

Ana Laura Martins Ferreira

Marcadores Genéticos no Cancro Colo-Rectal: Importância no Diagnóstico e Terapêutica

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria Celeste Lopes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Laura Martins Ferreira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009456, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada está referenciada na bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Julho de 2014

(Ana Laura Martins Ferreira)

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Marcadores Genéticos no Cancro Colo-Rectal: Importância no Diagnóstico e Terapêutica

- Julho 2014 -

Orientador de Monografia:

(Prof. Doutora Maria Celeste Fernandes Lopes)

Orientando:

(Ana Laura Martins Ferreira)

Lista de Acrónimos

ACR – Adenoma Colo-Rectal

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AKT – Proteína Cinase B

APC – Polipose Adenomatosa Cólica

AXIN2 – *Axin 2*

BAX – *BCL2-Associated X Protein*

BRAF – *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1*

CCR – Cancro Colo-rectal

CD44 – *CD44 Molecule (Indian Blood Group)*

CK1 α/ϵ – *Casein Kinase α/ϵ*

CIN – Instabilidade Cromossómica

CTNNB1 – *Cadherin-Associated Protein*

Dvl – *Disheveled*

EFG – Fator de Crescimento Epidérmico

EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*

ERCC1 – *Excision Repair Cross-Complementation Group I*

ERK – *Extracellular Signal-Regulated Kinase*

FBXW7 – *F-Box/WD Repeat-Containing Protein 7*

FdUMP – Fluorodesoxiuridina Monofosfato

FdUTP – Fluorodesoxiuridina Trifosfato

FUTP – Fluorouridina Trifosfato

GSK3 β – *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

HATs – Acetiltransferase de Histonas

HDACs – Desacetilases de Histonas

HNPCC – Cancro Colo-Rectal Hereditário não Associado a Polipose

IC – Intervalo de Confiança

IGF2 – *Insulin-Like Growth Factor 2*

KRAS – Gene Homólogo do Vírus do Sarcoma de Kirsten

Lef-1 – *Lymphoid Enhancer Factor-1*

LOH – *Loss of Heterozygosity* (Perda de Heterozigotia)

MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MLH1 – *MutL Homolog 1*

MLH3 – *MutL Homolog 3*

MMR – *Mismatch Repair*

MSH2 – *MutS Homolog 2*

MSH3 – *MutS homolog 3*

MSH6 – *MutS Homolog 6*

MSI – Instabilidade de Microssatélites

MSS – Estabilidade de Microssatélites

mTOR – *Mammalian Target Of Rapamycin*

NER – Mecanismo de Reparação do ADN por Excisão de Nucleótidos

NRAS – *Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homolog*

PAF – Polipose Adenomatosa Familiar

Pb – Pares de Bases

PI3K – *Phosphatidylinositol 3-kinase*

PIP2 – Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfato

PIP3 – Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfato

PJ – Polipose Juvenil

PMS1 – *Postmeiotic Segregation Increased 1*

PMS2 – *Postmeiotic Segregation Increased 2*

PTEN – *Phosphatase and Tensin Homolog*

PUMA – *Upregulated Modulator of Apoptosis*

RNA – Ácido Ribonucleico

SAMP – Ser-Ala-Met-Pro

SPJ – *Síndrome Peutz-Jeghers*

SMAD4 – *SMAD Family Member 4*

SOX9 – *Transcription Factor SOX-9*

TCF7L2 – *Transcription Factor 7-Like 2*

TCF- *T-Cell Factor*

TP53 – Gene Supressor de Tumor Proteína 53

TS – Timidilato Sintase

TSC1 – Complexo Esclerose Tuberosa 1

TSC2 – Complexo Esclerose Tuberosa 2

UGT1A1 – *UDP-Glucuronosil-Transferase 1A1*

Wnt – Homólogo Humano da Proteína *Wingless* na *Drosophila*

Resumo

O cancro colo-rectal (CCR) é uma patologia, com uma incidência mundial de cerca de 1 milhão de casos por ano e uma mortalidade de mais de 500.000 casos por ano. O número absoluto de casos aumentará nas próximas duas décadas, como resultado do envelhecimento e da expansão das populações, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (Organisation *et al.*, [s.d.]).

Ao longo das últimas três décadas, estudos de genética molecular têm revelado algumas mutações críticas subjacentes à patogénese de formas esporádicas e de formas hereditárias de cancro colo-rectal. Alguns genes supressores de tumor e oncogenes, designadamente os genes da polipose adenomatosa cólica (APC), o gene homólogo do vírus do sarcoma de *Kirsten* (KRAS) e o gene supressor de tumor proteína 53 (TP53), encontram-se, frequentemente, mutados numa fração considerável de CCRs e que podem, assim, ser responsáveis pela transformação maligna (Schweiger *et al.*, 2013; Fearon, E. R., 2011). Esta monografia teve como objetivo a revisão dos mecanismos que estão na base do desenvolvimento do CCR, procurando conhecer os biomarcadores com potencial aplicação clínica no diagnóstico e a sua utilidade na terapêutica.

Palavras-Chave

Biomarcadores, Cancro colo-rectal, Gene Homólogo do Vírus do Sarcoma de *Kirsten*, Gene Polipose Adenomatosa Cólica, Gene Supressor de Tumor Proteína 53, Oncogenes.

Abstract

The CRC (colorectal cancer) is a worldwide problem, with an annual incidence of approximately 1 million cases and an annual mortality of over 500,000 cases. The absolute number of cases will increase in the next two decades as a result of aging and expanding populations, both in developed countries and in developing countries.

Over the past three decades, molecular genetic studies have revealed some critical mutations underlying the pathogenesis of the sporadic and inherited forms of colorectal cancer (CRC). It has been discovered a set of tumor suppressor genes and oncogenes, most prominently adenomatous polyposis coli (APC), protein 53 tumor suppressor gene (P53) and Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), which are frequently mutated in a significant fraction of RCCs and may thus be responsible for malignant transformation. This paper aims to review the mechanisms that underlie RCC and thus conclude that biomarkers may be used in clinical practice, as early diagnosis and therapeutic usefulness will.

Keywords

Adenomatous Polyposis Coli, Biomarkers, Colorectal cancer, Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, Oncogenes, Protein 53 Tumor Suppressor Gene.

Índice

1. Introdução	9
2. História familiar como fator de risco para o cancro colo-rectal	10
3. Tumorigênese colo-rectal	11
4. O genoma do cancro colo-rectal	12
4.1. Genes associados à carcinogénese colo-rectal	12
4.2. Gene polipose adenomatosa cólica no cancro colo-rectal	14
4.2.1. Polipose adenomatosa familiar	14
4.2.2. Gene polipose adenomatosa cólica	14
4.2.3. Via de sinalização intracelular Wnt	15
4.3. Mutações no gene supressor de tumor proteína 53	17
4.4. Via de sinalização intracelular RAS/RAF/MAPK/ ERK e PI3K/PTEN/AKT no cancro colo-rectal	18
5. Instabilidade de microssatélites	20
5.1 Cancro colo-rectal hereditário não associado a polipose.	21
6. Epigenética	22
7. Terapêutica no cancro colo-rectal	23
7.1. Resistência à quimioterapia	24
7.1.1. Tratamento 5-fluorocilose e oxaliplatina.....	24
7.1.2. Tratamento com irinotecano.....	25
7.1.3. Terapêutica anti-EGFR	25
8. Biomarcadores e cancro colo-rectal	26
9. Conclusão	28
10. Referências Bibliográficas	29

I. Introdução

O cancro colo-rectal constitui, a nível mundial, a segunda causa de morte, por cancro, entre homens e mulheres (Organisation *et al.*, [s.d.]).

