FB, Spiegelman D, Chan AT, Wu K, Ogino S, et al. Long-term status and change of body fat distribution, and risk of colorectal cancer: a prospective cohort study. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Nov 16];45(3):871–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26403814/>
 12. Koc S, Esin MN, Ardic A, Koc S, Esin MN, Ardic A. Colorectal Cancer Prevention and Risk Counseling. *Color Cancer - From Pathog to Treat* [Internet]. 2016 Sep 7 [cited 2023 Nov 16]; Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/50972>
 13. Hur SJ, Yoon Y, Jo C, Jeong JY, Lee KT. Effect of Dietary Red Meat on Colorectal Cancer Risk—A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2023 Nov 16];18(6):1812–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12501>
 14. Rossi M, Anwar MJ, Usman A, Keshavarzian A, Bishehsari F. Colorectal Cancer and Alcohol Consumption—Populations to Molecules. *Cancers* 2018, Vol 10, Page 38 [Internet]. 2018 Jan 30 [cited 2023 Nov 17];10(2):38. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/10/2/38/htm>
 15. Hannan LM, Jacobs EJ, Thun MJ. The association between cigarette smoking and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort from the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Dec;18(12):3362–7.
 16. Cao Y, Nishihara R, Wu K, Wang M, Ogino S, Willett WC, et al. Population-wide Impact of Long-term Use of Aspirin and the Risk for Cancer. *JAMA Oncol* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2023 Nov 21];2(6):762–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26940135/>

17. Society AC. Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019 ; 1–40.
Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures/colorectal-cancer-facts-and-figures-2017-2019.pdf>. Centers Dis Control Prev Behav Risk Factor Surveill Syst 2014 Public use data file Color Cancer Screen [Internet]. 2017;1–40. Available from: <https://www.mendeley.com/viewer/?fileId=446a0f98-7242-86a5-07ff-be4c6c8cd11c&documentId=3b9629ab-fc85-3cb8-9607-7468ed4f76a7>
18. Amersi Michelle; Ko, Clifford Y FA. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Health Services. Clin Colon Rectal Surg [Internet]. 2005;18(03):133–40. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2005-916274>
19. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, et al. Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline From the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. Gastroenterology. 2008;134(5):1570–95.
20. Świdarska M, Choromańska B, Dąbrowska E, Konarzewska-Duchnowska E, Choromańska K, Szczurko G, et al. Review The diagnostics of colorectal cancer. Współczesna Onkol. 2014;1:1–6.
21. Kolligs FT. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. Visc Med. 2016;32(3):158–64.
22. Chen K, Collins G, Wang H, Toh JWT. Pathological Features and Prognostication in Colorectal Cancer. Curr Oncol [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Jan 28];28(6):5356. Available from: </pmc/articles/PMC8700531/>
23. Zhang C, Yin S, Tan Y, Huang J, Wang P, Hou W, et al. Patient Selection for Adjuvant Chemotherapy in High-Risk Stage II Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2024 Feb 2];43(4):279–87. Available

from:

https://journals.lww.com/amjclinicaloncology/fulltext/2020/04000/patient_selection_for_adjuvant_chemotherapy_in.9.aspx

24. Shinji S, Yamada T, Matsuda A, Sonoda H, Ohta R, Iwai T, et al. Recent Advances in the Treatment of Colorectal Cancer: A Review. Vol. 89, Journal of Nippon Medical School. Medical Association of Nippon Medical School; 2022. p. 246–54.
25. Pitot HC. The Molecular Biology of Carcinogenesis. Cancer [Internet]. 1993 [cited 2024 Feb 11];72962–70. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142>
26. Funkhouser WK, Lubin IM, Monzon FA, Zehnbauser BA, Evans JP, Ogino S, et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. J Mol Diagn [Internet]. 2012 [cited 2024 Feb 11];14(2):91–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22260991/>
27. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. J Mol Diagn [Internet]. 2008 [cited 2024 Feb 11];10(1):13–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18165277/>
28. Conteduca V, Sansonno D, Russi S, Dammacco F. Precancerous colorectal lesions (Review). Int J Oncol [Internet]. 2013 Oct [cited 2024 Feb 11];43(4):973–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23900573/>
29. Strum WB. Colorectal Adenomas. Longo DL, editor. N Engl J Med [Internet]. 2016 Mar 17 [cited 2024 Feb 11];374(11):1065–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26981936/>
30. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, Tschaharganeh DF, Van Es JH, Clevers H, et al. Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. Cell [Internet]. 2015 Jun 20 [cited 2024 Feb 11];161(7):1539–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26091037/>

31. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2024 Feb 2];76(2):182–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/his.13975>
32. Bettington M, Walker N, Rosty C, Brown I, Clouston A, McKeone D, et al. Clinicopathological and molecular features of sessile serrated adenomas with dysplasia or carcinoma. *Gut*. 2017 Jan 1;66(1):97–106.
33. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2010 [cited 2025 Mar 21];138(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20420947/>
34. Mezzapesa M, Losurdo G, Celiberto F, Rizzi S, D'amati A, Piscitelli D, et al. Serrated Colorectal Lesions: An Up-to-Date Review from Histological Pattern to Molecular Pathogenesis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2025 Mar 19];23(8):4461. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9032676/>
35. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2004 Jul [cited 2024 Feb 11];287(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15194558/>
36. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* [Internet]. 1983 [cited 2024 May 26];14(11):931–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6629368/>
37. Jass JR. Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2000 [cited 2025 Mar 29];910:62–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10911906/>
38. Jass JR. Pathogenesis of colorectal cancer. *Surg Clin North Am* [Internet]. 2002 Oct [cited 2025 Mar 29];82(5):891–904. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12507199/>
39. Yano T, Sano Y, Iwasaki J, Fu KI, Yoshino T, Kato S, et al. Distribution

- and prevalence of colorectal hyperplastic polyps using magnifying pan-mucosal chromoendoscopy and its relationship with synchronous colorectal cancer: prospective study. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2005 [cited 2025 Mar 29];20(10):1572–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16174076/>
40. Mäkinen MJ. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007;50(1):131–50.
 41. Nasreddin N, Jansen M, Loughrey MB, Wang LM, Koelzer VH, Rodriguez-Justo M, et al. Poor Diagnostic Reproducibility in the Identification of Nonconventional Dysplasia in Colitis Impacts the Application of Histologic Stratification Tools. *Mod Pathol* [Internet]. 2024;37(3):100419. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100419>
 42. Choi WT, Yozu M, Miller GC, Shih AR, Kumarasinghe P, Misdraji J, et al. Nonconventional dysplasia in patients with inflammatory bowel disease and colorectal carcinoma: a multicenter clinicopathologic study. *Mod Pathol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2020 Nov 21];33(5):933–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31822800/>
 43. Gui X, Gui X, Köbel M, Ferraz JGP, Iacucci M, Ghosh S, et al. Histological and molecular diversity and heterogeneity of precancerous lesions associated with inflammatory bowel diseases. *J Clin Pathol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2020 Nov 21];73(7):391–402. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31801800/>
 44. Kamarádová K, Vošmiková H, Rozkošová K, Ryška A, Tachecí I, Laco J. Non-conventional mucosal lesions (serrated epithelial change, villous hypermucinous change) are frequent in patients with inflammatory bowel disease—results of molecular and immunohistochemical single institutional study. *Virchows Arch*. 2020;476(2):231–41.
 45. Lee H, Rabinovitch PS, Mattis AN, Lauwers GY, Choi WT. Non-conventional dysplasia in inflammatory bowel disease is more frequently associated with advanced neoplasia and aneuploidy than conventional

- dysplasia. *Histopathology*. 2021 May 1;78(6):814–30.
46. Hirsch D, Hardt J, Sauer C, Heselmeyer-Hadded K, Witt SH, Kienle P, et al. Molecular characterization of ulcerative colitis-associated colorectal carcinomas. *Mod Pathol*. 2021 Jun 1;34(6):1153–66.
 47. Lepage C, Jooste V, Guéant JL, Faivre J, Bouvier AM. Colorectal cancer in inflammatory bowel diseases: A population-based study (1976-2008). *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(12):2247–51.
 48. Lu C, Schardey J, Zhang T, Crispin A, Wirth U, Karcz KW, et al. Survival Outcomes and Clinicopathological Features in Inflammatory Bowel Disease-associated Colorectal Cancer A Systematic Review and Meta-analysis. 2022 Nov 1;276(5):E319–30.
 49. Hu F, Wang J, Zhang M, Wang S, Zhao L, Yang H, et al. Comprehensive Analysis of Subtype-Specific Molecular Characteristics of Colon Cancer: Specific Genes, Driver Genes, Signaling Pathways, and Immunotherapy Responses. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Nov 29;9.
 50. Alwers E, Jia M, Kloor M, Bläker H, Brenner H, Hoffmeister M. Associations Between Molecular Classifications of Colorectal Cancer and Patient Survival: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2024 Feb 17];17(3):402-410.e2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29306042/>
 51. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov 1;21(11):1350–6.
 52. Fessler E, Medema JP. Colorectal Cancer Subtypes: Developmental Origin and Microenvironmental Regulation. Vol. 2, *Trends in Cancer*. Cell Press; 2016. p. 505–18.
 53. Graham DB, Xavier RJ. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature* [Internet]. 2020 Feb 27 [cited 2024 Sep 29];578(7796):527–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32103191/>

54. Kłos P, Dabrowski SA. The role of mitochondria dysfunction in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 1;22(21).
55. Huang BL, Chandra S, Shih DQ. Skin manifestations of inflammatory bowel disease. *Front Physiol* [Internet]. 2012 [cited 2024 Oct 12];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22347192/>
56. Marabotto E, Kayali S, Buccilli S, Levo F, Bodini G, Giannini EG, et al. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Diseases: Epidemiology and Prevention: A Review. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2024 Sep 29];14(17). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36077786/>
57. Fornaro R, Caratto M, Caratto E, Caristo G, Fornaro F, Giovinnazzo D, et al. Colorectal Cancer in Patients With Inflammatory Bowel Disease: The Need for a Real Surveillance Program. *Clin Colorectal Cancer* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2024 Sep 29];15(3):204–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27083409/>
58. Vitali F, Wein A, Rath T, Eckstein M, Neufert C, Siebler J, et al. The outcome of patients with inflammatory bowel disease–associated colorectal cancer is not worse than that of patients with sporadic colorectal cancer—a matched-pair analysis of survival. *Int J Colorectal Dis* [Internet]. 2022;37(2):381–91. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00384-021-04072-9>
59. Lasry A, Zinger A, Ben-Neriah Y. Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nat Immunol*. 2016 Feb 16;17(3):230–40.
60. Fantini MC, Guadagni I. From inflammation to colitis-associated colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Pathogenesis and impact of current therapies. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2021 [cited 2024 Oct 19];53:558–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2021.01.012>
61. Wang Z, Chang Y, Sun H, Li Y, Tang T. Advances in molecular mechanisms of inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer (Review). *Oncol Lett* [Internet]. 2024 Jun 1 [cited 2024 Oct 19];27(6).

Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38646499/>

62. Seidelin JB, Nielsen OH. Continuous cytokine exposure of colonic epithelial cells induces DNA damage. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2005 Mar [cited 2024 Oct 28];17(3):363–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15716663/>
63. Rachmilewitz D, Stamler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* [Internet]. 1995 [cited 2024 Oct 28];36(5):718–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7541008/>
64. Palm NW, de Zoete MR, Flavell RA. Immune-microbiota interactions in health and disease. *Clin Immunol* [Internet]. 2015 Dec 31 [cited 2024 Oct 19];159(2):122–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26141651/>
65. Feng T, Elson CO. Adaptive immunity in the host-microbiota dialog. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2024 Oct 19];4(1):15–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20944557/>
66. Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, Velykoredko Y, Stoel M, Lawson MAE, et al. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science* [Internet]. 2009 Jul 31 [cited 2024 Oct 26];325(5940):617–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19644121/>
67. Frigerio S, Lartey DA, D'haens GR, Grootjans J. The Role of the Immune System in IBD-Associated Colorectal Cancer: From Pro to Anti-Tumorigenic Mechanisms. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Oct 26];22(23). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884543/>
68. Baker AM, Cross W, Curtius K, Al Bakir I, Choi CHR, Davis HL, et al. Evolutionary history of human colitis-associated colorectal cancer. *Gut* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2024 Oct 29];68(6):985. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6580738/>

69. Leedham SJ, Jankowski JA, Wright NA, Tomlinson IPM. Genetics of inflammatory bowel disease and associated cancers. *Curr Colorectal Cancer Rep* [Internet]. 2006 Dec [cited 2024 Oct 29];2(4):191–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11888-006-0022-y>
70. Muller M, Hansmann F, Arnone D, Choukour M, Ndiaye NC, Kokten T, et al. Genomic and molecular alterations in human inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *United Eur Gastroenterol J* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 Oct 29];8(6):675. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7437079/>
71. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* [Internet]. 1991 [cited 2024 Oct 29];351(6326):453–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2046748/>
72. Burner GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC, Crispin DA, Brentnall TA, Kolli VR, et al. Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of a p53 allele. *Gastroenterology* [Internet]. 1992 [cited 2024 Oct 29];103(5):1602–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1358743/>
73. Li Y, De Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, et al. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut* [Internet]. 2010 Feb [cited 2024 Oct 29];59(2):227–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19926618/>
74. Sanchez JA, DeJulius KL, Bronner M, Church JM, Kalady MF. Relative role of methylator and tumor suppressor pathways in ulcerative colitis-associated colon cancer. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2011 Sep [cited 2024 Oct 29];17(9):1966–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21618350/>
75. Aust DE, Terdiman JP, Willenbacher RF, Chang CG, Molinaro-Clark A, Baretton GB, et al. The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis. *Cancer* [Internet].