O cancro resulta da acumulação de alterações genéticas e epigenéticas numa célula somática. As células deixam de responder a sinais do ambiente que regulam o seu crescimento normal, deixam de respeitar as barreiras físicas normais e limites temporais do seu desenvolvimento normal, e adquirem uma vantagem de crescimento sobre as suas células vizinhas. De entre as alterações génicas na carcinogénese estão referidas mutações do ácido desoxirribonucleico (ADN) (*missense*, *nonsense*, *frameshift*), amplificação génica, alterações cromossómicas (inversões, inserções, translocações, aneuploidia, etc) e alterações epigenéticas (Knowles and Selby, 2005).

A etiologia do CCR é multifatorial, resulta de fatores ambientais, nutricionais e hereditários. Existem alguns fatores de risco relacionados com o estilo de vida, como o consumo excessivo de álcool, o tabagismo, o consumo de carne vermelha, uma dieta pobre em fibras e vegetais e reduzida atividade física, que aumentam o risco de desenvolver CCR. O uso de anti-inflamatórios não esteroides, como o ácido acetilsalicílico, tem mostrado ser um fator protetor contra o CCR (*Genetics of Colorectal Cancer (PDQ®) - National Cancer Institute*, [s.d.]).

Os sintomas mais comuns desta patologia podem variar em: alteração dos hábitos intestinais, diarreia, obstipação ou sensação de esvaziamento incompleto, sangue nas fezes, desconforto abdominal generalizado, sensação de enfartamento, perda ponderal, astenia, náuseas e vômitos (Organisation *et al.*, [s.d.]; Winkels *et al.*, 2012). O rastreio do CCR revela-se fundamental no diagnóstico precoce desta patologia resultando numa diminuição da mortalidade. O rastreio é indicado a partir dos 50 anos, para a população em geral, caso se trate de pessoas com maior risco, estas deverão iniciar o rastreio antes dos 50 anos, existindo diretrizes para o efeito (*Genetics of Colorectal Cancer (PDQ®) - National Cancer Institute*, [s.d.]).

Cerca de 75% dos pacientes com CCR têm a doença sem evidência visível de terem herdado o distúrbio. Os restantes 25% dos pacientes têm uma história familiar de CCR, o que sugere uma contribuição hereditária, exposições comuns entre os membros da família, ou uma combinação de ambos. Foram identificadas mutações genéticas como a causa do risco de cancro hereditário em algumas famílias propensas a CCR. Estas mutações são responsáveis por apenas 5% a 6% dos casos de CCR (*Genetics of Colorectal Cancer (PDQ®) -*

National Cancer Institute, [s.d.]). Embora os casos de CCR hereditário representem uma pequena fração de todos os casos de CCR, estudos de base molecular de casos hereditários têm permitido um melhor conhecimento sobre os mecanismos específicos que contribuem para o desenvolvimento CCR esporádico.

Começo esta monografia com uma análise do risco de CCR em indivíduos com história familiar para a patologia, seguida de uma breve descrição da tumorigénese do CCR. Antes de analisar as alterações nos vários subconjuntos de genes e de rever as mutações subjacentes à polipose adenomatosa familiar (PAF) e ao cancro colo-rectal hereditário não associado a polipose (HNPCC) discuto os principais genes associados à carcinogénese colo-rectal. Por último, faço uma breve abordagem sobre os mecanismos genéticos que estão na base da resistência aos tratamentos de quimioterapia e refiro os potenciais biomarcadores no CCR que estão a ser propostos numa perspetiva futura.

2. História familiar como fator de risco para CCR

A proporção de cancro colo-rectal atribuível a causas hereditárias varia de 5% a 30%. As síndromes hereditárias são responsáveis por 1 – 5% de todos os CCR. As síndromes hereditárias mais frequentes são: a polipose adenomatosa familiar (PAF) e o cancro colo-rectal hereditário não associado a polipose (HNPCC), os menos frequentes, por outro lado, são: a polipose juvenil (PJ), a síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ) e a síndrome de Cowden. Entre 10% e 30% dos pacientes com CCR têm história familiar de CCR não associado a uma síndrome hereditária conhecido (Organisation et al., [s.d.]).

O objetivo do estudo do artigo *A Systematic Review and Meta-Analysis of Familial Colorectal Cancer Risk* foi obter os riscos relativos em parentes de primeiro grau com CCR e adenoma colo-rectal (ACR), reunindo dados do risco familiar de acordo com a natureza da história da família e o tipo de neoplasia. Os resultados encontram-se na Tabela I (Johns, Louise E.; Houlston, 2001).

Tabela I. Risco Relativo de vir a desenvolver CCR nas diferentes categorias de História Familiar

História Familiar	Risco Relativo de CCR
Sem História familiar	1 (95% IC, 2.0-2.5)
Um parente de primeiro grau com CCR	2.25 (95% IC, 2.0-2.53)
Mais do que um parente de primeiro grau com CCR	4.25 (95% IC, 3.01-6.08)
Um parente de primeiro grau com CCR diagnosticado antes dos 45	3.87 (95% IC, 2.40-6.22)
Um parente de primeiro grau com ACR	1.99 (95% IC, 1.55-2.55)

IC – Intervalo de Confiança

O risco de desenvolver CCR está relacionado com o número de membros da família afetados e a idade de diagnóstico do cancro. Os indivíduos com uma história familiar de CCR e ACR têm um risco significativamente elevado de desenvolver CCR em comparação com aqueles sem essa história. Os riscos são maiores para familiares de pacientes diagnosticados jovens, aqueles com dois ou mais parentes afetados, e familiares de pacientes com cancro do cólon (Johns, Louise E.; Houlston, 2001).

3. Tumorigénese colo-rectal

Fearon e Vogelstein, em 1990, propuseram um modelo genético designado de sequência adenoma-carcinoma, para explicar a tumorigénese do CCR.

De acordo com este modelo, a sequência é iniciada com uma alteração genética no gene APC. Em tumores sem mutação no gene APC podem ocorrer mutações nos genes *cadherin-associated protein* (CTNNB1) ou *axin 2* (AXIN2) (genes que pertencem à via de sinalização intracelular Wnt). Com a alteração da via de sinalização intracelular RAS/RAF/MAPK/ ERK (responsável pela modulação do crescimento e sobrevivência celular) ocorre a progressão de adenoma precoce para adenoma tardio. Em cerca de 50% dos casos de CCR, esta

alteração tem origem na ativação do oncogene KRAS e em cerca de 20% dos casos ocorre com ativação do *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1* (BRAF). Por fim, a progressão para carcinoma surge com a inativação do gene supressor de tumor proteína 53 responsável pela inibição do crescimento e pela ativação da morte celular quando é induzido stress celular (Fearon, E. F. and Vogelstein, 1990).

No decorrer do ciclo tumoral, diversos processos celulares são alterados como a adesão celular, a angiogénese, a sinalização intracelular, a apoptose e os fatores de crescimento. No final, as células apresentam as características necessárias à formação do tumor, adquirindo um crescimento desregulado.