- 2002 Mar 1 [cited 2024 Oct 29];94(5):1421–7. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11920497/>
76. Voorham QJM, Rondagh EJA, Knol DL, Van Engeland M, Carvalho B, Meijer GA, et al. Tracking the molecular features of nonpolypoid colorectal neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2024 Oct 29];108(7):1042–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23649184/>
 77. Yaeger R, Shah MA, Miller VA, Kelsen JR, Wang K, Heins ZJ, et al. Genomic Alterations Observed in Colitis-Associated Cancers Are Distinct From Those Found in Sporadic Colorectal Cancers and Vary by Type of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2024 Oct 30];151(2):278-287.e6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27063727/>
 78. Alpert L, Yassan L, Poon R, Kadri S, Niu N, Patil SA, et al. Targeted mutational analysis of inflammatory bowel disease-associated colorectal cancers. *Hum Pathol* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2024 Oct 30];89:44–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31054900/>
 79. Nishikawa M, Oshitani N, Matsumoto T, Nishigami T, Arakawa T, Inoue M. Accumulation of mitochondrial DNA mutation with colorectal carcinogenesis in ulcerative colitis. *Br J Cancer* [Internet]. 2005 Aug 8 [cited 2024 Oct 30];93(3):331–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15956973/>
 80. Hypermethylation of the p16INK4a Promoter in Colectomy Specimens of Patients with Long-standing and Extensive Ulcerative Colitis^{1,2} | Cancer Research | American Association for Cancer Research [Internet]. [cited 2024 Oct 30]. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/58/17/3942/504350/Hypermethylation-of-the-p16INK4a-Promoter-in>
 81. Azarschab P, Porschen R, Gregor M, Blin N, Holzmann K. Epigenetic control of the E-cadherin gene (CDH1) by CpG methylation in colectomy samples of patients with ulcerative colitis. *Genes Chromosomes Cancer*

- [Internet]. 2002 Oct [cited 2024 Oct 30];35(2):121–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12203775/>
82. Fleisher AS, Esteller M, Tamura G, Rashid A, Stine OC, Yin J, et al. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene*. 2001 Jan 18;20(3):329–35.
 83. Dhir M, Montgomery EA, Glöckner SC, Schuebel KE, Hooker CM, Herman JG, et al. Epigenetic regulation of WNT signaling pathway genes in inflammatory bowel disease (IBD) associated neoplasia. *J Gastrointest Surg* [Internet]. 2008 Oct [cited 2024 Oct 30];12(10):1745–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18716850/>
 84. Bettington ML, Walker NI, Rosty C, Brown IS, Clouston AD, McKeone DM, et al. A clinicopathological and molecular analysis of 200 traditional serrated adenomas. *Mod Pathol*. 2015 Mar 1;28(3):414–27.
 85. Garrity-Park MM, Loftus E V., Sandborn WJ, Bryant SC, Smyrk TC. Methylation status of genes in non-neoplastic mucosa from patients with ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jul;105(7):1610–9.
 86. Olaru A V., Selaru FM, Mori Y, Vazquez C, David S, Paun B, et al. Dynamic changes in the expression of MicroRNA-31 during inflammatory bowel disease-associated neoplastic transformation. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2011 Jan [cited 2024 Oct 30];17(1):221–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20848542/>
 87. Olaru A V., Yamanaka S, Vazquez C, Mori Y, Cheng Y, Abraham JM, et al. MicroRNA-224 negatively regulates p21 expression during late neoplastic progression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2013 Mar [cited 2024 Oct 30];19(3):471–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23399735/>
 88. Peruhova M, Peshevska-Sekulovska M, Krastev B, Panayotova G, Georgieva V, Konakchieva R, et al. What could microRNA expression tell us more about colorectal serrated pathway carcinogenesis? *World J*

- Gastroenterol [Internet]. 2020 Nov 14 [cited 2025 Mar 21];26(42):6556–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33268946/>
89. Choi CHR, Rutter MD, Askari A, Lee GH, Warusavitarne J, Moorghen M, et al. Forty-Year Analysis of Colonoscopic Surveillance Program for Neoplasia in Ulcerative Colitis: An Updated Overview. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Jul 8 [cited 2024 May 26];110(7):1022–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25823771/>
 90. Harpaz N, Itzkowitz SH. Pathology and Clinical Significance of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Dysplastic Lesions. *Gastroenterol Clin North Am* [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2024 Oct 30];53(1):133–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38280745/>
 91. Laine L, Kaltenbach T, Barkun A, McQuaid KR, Subramanian V, Soetikno R. SCENIC international consensus statement on surveillance and management of dysplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2024 Oct 30];148(3):639-651.e28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25702852/>
 92. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggii-r RC, et al. Perspectives in Pathology Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease : 1967;931.
 93. Gui X, Iacucci M, Ghosh S, Ferraz JGP, Lee S. Revisiting the distinct histomorphologic features of inflammatory bowel disease–associated neoplastic precursor lesions in the SCENIC and post–DALM. *Hum Pathol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2020 Nov 21];100:24–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32387105/>
 94. Harpaz N, Goldblum JR, Shepherd NA, Riddell RH, Rubio CA, Vieth M, et al. Colorectal dysplasia in chronic inflammatory bowel disease: a contemporary consensus classification and interobserver study. *Hum Pathol* [Internet]. 2023;138(2023):49–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2023.05.008>
 95. Harpaz: Novel classification of dysplasia in IBD - Google Académico

- [Internet]. [cited 2024 Apr 25]. Available from:
[https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Novel classification of dysplasia in IBD&author=N. Harpaz&publication_year=2017#d=gs_cit&t=1714057716701&u=%2Fscholar%3Fq%3Dinfo%3A82mpn72OxdIJ%3Ascholar.google.com%2F%26output%3Dcite%26scirp%3D0%26hl%3Dca](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Novel+classification+of+dysplasia+in+IBD&author=N.+Harpaz&publication_year=2017#d=gs_cit&t=1714057716701&u=%2Fscholar%3Fq%3Dinfo%3A82mpn72OxdIJ%3Ascholar.google.com%2F%26output%3Dcite%26scirp%3D0%26hl%3Dca)
96. Zhou RW, Harpaz N, Itzkowitz SH, Parsons RE. Molecular mechanisms in colitis-associated colorectal cancer. *Oncogenesis* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Oct 29];12(1):48. Available from:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10603140/>
 97. Slack JMW, Tosh D. Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types. *Curr Opin Genet Dev* [Internet]. 2001 Oct 1 [cited 2024 Jun 15];11(5):581–6. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11532402/>
 98. Giroux V, Rustgi AK. Metaplasia: Tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence. *Nat Rev Cancer*. 2017 Oct 1;17(10):594–604.
 99. Li X, He J, Xie K. Molecular signaling in pancreatic ductal metaplasia: emerging biomarkers for detection and intervention of early pancreatic cancer. *Cell Oncol (Dordr)* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2024 May 30];45(2):201–25. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35290607/>
 100. Herfs M, Hubert P, Delvenne P. Epithelial metaplasia: adult stem cell reprogramming and (pre)neoplastic transformation mediated by inflammation? *Trends Mol Med*. 2009;15(6):245–53.
 101. Leube RE, Rustad TJ. Squamous cell metaplasia in the human lung: molecular characteristics of epithelial stratification. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* [Internet]. 1991 Dec [cited 2024 Jun 30];61(4):227–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1723555/>
 102. Regauer S, Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical

- intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology* [Internet]. 2007 Apr [cited 2024 Jun 30];50(5):629–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17394499/>
103. Pateras IS, Igea A, Nikas IP, Leventakou D, Koufopoulos NI, Ieronimaki AI, et al. Diagnostic Challenges during Inflammation and Cancer: Current Biomarkers and Future Perspectives in Navigating through the Minefield of Reactive versus Dysplastic and Cancerous Lesions in the Digestive System. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2).
 104. Kinoshita H, Hayakawa Y, Koike K. Molecular Sciences Metaplasia in the Stomach-Precursor of Gastric Cancer? 2017 [cited 2024 Jul 6]; Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
 105. Amieva M, Peek RM. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2024 Jul 6];150(1):64–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26385073/>
 106. Tazuma S, Kajiyama G. Carcinogenesis of malignant lesions of the gall bladder. The impact of chronic inflammation and gallstones. *Langenbeck's Arch Surg* [Internet]. 2001 [cited 2024 May 30];386(3):224–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11382326/>
 107. Roa JC, Basturk O, Adsay V. Dysplasia and carcinoma of the gallbladder: pathological evaluation, sampling, differential diagnosis and clinical implications. *Histopathology* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Jun 30];79(1):2–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33629395/>
 108. Marstrand-Daucé L, Lorenzo D, Chassac A, Nicole P, Couvelard A, Haumaitre C. Acinar-to-Ductal Metaplasia (ADM): On the Road to Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) and Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023;24(12).
 109. Goldenring JR. Pyloric metaplasia, pseudopyloric metaplasia, ulcer-associated cell lineage and spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia: reparative lineages in the gastrointestinal mucosa. *J Pathol*