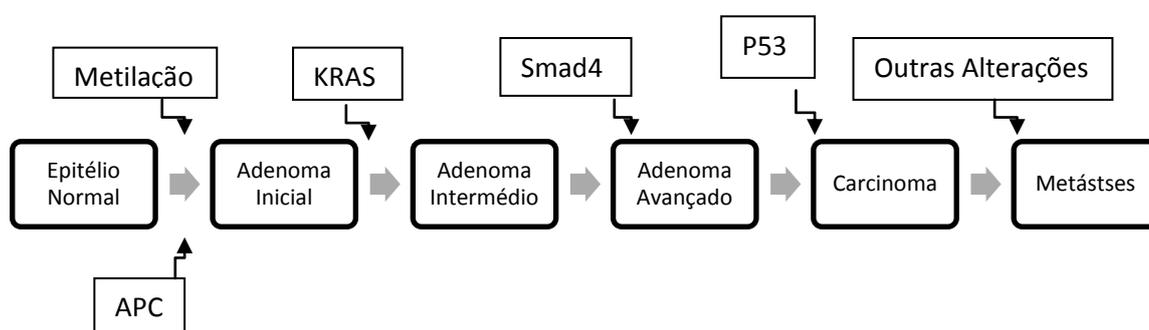


Figura 1. Tumorigénese Colo-Rectal (Fearon, E. F. and Vogelstein, 1990)

4. Cancro colo-rectal e o seu genoma

4.1 Genes associados à carcinogénese colo-rectal

Estudos de sequenciação indicam que cerca de 23 a 32 genes estão, frequentemente, mutados no CCR, incluindo os genes: APC, TP53, KRAS, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase* (PIK3CA), *F-box/WD repeat-containing protein 7* (FBXW7), *SMAD family member 4* (SMAD4), *transcription factor 7-like 2* (TCF7L2), CTNNB1, *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog* (NRAS) e *transcription factor SOX-9* (SOX9) (Cancer and Atlas, 2012). Estes genes podem ser divididos em três classes: genes supressores de tumor, oncogenes e genes de reparação de ADN. Os genes supressores de tumores constituem a classe mais importante de genes responsáveis pelo cancro hereditário e representam a classe de genes responsáveis pela PAF e pela PJ (*Genetics of Colorectal Cancer (PDQ®)* - National Cancer Institute, [s.d.]). Por outro lado, os genes de reparação de ADN são responsáveis pelo HNPCC, e correspondem a uma fração substancial de CCR hereditário. A Tabela 2 inclui um resumo sobre os principais oncogenes e genes supressores de tumor que estão associados à carcinogénese colo-rectal.

Tabela 2. Principais oncogenes e genes supressores de tumor envolvidos na carcinogênese colo-rectal (Fearon, E. R., 2011)

Oncogenes	Frequência estimada
KRAS	40%
NRAS	<5%
PIK3CA	15-25%
BRAF	5-10%
EGFR	5-15%
CDK8	10-15%
CMYC	5-10%
CCNE1	5%
CTNNB1	<5%
NEU (HER2)	<5%
MYB	<5%
Genes Supressores de Tumor	
P53	60-70%
APC	70-80%
FBXW7	20%
PTEN	10%
SMAD4	10-15%
SMAD2	5-10%
SMAD3	5%
TGFβIIR	10-15%
TCF7L2	5%
ACVR2	10%
BAX	5%

As vias de sinalização intracelular mais afetadas no CCR são: a via RAS/RAF/MAPK/ ERK, PI3K/PTEN/AKT e a via WNT/APC. Mutações nos genes de reparação do ADN e silenciamento epigenético estão na base de uma elevada proporção de CCR hereditário e esporádico. Mutações no gene TP53 contribuem para a progressão do CCR, esta inativação

contribui para o crescimento e aquisição de propriedades invasivas sob condições específicas de stress celular e é um evento chave para a transformação de adenomas em carcinomas invasivos em CCR. Metade de todos os cancros, e cerca de 30-60% dos CCRs, contêm uma mutação no gene TP53. Mutações nos genes KRAS e BRAF são encontrados em cerca de 50% de todos os casos de CCR, resultando numa ativação da via de sinalização intracelular MAPK (Cancer and Atlas, 2012).

4.2. Gene polipose adenomatosa cólica no cancro colo-rectal

4.2.1. Polipose Adenomatosa familiar

Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) é uma doença autossómica dominante, que afeta cerca de 1 em 12.000 pessoas e é responsável por 0,5% de todos os CCRs (Rustgi, 2007). Esta patologia, causada por uma mutação germinal no gene APC, caracteriza-se pelo aparecimento de centenas de milhares de pólipos adenomatosos no cólon e no recto dos indivíduos, pela terceira ou quarta década de vida (Rustgi, 2007).

O portador da mutação no gene APC tem 100% de probabilidade de desenvolver cancro do cólon caso não sejam tomadas medidas profiláticas. O curso inevitável é, então, o desenvolvimento de cancro colo-rectal, sendo que a idade média de diagnóstico é de 36 anos (Rustgi, 2007). Por prevenção, procede-se à intervenção cirúrgica, geralmente, na forma de proctocolectomia total e anastomose íleo-anal (isto é, a remoção do cólon com anastomose do íleo terminal do intestino delgado com o canal anal). Certas situações impõem, apenas, uma colectomia subtotal com anastomose íleo-rectal, mas o coto rectal ou remanescente deve ser monitorizado para a recorrência de pólipos (Lynch and la Chapelle, de, 2003).

4.2.2. Gene polipose adenomatosa cólica

O gene APC, um gene supressor de tumor, codifica uma proteína multifuncional que participa em vários processos como adesão celular, transdução de sinal, organização dos microtúbulos, segregação cromossómica, apoptose e regulação do ciclo celular. A principal função do gene APC como supressor tumoral reside na sua capacidade de regular os níveis intracelulares de β -catenina (Schneikert, Grohmann and Behrens, 2007; Albuquerque *et al.*, 2002).

O gene APC, nos humanos, localiza-se na banda cromossômica 5q21 e consiste em 8535 pares de bases (pb) ao longo de 21 exões, dos quais apenas 16 são expressos (Fearhead et al., 2001). O exão 15 abrange mais de 75% da sequência codificada do gene APC, sendo o alvo mais comum de mutações.

As mutações germinais no gene APC são responsáveis pelo desenvolvimento da PAF e, na maioria (85%) dos casos esporádicos de CCR são detetadas mutações somáticas neste gene (Kinzler and Vogelstein, 1996). Estas mutações levam à formação de proteínas truncadas (Fearhead et al., 2001).

As mutações neste gene são, na sua maioria, mutações *nonsense* ou *frameshift* (tipicamente inserções ou deleções) e originam proteínas truncadas com um número variável de repetições de domínios de regulação e ligação da β -catenina (Fearhead et al., 2001). As mutações *frameshift* são mais frequentes do que as mutações *nonsense*, numa proporção de, aproximadamente, 3:1 (Fearon, E. R., 2011).

A proteína APC possui um domínio de oligomerização e uma região *armadillo* na extremidade N-terminal, que correspondem a domínios de ligação e de regulação da β -catenina, respetivamente. Na região central, entre o domínio de oligomerização e a região *armadillo* encontram-se repetições de 15 aminoácidos e de 20 aminoácidos, locais de ligação à axina ou à condutina, que contêm na sua estrutura a sequência de aminoácidos Ser-Ala-Met-Pro (SAMP). A maioria das mutações no APC resulta em proteínas truncadas que perderam a região de regulação da β -catenina. Na maioria das proteínas APC truncadas, pensa-se que a formação do complexo de destruição da β -catenina possa ser impedida devido à remoção dos locais SAMP da proteína APC (Fearhead et al., 2001).

4.2.3. Via de sinalização intracelular Wnt

A sinalização intracelular pela via Wnt (homólogo humano da proteína *wingless* na *Drosophila*) ocorre por três vias: a via canónica, a via polaridade celular-planar e a via Wnt/cálcio. A via canónica é a principal via implicada no CCR (Giles, Es, van and Clevers, 2003).

A via canónica promove a ligação ao ADN de proteínas ativadoras da transcrição pertencentes às famílias *T-cell factor* (TCF) e *lymphoid enhancer factor-1* (Lef-1). As proteínas Wnt induzem a estabilização da β -catenina citosólica, que se liga ao TCF no núcleo, ativando a expressão de genes-alvo (da via Wnt) envolvidos em vários processos celulares como apoptose, proliferação e diferenciação. O gene que codifica a β -catenina é o gene CTNNB1

que se encontra mutado em cerca de 10% dos casos esporádicos de CCR e 30% na síndrome de Lynch (Giles *et al.*, 2003; Polakis, 2000).

Na ausência de sinais ativadores da via Wnt, os níveis de β -catenina citoplasmática são normalmente controlados por um complexo de destruição multiproteico que marca a degradação da β -catenina nos proteossomas. Este complexo é composto por um componente sequestrador, a axina ou a sua homóloga conductina (axina 2), que contém domínios de ligação à β -catenina, o gene APC e as cinases: *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β) e *casein kinase α/ϵ* (CK1 α/ϵ). A principal função do complexo de destruição é promover a fosforilação da β -catenina. A axina promove a ligação entre o APC e a GSK-3 e o APC é fosforilado pela GSK-3, o que permite a ligação à β -catenina, que por sua vez também vai ser fosforilada pela GSK-3. Estas alterações nos níveis de fosforilação marcam o complexo para ubiquitinação e subsequente degradação nos proteossomas (Fearon, E. R., 2011).

Quando as moléculas de sinalização Wnt se ligam aos seus recetores, que são membros da família *Frizzled*, é ativada uma cascata de sinalização, conduzindo à ativação de uma proteína designada por *disheveled* (Dvl). Com a ativação da Dvl a formação do complexo de destruição da β -catenina é impedida e, conseqüentemente há a sua acumulação no citoplasma. A Dvl ativada atua por inibição da GSK-3 ou por se ligar diretamente à axina, impedindo a sua ação.

A β -catenina fica então disponível para ser translocada para o núcleo onde se liga a proteínas TCF que atua como fatores de transcrição, ligando-se aos promotores de genes-alvo da via Wnt como c-MYC, ciclina D1, *CD44 molecule* (Indian blood group) (CD44). Estes genes alvo podem explicar o papel da via de sinalização Wnt no cancro.

Se o gene APC estiver mutado, não se liga à β -catenina, pelo que esta entra no núcleo e pode ativar genes de divisão celular e provocar a transformação celular (Fodde and Brabletz, 2007; Fearon, E. R., 2011). Fármacos anti-inflamatórios não esteroides, incluindo a aspirina, podem atuar, em parte, através da supressão da via Wnt (Segditsas and Tomlinson, 2006).

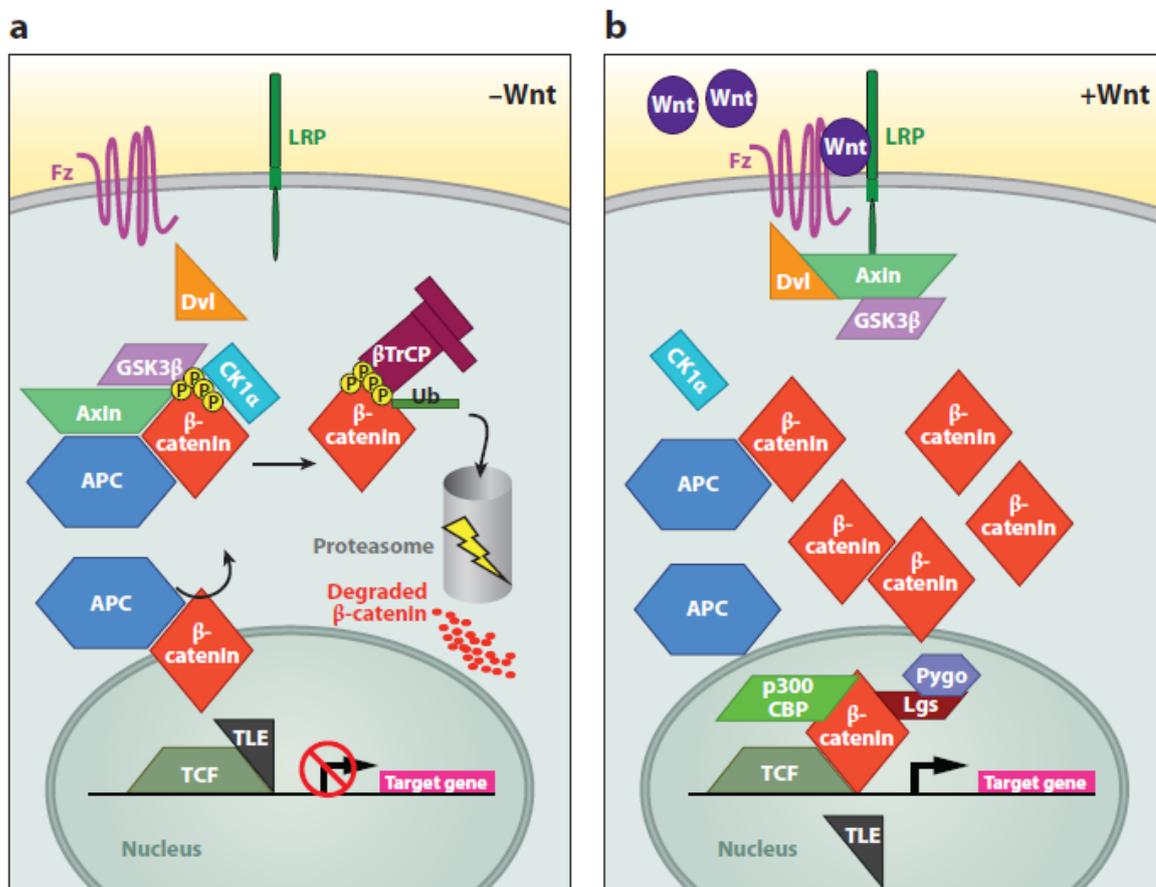


Figura 2. Representação esquemática da via de sinalização intracelular Wnt canónica, na forma inativa (a) e na forma ativa (b) (Fearon, E. R., 2011)

Tendo em conta que quase todos os tumores colo-rectais têm a via de sinalização Wnt ativada, esta via tem despertado interesse como opção terapêutica.