- [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2024 Jul 6];245(2):132–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.5066>
110. Tokuyama M, Dhingra S, Polydorides AD. Clinicopathologic Features and Diagnostic Implications of Pyloric Gland Metaplasia in Intestinal Specimens. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 Oct 18];45(3):365–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33105158/>
 111. Kushima R, Borchard F, Hattori T. A new aspect of gastric metaplasia in Crohn’s disease: bidirectional (foveolar and pyloric) differentiation in so-called “pyloric metaplasia” in the ileum. *Pathol Int* [Internet]. 1997 [cited 2024 Jul 12];47(6):416–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9211531/>
 112. Kaneko Y, Nakamura T, Hayama M, Hosaka N, Akamatsu T, Ota H. Altered expression of CDX-2, PDX-1 and mucin core proteins in “Ulcer-associated cell lineage (UACL)” in Crohn’s disease. *J Mol Histol*. 2008 Apr;39(2):161–8.
 113. Chang CC, Pan S, Lien GS, Chen SH, Cheng CJ, Liu JD, et al. Investigation of the extent of gastric metaplasia in the duodenal bulb by using methylene blue staining. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2001 [cited 2024 Jul 12];16(7):729–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11446879/>
 114. Meditskou S, Grekou A, Toskas A, Papamitsou T, Miliaras D. Pyloric and foveolar type metaplasia are important diagnostic features in crohn’s disease that are frequently missed in routine pathology. *Histol Histopathol* [Internet]. 2020 [cited 2024 Jun 13];35(6):553–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31538655/>
 115. Kilgore SP, Sigel JE, Goldblum JR. Hyperplastic-like mucosal change in Crohn’s disease: Unusual form of dysplasia? *Mod Pathol*. 2000;13(7):797–801.
 116. Chen B, Scurrah CR, McKinley ET, Simmons AJ, Ramirez-Solano MA, Zhu X, et al. Differential pre-malignant programs and microenvironment

- chart distinct paths to malignancy in human colorectal polyps. *Cell* [Internet]. 2021 Dec 22 [cited 2024 Jun 1];184(26):6262-6280.e26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34910928/>
117. IJspeert JEG, Dekker E. Gastric metaplasia could initiate the serrated neoplasia pathway in CRC. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022;19(4):217–8.
 118. Kakiuchi N, Yoshida K, Uchino M, Kihara T, Akaki K, Inoue Y, et al. Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis. *Nature* [Internet]. 2020 Jan 9 [cited 2024 Oct 29];577(7789):260–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31853061/>
 119. Galandiuk S, Rodriguezjusto M, Jeffery R, Nicholson AM, Cheng Y, Oukrif D, et al. Field cancerization in the intestinal epithelium of patients with Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 [cited 2024 Oct 29];142(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22178590/>
 120. Giuffrida P, Arpa G, Grillo F, Klersy C, Sampietro G, Ardizzone S, et al. PD-L1 in small bowel adenocarcinoma is associated with etiology and tumor-infiltrating lymphocytes, in addition to microsatellite instability. *Mod Pathol*. 2020 Jul 1;33(7):1398–409.
 121. Lyda MH, Noffsinger A, Belli J, Fenoglio-Preiser CM. Microsatellite instability and K-ras mutations in patients with ulcerative colitis. *Hum Pathol*. 2000 Jun 1;31(6):665–71.
 122. Vanoli A, Di Sabatino A, Furlan D, Klersy C, Grillo F, Fiocca R, et al. Small Bowel Carcinomas in Coeliac or Crohn's Disease: Clinico-pathological, Molecular, and Prognostic Features. A Study From the Small Bowel Cancer Italian Consortium. *J Crohn's Colitis* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2024 Nov 30];11(8):942–53. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjx031>
 123. Schulmann K, Mori Y, Croog V, Yin J, Olaru A, Sterian A, et al. Molecular phenotype of inflammatory bowel disease-associated neoplasms with microsatellite instability. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2024 Nov 30];129(1):74–85. Available from:

<http://www.gastrojournal.org/article/S0016508505006931/fulltext>

124. Liu X, Goldblum JR, Zhao Z, Landau M, Heald B, Pai R, et al. Distinct clinicohistologic features of inflammatory bowel disease-associated colorectal adenocarcinoma: in comparison with sporadic microsatellite-stable and Lynch syndrome-related colorectal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2025 Mar 27];36(8):1228–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22790862/>
125. Svrcek M, Fontugne J, Duval A, Fléjou JF. Inflammatory bowel disease-associated colorectal cancers and microsatellite instability: An original relationship. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2025 Mar 27];37(3):460–2. Available from: https://journals.lww.com/ajsp/fulltext/2013/03000/inflammatory_bowel_disease_associated_colorectal.22.aspx
126. Svrcek M, El-Bchiri J, Chalastanis A, Capel E, Dumont S, Buhard O, et al. Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 Sep 20 [cited 2025 Mar 27];25(27):4231–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17878476/>
127. Minami N, Yoshino T, Nakase H. Unique endoscopic findings of colitis-associated colorectal cancer in a patient with ulcerative colitis and Lynch syndrome. *J Crohns Colitis* [Internet]. 2014 [cited 2025 Mar 27];8(4):336–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24295648/>
128. McNamara KL, Aronson MD, Cohen Z. Is there a role for prophylactic colectomy in Lynch syndrome patients with inflammatory bowel disease? *Int J Colorectal Dis* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2025 Mar 27];31(1):9–13. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00384-015-2398-0>
129. Derikx LAAP, Smits LJT, van Vliet S, Dekker E, Aalfs CM, van Kouwen MCA, et al. Colorectal Cancer Risk in Patients With Lynch Syndrome and Inflammatory Bowel Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2025 Mar 27];15(3):454-458.e1. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27521512/>
130. Arif AA, Chahal D, Ladua GK, Bhang E, Salh B, Rosenfeld G, et al. Hereditary and Inflammatory Bowel Disease-Related Early Onset Colorectal Cancer Have Unique Characteristics and Clinical Course Compared with Sporadic Disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2025 Mar 27];30(10):1785–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34301727/>
 131. Barberio B, Savarino E, Verstockt B, Fumery M, Pugliese D, Bertani L, et al. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes and Inflammatory Bowel Diseases: an ECCO CONFER Multicentre Case Series. *J Crohn's Colitis* [Internet]. 2022 Dec 5 [cited 2025 Mar 27];16(12):1845–52. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjac094>
 132. Ayeni AA, Waterland P, Evans M, Singhal S, Patel RK, Akingboye A. Case Report: Multiple colorectal cancers in a patient with Ulcerative colitis and Lynch syndrome: Is there a role for prophylactic colectomy? A short report and review of literature. *Front Oncol*. 2022 Dec 22;12:1031606.
 133. Chatila WK, Walch H, Hechtman JF, Moyer SM, Sgambati V, Faleck DM, et al. Integrated clinical and genomic analysis identifies driver events and molecular evolution of colitis-associated cancers. *Nat Commun* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Aug 23];14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36611031/>
 134. Nguyen ED, Wang D, Lauwers GY, Choi WT. Increased histologic inflammation is an independent risk factor for nonconventional dysplasia in ulcerative colitis. *Histopathology* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2024 Dec 1];81(5):644–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/his.14765>
 135. Cansiz Ersöz C, Kiremitci S, Savas B, Ensari A. Differential diagnosis of traditional serrated adenomas and tubulovillous adenomas: A compartmental morphologic and immunohistochemical analysis. *Acta Gastroenterol Belg*. 2020 Oct 1;83(4):549–56.
 136. Singhi AD, Waters KM, Makhoul EP, Parian A, Lazarev MG, Proksell SS,