4.3. Mutações no gene supressor de tumor TP53 no cancro colo-rectal

O gene TP53 é um gene supressor de tumor, localizado no braço curto do cromossoma 17, e codifica uma proteína designada TP53. Mutações neste gene estão presentes em 70% dos CCRs e cerca de 85% das mutações são mutações *missense* e ocorrem, frequentemente, nos codões 175,245,248,273 e 282 (Zilfou and Lowe, 2009).

A perda de heterozigotia (LOH) de um gene supressor de tumor é considerada uma das etapas principais da carcinogénese do CCR. A LOH, a perda de um alelo num *locus* específico, é causada por uma deleção ou perda de um cromossoma de um par

cromossômico. A LOH do gene TP53 está associada com a transição adenoma-carcinoma, (facilita o crescimento contínuo e a aquisição de propriedades invasivas do tumor) e está presente em 70% dos CCRs (Fearon, E. R., 2011).

A proteína TP53 desempenha um papel importante no controlo da proliferação celular, quer parando a progressão do ciclo celular em G1/S para permitir a reparação em casos de lesões do ADN, quer induzindo a apoptose, em resposta a anormalidades mais graves, quer em restringir a angiogénese. Quando o gene p53 está mutado perde a função na regulação dos genes-alvo, por exemplo, *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) e *BCL2-associated X protein* (BAX) (Vousden and Prives, 2009).

Após a proteína TP53 se ligar à região do ADN danificada, ocorre ativação da proteína p21 que inibe enzimas necessárias para a célula passar para a fase S do ciclo celular, bloqueando assim o ciclo celular. A proteína TP53, também, induz a apoptose ao regular a expressão de mediadores anti ou pró-apoptóticos, envolvidos em atividades celulares, como os membros da família de proteínas Bcl-2, por exemplo os genes PUMA e BAX. (Vousden and Prives, 2009)

Mutações no gene TP53 parecem conferir um prognóstico pior para o doente, diminuindo a esperança média de vida. A deteção da mutação do gene TP53 poderá ser um método importante para prognóstico (Fearon, E. R., 2011).

4.4. Via de sinalização intracelular RAS/RAF/MAPK/ ERK e PI3K/PTEN/AKT no cancro colo-rectal

O *mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR) é uma cinase de serina/treonina e desempenha um papel central como regulador do crescimento e da proliferação celular. Mutações nesta via de sinalização intracelular estão associadas à tumorigénese, angiogénese e ao crescimento e metastização do tumor. As vias de sinalização intracelular PI3K/PTEN/AKT e RAS/RAF/MAPK/ERK regulam atividade do mTOR (Manuscript, 2009; Manuscript, 2012).

O complexo esclerose tuberosa 1 (TSC1) e o complexo esclerose tuberosa 2 (TSC2) funcionam como um elemento regulador negativo do mTOR. A inativação de certos genes supressores tumorais, como *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), ativa a proteína-cinase B (AKT), que vai fosforilar e inibir o complexo TSC1-TSC2, tendo como consequência a ativação da via do mTOR (Manuscript, 2012). A AKT está envolvida na sobrevivência celular a vários níveis, além da ativação de mTOR, inibe a GSK3, provocando um aumento dos níveis de β -catetina e consequentemente ativação da via Wnt. Embora as mutações

somáticas no PTEN sejam encontradas em apenas 10% de CCRs, alguns estudos sugerem que o PTEN pode estar mutado em 15-20% dos CCRs (Fearon, E. R., 2011).

A *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) é uma enzima lipídica, cuja função é fosforilar o fosfoinositol, o que resulta na formação de lípidos tais como o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) e o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Estes lípidos estão envolvidos em vários processos intracelulares, incluindo a proliferação, a sobrevivência celular, a reorganização do citoesqueleto, adesão celular e a angiogénese. O PIP3 é o lípido principal produzido in vivo e é degradado pela fosfatase PTEN. Mutações no gene que codifica a PTEN estão presentes em algumas doenças como a síndrome de Cowden, bem como em vários tumores enfatizando o papel da PTEN na carcinogénese (Fearon, E. R., 2011).

A via RAS/RAF/MEK/ERK é ativada por muitos fatores de crescimento e citocinas, que são importantes para a proliferação celular e apoptose. Esta via tem como alvo o complexo TSC2, uma vez que o Ras ativado induz a fosforilação da TSC2 (Manuscript, 2009).

Mutações no gene KRAS estão presentes em cerca de 30-40 % dos CCRs. Além disso, os pacientes com CCR, com mutações no gene KRAS e/ou com mutações no gene BRAF têm mau prognóstico e uma esperança média de vida reduzida. As mutações nestes genes têm efeitos no crescimento celular, assim como, na invasão tumoral, angiogénese e na resistência ao tratamento de quimioterapia (Fearon, E. R., 2011).

Quando ativado, RAS ativa a proteína cinase RAF (A-Raf, B-Raf, C-Raf), codificada pelo gene BRAF, que fosforila e ativa MEK que, por sua vez, ativa a *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), esta fosforila e ativa *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), transmitindo o sinal para o núcleo. Ao receber o sinal, os genes alvo (associados ao crescimento celular) são ativados, resultando num processo descontrolado de divisão celular e tumorigénese (Fearon, E. R., 2011). Mutações no gene KRAS atuam de forma sinérgica às mutações no APC pois também levam à acumulação de β -catenina no núcleo, e isso pode resultar num maior desenvolvimento tumoral. A K-ras ativada provoca a fosforilação dos resíduos de tirosina da β -catenina, levando à sua libertação da E-caderina das junções aderentes e conseqüente aumento da sinalização Wnt no núcleo. De modo semelhante, mutações somáticas noutros genes da via RAS/RAF/MEK/ERK, como o BRAF, encontradas em cerca de 10% dos CCR esporádico, parecem aumentar a via de sinalização Wnt através da fosforilação dos resíduos de tirosina da β -catenina, impedindo a ligação desta à E-caderina (Fodde and Brabletz, 2007; Segditsas and Tomlinson, 2006).

A maioria das sequências de microssatélites está localizada em regiões não codificantes do genoma. Contudo, algumas sequências localizam-se em regiões codificantes ou regiões promotoras de genes envolvidos na regulação da proliferação celular. A MSI pode ser classificada como alta (MSI-High) quando mais de 30% dos marcadores, utilizados na deteção, são instáveis. Neste caso, o marcador é considerado positivo para erro de replicação. Quando essa instabilidade aparece em menos de 30% dos marcadores analisados, a instabilidade dos microssatélites é considerada baixa (MSI-Low). A ausência de instabilidade em todos os marcadores é classificada como estabilidade de microssatélites (MSS) (Fearon, E. R., 2011).

A instabilidade cromossômica (CIN) caracteriza-se pela ocorrência de perdas ou ganhos nos cromossomas, originando alterações estruturais e numéricas. Em cerca de 75-85% dos casos de CCR verifica-se instabilidade cromossômica. CIN origina a desregulação de diferentes genes responsáveis pelo controlo na formação do fuso mitótico, pela expressão da telomerase e encurtamento dos telómeros, pela regulação do número de centrossomas e reparação de quebras na cadeia dupla de ADN (Lynch, 2003).

A presença de MSI parece estar associada a melhor prognóstico, a maior sobrevivência e a menor recidiva do tumor. Alguns estudos têm demonstrado que um número significativo dos doentes MSI não parece beneficiar da terapêutica convencional ao contrário do que acontece com os tumores MSS (Sargent *et al.*, 2010; Ph *et al.*, 2013). Este facto pode ser atribuído à resistência da apoptose, que é uma das consequências da deficiência nos genes do sistema de reparação de erros no ADN. Pelo que a instabilidade de microssatélites poderá ser um importante marcador genético a ter em conta na escolha do tratamento nos doentes com CCR.

5.1. Cancro colo-rectal hereditário não associado a polipose

O HNPCC inclui o síndrome de Lynch e a síndrome de X. O síndrome de Lynch é uma doença autossómica dominante que se caracteriza pelo aparecimento de adenomas no cólon e a ocorrência de cancros extra-cólicos. Representa cerca de 1-5% de incidência de CCR. Os doentes com síndrome de Lynch apresentam uma perda de função dos genes responsáveis pela reparação do ADN: MLH1, MSH2 e MSH6. Esta incapacidade de reparação de erros no ADN leva acumulação de mutações genéticas no ADN, o qual irá desencadear o processo de carcinogénese do HNPCC.

A detecção de mutações nos genes de reparação, indiretamente através de MSI, é de fundamental importância para o tratamento e prevenção da evolução da HNPCC, uma vez que pode oferecer informações para os indivíduos portadores e familiares sobre o risco de vir a desenvolver o cancro (Jass, 2006; Fearon, E. R., 2011).

6. Epigenética

O termo epigenética refere-se a todas as mudanças reversíveis no genoma, sem alteração da sequência de nucleótidos do ADN. A epigenética inclui o estudo de como os padrões de expressão são transmitidos aos descendentes, como ocorre a mudança de expressão de genes durante a diferenciação celular e como fatores ambientais influenciam a expressão dos genes. A investigação na área da epigenética tem tido grandes implicações na compreensão de doenças humanas, incluindo sobre o cancro e o envelhecimento (Bird, 2002).

A metilação de ADN é alteração epigenética mais frequente, e ocorre preferencialmente nos resíduos de citosina. Além da metilação do ADN, a modificação da estrutura das histonas (proteínas associadas à molécula de DNA e que determinam a compactação da cromatina) também é considerada importante no silenciamento de genes através de acetilação, metilação ou fosforilação (Fearon, E. R., 2011).

A metilação do ADN consiste na adição de um grupo metil à citosina, através de metiltransferases do ADN que adicionam o grupo metil, através de uma ligação covalente, ao carbono 5 da citosina, originando a 5-metilcitosina. A estrutura da citosina é assim alterada sem alterar as suas propriedades de emparelhamento de bases. Na maioria dos mamíferos (incluindo o ser humano), entre todas as bases que formam o ADN somente a citosina pode sofrer metilação. Locais particularmente suscetíveis são os dinucleótidos CpG, bases de citosina e guanina adjacentes. Estes dinucleótidos formam as chamadas ilhas CpG. Estas ilhas de CpG são encontradas em cerca de 60-70% de todos os promotores, levando à repressão da transcrição e consequentemente ao silenciamento génico (Bird, 2002).

Em células tumorais, os promotores estão hipermetilados, em genes supressores de tumores e em genes de reparação, o que resulta no silenciamento do processo de transcrição. Por outro lado, a hipometilação em proto-oncogenes leva à sua ativação e, consequentemente, ao aumento da sua expressão.

Em células normais, um dos alelos do gene *insulin-like growth factor 2* (IGF2), codifica um fator de crescimento e só é expresso a sua cópia paterna, está sempre silenciado por metilação. Em casos em que não ocorre o silenciamento de um dos alelos, o IGF2 passa a

sofrer transcrição exagerada, levando à uma produção aumentada. A hipometilação do IGF2 é encontrada no epitélio normal de pacientes portadores de tumores colo-rectais e pode estar associado ao risco aumentado de desenvolver este tipo de cancro (Ting, McGarvey and Baylin, 2006). A hipermetilação afeta frequentemente o promotor do gene APC (o que leva à ativação da via WNT) e o gene MLH1 em cancros colo-rectais.

Tendo em conta algumas destas regiões os primeiros biomarcadores foram desenvolvidos com base nestas modificações. Um dos melhores marcadores deste tipo é a metilação do promotor de MLH1 (Fearon, E. R., 2011).

Além da metilação do ADN, a modificação da estrutura das histonas também é uma via importante no silenciamento de genes. Havendo 3 vias possíveis: metilação, acetilação e desacetilação de histonas. No CCR, acetilações e metilações de histonas são as vias mais afetadas. A metilação de histonas é promovida por algumas metiltransferases que tem como alvo determinados resíduos de arginina e de lisina nas histonas, particularmente a histona 3. O padrão de metilação das histonas influencia a metilação do ADN, contribuindo para uma menor ou maior compactação da cromatina. No caso da acetilação das histonas, este é um mecanismo de estímulo à transcrição. A desacetilação de histonas por desacetilases de histonas (HDACs) remove os grupos acetil e leva à repressão da transcrição, uma vez que há uma maior compactação da cromatina (Letters, 2005).

Algumas terapias, ainda poucas, já utilizam os conhecimentos da epigenética para o tratamento do cancro. A compreensão da epigenética, dos mecanismos envolvidos na ativação e silenciamento de genes, poderá permitir a criação de novas modalidades para o tratamento de doenças como o cancro.

7. Terapêutica no cancro colo-rectal

Ao longo das últimas décadas, o diagnóstico precoce e as novas metodologias terapêuticas têm contribuído para o aumento da sobrevivência e para o aumento da esperança média de vida de doentes com CCR. Sendo o CCR a segunda causa de morte, por cancro, é importante o aparecimento de novas terapêuticas eficazes no tratamento e de marcadores de prognóstico e preditivos da resposta terapêutica (Article, [s.d.]).

O primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento do CCR foi o 5-Fluorouracilo, mas, atualmente, fazem-se combinações terapêuticas do 5-Fluorouracilo com novos fármacos como oxaliplatina, irinotecano, cetuximabe e bevacizumabe o que veio aumentar a esperança média de vida nos doentes (Wilke, 2003).

7.1. Resistência à quimioterapia

Entre os mecanismos intracelulares de resistência à quimioterapia citam-se: i) alterações no alvo da ação do fármaco, ii) modificação na capacidade das células tumorais para a reparação de erros no ADN, iii) alterações no influxo e efluxo do fármaco, iv) alterações no metabolismo do fármaco, o que pode interferir com a quantidade ativa do fármaco no interior da célula, e v) alteração na regulação da morte celular, que pode fazer com que a indução da morte celular pelo fármaco utilizado não seja bem-sucedida (Knowles and Selby, 2005).

7.1.1. Tratamento 5-fluorocilo e oxaliplatina

O 5-Fluorocilo é um análogo das moléculas de pirimidina do ADN e do ácido ribonucleico (RNA) e o seu mecanismo de ação é atribuído principalmente à inibição da timidilato sintase (TS) e à sua incorporação no ADN e RNA durante a síntese destas moléculas. Na célula, o 5-FU é convertido em três metabolitos ativos, o fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), responsável pela inibição do TS, o fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) e o fluorouridina trifosfato (FUTP) que atuam pela incorporação incorreta no ADN e RNA respetivamente. O TS catalisa a reação de metilação do dUMP em FdUMP. A sobre-expressão do gene TS está associada à resistência ao 5-Fluorocilo por parte do tumor (*Role of Pharmacogenetics as Predictive Biomarkers in CRC Treatment: 5-Fluorouracil*, [s.d.]).