- et al. Targeted next-generation sequencing supports serrated epithelial change as an early precursor to inflammatory bowel disease–associated colorectal neoplasia. *Hum Pathol*. 2021 Jun 1;112:9–19.
137. Leedham SJ, Graham TA, Oukrif D, McDonald SAC, Rodriguez-Justo M, Harrison RF, et al. Clonality, Founder Mutations, and Field Cancerization in Human Ulcerative Colitis–Associated Neoplasia. *Gastroenterology*. 2009 Feb 1;136(2):542-550.e6.
 138. Ma C, Henn P, Miller C, Herbst C, Hartman DJ, Pai RK. Loss of SATB2 Expression Is a Biomarker of Inflammatory Bowel Disease-associated Colorectal Dysplasia and Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2019;43(10):1314–22.
 139. Köbel M, Piskorz AM, Lee S, Lui S, LePage C, Marass F, et al. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *J Pathol Clin Res [Internet]*. 2016 Oct 1 [cited 2024 Dec 1];2(4):247–58. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cjp2.53>
 140. Cawkwell L, Sutherland F, Murgatroyd H, Jarvis P, Gray S, Cross D, et al. Defective hMSH2/hMLH1 protein expression is seen infrequently in ulcerative colitis associated colorectal cancers. *Gut [Internet]*. 2000 Mar 1 [cited 2024 Dec 1];46(3):367–9. Available from: <https://gut.bmj.com/content/46/3/367>
 141. Liu C, Fennell LJ, Bettington ML, Walker NI, Dwine J, Leggett BA, et al. DNA methylation changes that precede onset of dysplasia in advanced sessile serrated adenomas. *Clin Epigenetics [Internet]*. 2019 Jun 14 [cited 2025 Mar 27];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31200767/>
 142. Dhir M, Yachida S, Neste L Van, Glöckner SC, Jeschke J, Pappou EP, et al. Sessile serrated adenomas and classical adenomas: An epigenetic perspective on premalignant neoplastic lesions of the gastrointestinal tract. *Int J Cancer [Internet]*. 2011 Oct 15 [cited 2024 Nov 30];129(8):1889–98. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.25847>

143. Robles AI, Traverso G, Zhang M, Roberts NJ, Khan MA, Joseph C, et al. Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease–Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology*. 2016 Apr 1;150(4):931–43.
144. De Angelis PM, Dorg L, Pham S, Andersen SN. DNA Repair Protein Expression and Oxidative/Nitrosative Stress in Ulcerative Colitis and Sporadic Colorectal Cancer. *Anticancer Res [Internet]*. 2021 Jul 1 [cited 2024 Nov 30];41(7):3261–70. Available from: <https://ar.iiarjournals.org/content/41/7/3261>

10. ANNEXES

Treballs associats a la tesi

10.1 Comunicació internacional 1

PDX1 expression identifies serrated pathway in precursor lesions of the colon

Míriam Gené, Eva Musulén, Laura Civico, Anna Ramon, Sara Simonetti, Marina Urbano, Maria Teresa Fernandez-Figueras, Miquel Angel Carrasco

Abstracts: 30th European Congress of Pathology

Virchows Archiv (2018) 473 (Suppl 1): S178

<https://doi.org/10.1007/s00428-018-2422-1>

PMID: 30120593 DOI: 10.1007/s00428-018-2422-1

Póster. 30th European Congress of Pathology, 8-12 Setember 2018. Biblabo, Spain

10.2 Comunicació internacional 2

MUC5AC and PDX-1 are useful markers to identify colonic polyps of the serrated pathway

Míriam Gené Hijós, Eva Fernández, Motnserrat García, Sandra Roca, Maria Salomé Martinez and Eva Musulen

35th European Congress of Pathology – Abstracts

Virchows Archiv (2023) 483 (Suppl 1): S200

<https://doi.org/10.1007/s00428-023-03602-w>

PMID: 37658196 DOI: 10.1007/s00428-023-03602-w

Póster. 35th European Congress of Pathology, 9-12 Setember, 2023, Dublin, Ireland

10.3 Comunicació internacional 3

Alterations in p53, microsatellite stability and lack of MUC5AC expression as molecular features of colorectal carcinoma associated with inflammatory bowel disease

Eva Musulen, Míriam Gené, Míriam Cuatrecasas, Irene Amat, Jesús Alberto Veiga, María Jesús Fernández Aceñero, Victòria Fusté Chimisana, Jordi Tarragona, Ismael Jurado, Rebeca Fernández-Victoria, Carolina Martínez Ciarpaglini, Cristina Alenda González, Carlos Zac, Pilar Ortega de la Obra and María Teresa Fernández-Figueras

35th European Congress of Pathology – Abstracts

Virchows Archiv (2023) 483 (Suppl 1): S110

<https://doi.org/10.1007/s00428-023-03602-w>

PMID: 37658196 DOI: 10.1007/s00428-023-03602-w

Póster. 35th European Congress of Pathology, 9-12 Setember, 2023, Dublin, Ireland