A oxaliplatina é um fármaco derivado da platina (da mesma família que a cisplatina e a carboplatina). Assim como outros derivados da platina, a oxaliplatina atua sobre o ADN, através da formação de ligações alquil que resultam no surgimento de pontes inter e intracadeias, levando a uma replicação errada do ADN e à apoptose celular (Ruzzo *et al.*, 2007). Por isso, alterações nos genes envolvidos no sistema MMR, tais como o MSH6 e MLH1, diminuem a sensibilidade da célula ao fármaco. Para além destes, alterações nos genes envolvidos no mecanismo de reparação do ADN por excisão de nucleótidos (NER) afetam a resposta do doente ao tratamento com oxaliplatina. Exemplo disso, são as enzimas *excision repair cross-complementation group 1* (ERCC1) e *excision repair cross-complementation group 2* (ERCC2), componentes essenciais da via de reparação NER por excisão de nucleótidos, cujos níveis de expressão estão inversamente relacionados com a resposta à terapêutica nos cancros colo-rectal.

A elevada expressão do ERCCI e TS são marcadores preditivos de baixa resposta à terapêutica 5-fluorocilo com oxaliplatina (*Role of Pharmacogenetics as Predictive Biomarkers in CRC Treatment: 5-Fluorouracil*, [s.d.]).

7.1.2. Tratamento com irinotecano

O irinotecano é um agente antineoplásico da classe dos agentes inibidores da topoisomerase I. A topoisomerase I desempenha um papel crítico no “desenrolar” da molécula de ADN durante a replicação e a transcrição, causando quebras transitórias no ADN de cadeia simples que, eventualmente, são reparadas. O irinotecano estabiliza as quebras feitas pela topoisomerase I, conduzindo à fragmentação do ADN e à morte celular (*Role of Pharmacogenetics as Predictive Biomarkers in CRC Treatment: 5-Fluorouracil*, [s.d.]).

O irinotecano é convertido para o metabolito ativo SN-38, o qual é então conjugado com a *UDP-glucuronosil-transferase 1A1* (UGT1A1) para SN-38G que é eliminado. O polimorfismo UGT1A1 * 28 está associado com a expressão diminuída de UGT1A1 o que diminuiu a glucuronidação de SN38. Isso resulta num aumento da toxicidade devido ao aumento dos níveis sanguíneos do metabolito ativo. Os indivíduos com o genótipo UGT1A1 * 28 estão em maior risco de desenvolver neutropenia e diarreia. O risco de ocorrência de toxicidade hematológica nos indivíduos UGT1A1 * 28 está dependente da dose de irinotecano administrada. Existindo benefício quando administrado em doses intermédias, com 5-fluorocilo e em doses baixas quando administrado concomitantemente com a oxaliplatina (Hoskins *et al.*, 2007).

7.1.3. Terapêutica anti-EGFR

O fator de crescimento epidérmico (EFG) ativa a proliferação celular pela ligação ao recetor-EGF (EGFR). As vias de sinalização associadas ao EGFR estão envolvidas no ciclo celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência ou morte celular. As vias de sinalização intracelular RAS/RAF/MAPK/ ERK e PI3K/AKT/mTOR são as vias mais importantes na regulação dos seus níveis de expressão (Krieken, van *et al.*, 2008; Manuscript, 2009).

A inibição do EGFR por meio de anticorpos monoclonais anti- EGFR impede a ativação da via de transdução de sinais relevantes. Um dos mecanismos de resistência primária à terapêutica anti-EGFR passa pela sobreativação de intervenientes das vias de sinalização iniciadas pelo EGFR, sendo a mais importante a proteína KRAS. Doentes com mutações no

gene KRAS apresentam formas ativas da proteína KRAS, o que anula, nestes casos, o benefício da terapêutica anti-EGFR. Para além do KRAS, foram descritos outros genes mutados que estão implicados, igualmente, na resistência do tumor à terapêutica anti-EGFR, nomeadamente mutações nas proteínas BRAF, PI3K e PTEN (Krieken, van *et al.*, 2008).

Fármacos inibidores da atividade do EGFR, como cetuximabe e bevacizumabe, são utilizados no tratamento de CCRs, sobretudo em casos de metastização.

A hiperativação do mTOR é frequente nos cancros humanos. Num estudo realizado com células de cancro colo-rectal resistentes a cetuximab verificou-se que a administração de um dos fármacos anti-EGFR concomitantemente com everolimus, um inibidor da mTOR, permitiu restaurar a sensibilidade à terapêutica biológica, atuando os dois fármacos sinergicamente. Isto demonstra, a sobreativação do mTOR é um mecanismo de resistência ao cetuximabe no cancro colo-rectal metastizado (Bianco *et al.*, 2008).

Como referido anteriormente, existem outras alterações moleculares que estão associadas a uma maior resistência ao tratamento com quimioterapia, como a instabilidade de microssatélites e ativação da via Wnt.

Com a identificação de certos marcadores de resposta à terapêutica, será possível prever quais os doentes que são intrinsecamente resistentes e os que reagem melhor a determinado fármaco. No entanto, esta é uma área que está em estudo e alguns dos marcadores já identificados ainda não são utilizados na prática clínica por não ser consensual a sua utilização.

8. Biomarcadores no cancro colo-rectal

A sobrevivência e o prognóstico dos doentes com CCR dependem da deteção da doença numa fase precoce. Entre as abordagens de rastreio disponíveis, a pesquisa de sangue oculto nas fezes e a colonoscopia são as mais usadas e recomendadas na prática clínica para pessoas com alto risco de desenvolver CCR (Schweiger *et al.*, 2013). A utilização de marcadores genéticos e marcadores epigenéticos ou MSI, são promissores, mas não são métodos de rotina utilizados para a deteção de CCR. A pesquisa de marcadores genéticos pode ser realizada de modo não invasivo, através da análise de células das criptas (Schweiger *et al.*, 2013). Além dos biomarcadores fecais, há potenciais marcadores de soro e de sangue para CCR, tais como o antígeno carcinoembrionário (CEA) e o antígeno de hidrato de carbono (CA 19-9)(Schweiger *et al.*, 2013). Ambos são marcadores tumorais gastrointestinais em uso clínico, onde a CEA está associada com o prognóstico de pacientes com CCR. Na tabela 3

está incluído um resumo dos marcadores genéticos mais promissores e com potencial para utilização clínica.

Tabela 3. Marcadores Genéticos no cancro colo-rectal

Marcador Genético	Comentário
MSI	Melhor Prognóstico; Não beneficia da terapêutica convencional
Metilação do gene MLH1	Risco aumentado de desenvolver CCR
APC	Risco aumentado de desenvolver CCR
KRAS; BRAF	Prognóstico Reservado
TP53	Prognóstico Reservado
KRAS; mTor	Resistência ao tratamento anti-EGFR
ERCC1; TS	Resistência ao tratamento 5-Fluorocilo com oxaliplatina
Fenótipo UGT1A1 * 28	Toxicidade ao tratamento com irinotecano

9. Conclusão

Apesar de continuar a ser uma das neoplasias mais prevalentes, ao longo das últimas décadas, as mortes por CCR têm vindo a diminuir, devido, em parte, à implementação de um programa de rastreio e a métodos de diagnóstico mais eficazes. A colonoscopia continua a ser o principal meio de diagnóstico, permitindo diminuir a prevalência de novos casos ao tratar as lesões precursoras.

O estudo de formas hereditárias de cancro colo-rectal tem contribuído para uma melhor compreensão das formas esporádicas de CCR, e tem, também, fornecido conhecimentos fundamentais para entender os mecanismos genéticos que estão na base do CCR, entre os quais estão incluídos: a resposta à quimioterapia por parte do doente (com base no seu perfil genético), o risco genético de desenvolver CCR numa família, o diagnóstico e prognóstico molecular em doentes com CCR.

Estudos recentes têm demonstrado que algumas alterações genéticas são fatores de prognóstico e preditivos da resposta por parte do doente à terapêutica. O conhecimento das características moleculares do tumor pode auxiliar no tratamento a ser utilizado, evitando-se, assim, despesas desnecessárias e aumenta-se a probabilidade de sucesso do tratamento. Além disso, o médico terá uma maior possibilidade de prever a evolução clínica do doente, estabelecendo protocolos mais efetivos para o acompanhamento dos mesmos.

Além disto, é de extrema importância, a validação de biomarcadores que permitam o diagnóstico precoce, o prognóstico e que auxiliem na escolha do tratamento mais eficaz de doentes com CCR.

10. Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, C. *et al.* - The “just-right” signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade. **Human molecular genetics**. 11:13 (2002) 1549–60.

ARTICLE, R. - The Increasing Role of Pharmacogenetics in the Treatment of. [s.d.] 197–203.

BIANCO, R. *et al.* - Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs. **British journal of cancer**. 98:5 (2008) 923–30. doi: 10.1038/sj.bjc.6604269.

BIRD, A. - DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & development**. 16:1 (2002) 6–21. doi: 10.1101/gad.947102.

CANCER, T.; ATLAS, G. - Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**. 487:7407 (2012) 330–7. doi: 10.1038/nature11252.

FEARNHEAD, N. S. *et al.* - The ABC of APC. 10:7 (2001).

FEARON, E. F.; VOGELSTEIN, B. - for Colorectal Tumorigenesis. 61:1990) 759–767.

FEARON, E. R. - Molecular genetics of colorectal cancer. **Annual review of pathology**. 6:2011) 479–507. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130235.

FODDE, R.; BRABLETZ, T. - Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. **Current opinion in cell biology**. 19:2 (2007) 150–8. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.007.

Genetics of Colorectal Cancer (PDQ®) - National Cancer Institute - [Em linha] [Consult. 24 maio. 2014]. Disponível em WWW:URL:<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/colorectal/HealthProfessional/page1/AllPages>.

GILES, R. H.; ES, J. H. VAN; CLEVERS, H. - Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**. . ISSN 0304419X. 1653:1 (2003) 1–24. doi: 10.1016/S0304-419X(03)00005-2.

HOSKINS, J. M. *et al.* - UGT1A1*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. **Journal of the National Cancer Institute**. 99:17 (2007) 1290–5. doi: 10.1093/jnci/djm115.

JASS, J. R. - Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. **World journal of gastroenterology : WJG**. 12:31 (2006) 4943–50.

JOHNS, LOUISE E.; HOULSTON, S. R. - A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. **The American Journal of Gastroenterology**. 96:1 (2001) 2992–3002.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. - Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**. 87:2 (1996) 159–70.

KNOWLES, M. A. .; SELBY, P. J. - **Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer**. 4^a. ed. New York : Oxford University Press, 2005

KRIEKEN, J. H. J. M. VAN *et al.* - KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal for an European quality assurance program. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**. 453:5 (2008) 417–31. doi: 10.1007/s00428-008-0665-y.

LETTERS, M. B. - Volume 10, (2005) pp 631 – 647. 10:September (2005) 631–647.

LYNCH, H. T. - 030306 Hereditary Colorectal Cancer. 2003) 919–932.

LYNCH, H. T.; LA CHAPELLE, A. DE - Hereditary colorectal cancer. **The New England journal of medicine**. 348:10 (2003) 919–32. doi: 10.1056/NEJMra012242.

MANUSCRIPT, A. - NIH Public Access. 11:3 (2009) 63–76.

MANUSCRIPT, A. - NIH Public Access. 16:2012) 325–331. doi: 10.1016/j.drudis.2011.02.008.Targeting.

ORGANISATION, W. G. *et al.* - Triagem do câncer colorretal. [s.d.] 1–19.

PH, D. *et al.* - NIH Public Access. 349:3 (2013) 247–257. doi: 10.1056/NEJMoa022289.Tumor.

POLAKIS, P. - Wnt signaling and cancer Wnt signaling and cancer. 2000) 1837–1851. doi: 10.1101/gad.14.15.1837.

Role of Pharmacogenetics as Predictive Biomarkers in CRC Treatment: 5-Fluorouracil - [Em linha] [Consult. 27 jun. 2014]. Disponível em WWW:URL:http://www.medscape.com/viewarticle/588189_2.

RUSTGI, A. K. - The genetics of hereditary colon cancer. **Genes & development**. 21:20 (2007) 2525–38. doi: 10.1101/gad.1593107.

RUZZO, A. *et al.* - Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**. 25:10 (2007) 1247–54. doi: 10.1200/JCO.2006.08.1844.

SARGENT, D. J. *et al.* - Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**. 28:20 (2010) 3219–26. doi: 10.1200/JCO.2009.27.1825.

SCHNEIKERT, J.; GROHMANN, A.; BEHRENS, J. - Truncated APC regulates the transcriptional activity of beta-catenin in a cell cycle dependent manner. **Human molecular genetics**. 16:2 (2007) 199–209. doi: 10.1093/hmg/ddl464.

SCHWEIGER, M.-R. *et al.* - Genomics and epigenomics of colorectal cancer. **Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine**. 5:2 (2013) 205–19. doi: 10.1002/wsbm.1206.

SEGMENTS, S.; TOMLINSON, I. - Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. **Oncogene**. 25:57 (2006) 7531–7. doi: 10.1038/sj.onc.1210059.

TING, A. H.; MCGARVEY, K. M.; BAYLIN, S. B. - The cancer epigenome--components and functional correlates. **Genes & development**. 20:23 (2006) 3215–31. doi: 10.1101/gad.1464906.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. - Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**. 137:3 (2009) 413–31. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.037.

WILKE, H.-J. - Current treatments and future perspectives in colorectal and gastric cancer. **Annals of Oncology**. 14:90002 (2003) 49ii–55. doi: 10.1093/annonc/mdg730.

WINKELS, R. M. *et al.* - Smoking increases the risk for colorectal adenomas in patients with Lynch syndrome. **Gastroenterology**. 142:2 (2012) 241–7. doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.033.

ZILFOU, J. T.; LOWE, S. W. - Tumor suppressive functions of p53. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**. 1:5 (2009) a001883. doi: 10.1101/cshperspect.a001883.