



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

METILAÇÃO E CCR

Trabalho submetido por
Mónica Sofia Barroso Soares
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

METILAÇÃO E CCR

Trabalho submetido por
Mónica Sofia Barroso Soares
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Alexandra Maia e Silva

outubro de 2016

Dedicatória

Ao meu amigo que está longe,
Que sempre acreditou em mim e nas minhas capacidades,
Que sempre partilhou as minhas alegrias e as minhas tristezas,
E que mesmo longe continua a fazê-lo.
A ti, meu querido avô.

Agradecimentos

Deixo aqui o meu mais profundo agradecimento a todos aqueles que estiveram presentes nesta etapa e me ajudaram, de alguma forma, na concretização deste trabalho.

Agradeço, em primeiro lugar à Professora Doutora Alexandra Maia e Silva, por toda a orientação dada, pela disponibilidade, compreensão, por todos os conhecimentos que me transmitiu e pelo incansável apoio e incentivo que me deu, sempre com grande simpatia.

A todos os professores que me acompanharam ao longo do meu percurso académico, pela partilha de conhecimentos, disponibilidade, atenção e amizade.

Aos meus colegas, que se tornaram grandes amigos, pela partilha de tão bons momentos.

Aos meus amigos, pela amizade de sempre, pelo apoio e incentivo, por sempre acreditarem em mim e nunca me deixarem desistir, sem eles tinha sido muito mais difícil.

Um obrigado especial ao meu amigo Fernando, por todo o apoio e ajuda nestas últimas semanas.

Ao Pedro, por todo o amor e companheirismo, pela paciência, motivação, por estar sempre presente nos bons e nos maus momentos e por nunca me ter largado a mão quando mais precisava.

E por último, mas não menos importantes, deixo aqui o meu mais profundo agradecimento aos meus pilares, aos meus pais e irmã, pelo incansável apoio, carinho, compreensão, dedicação, amor incondicional, por toda a confiança que sempre depositaram em mim e por sempre me incentivarem a nunca desistir dos meus sonhos. Sem vocês era impossível ter chegado até aqui.

A todos, o meu mais sincero, Obrigado!

Resumo

O Cancro Cólon Retal (CCR) é um dos cancros mais comuns no mundo, sendo o terceiro mais frequente e mortal a nível mundial, com uma incidência de cerca de 9% e provocando a morte de aproximadamente 394000 pessoas/ano. O desenvolvimento desta neoplasia surge maioritariamente associado a uma sequência e acumulação de mutações genéticas, designada sequência adenoma-carcinoma. Esta doença pode também ser causada por outro mecanismo genético, a instabilidade de microssatélites (MSI). Esta associa-se à carcinogénese cólon retal pela presença de mutações em genes envolvidos nos mecanismos de reparação do DNA.

Recentemente, uma nova via molecular, envolvendo principalmente mecanismos epigenéticos, foi descoberta como outra possível causa no desenvolvimento de CCR. Nesta via, alterações epigenéticas como a metilação do DNA, modificações das histonas, alterações da estrutura da cromatina, perda de *imprinting* genómico e microRNAs foram associadas à carcinogénese cólon retal.

Este trabalho teve como objetivo o estudo das alterações epigenéticas na carcinogénese do CCR, em particular, a influência da metilação do DNA no desenvolvimento desta patologia. Para este estudo, foi realizada uma pesquisa bibliográfica no motor de busca Pubmed utilizando os termos “Cancer”, “Colorectal”, “Methylation” e “Epigenetic”.

A metilação do DNA é fundamental na modulação da expressão genética, e nas células cancerígenas, a alteração do padrão de metilação do DNA inclui a hipermetilação das ilhas CpG e a hipometilação global do DNA. Esta deteção aberrante da metilação tem sido usada clinicamente para estratificar o risco de desenvolver cancro e na deteção precoce e prognóstico do cancro. Uma vez que a alteração da metilação do DNA é reversível, esta tem sido recentemente estudada como um possível alvo na terapêutica anticancerígena ou em terapêuticas de combinação, no tratamento do CCR. Para além disto, vários estudos apontam que a metilação do DNA pode ser utilizada como um biomarcador no diagnóstico, avaliação e prognóstico desta neoplasia.

Palavras-chave: Cancro; CCR; Epigenética; Metilação do DNA

Abstrat

Colorectal cancer (CRC) is the third most common and deadly cancer world-wide, with an incidence of 9% and responsible for the dead of approximately 394000 individuals per year. The development of this neoplasia is, in most cases, due to the accumulation of genetic mutations, also known as adenoma-carcinoma sequence. In addition, CRC can also be caused by another genetic mechanism called microsatellite instability. In this process, the carcinogenesis results from mutations in genes of the DNA repair machinery.

However, a new molecular pathway, involving epigenetic mechanisms, was recently found as another possible cause related to the carcinogenesis of CRC. These mechanisms involve DNA methylation, histone modifications, chromatin structure alterations, loss of imprinting and microRNAs.

The present work aimed to debate the knowledge in the field of epigenetic in association with the carcinogenesis of CRC, specifically how DNA methylation alterations affect the development of this condition. For this, a bibliographic search in the Pubmed database was performed using the terms “Cancer, Colorectal, Methylation and Epigenetic”.

The DNA methylation is a key mechanism in regulating the genetic expression of the cell and it was observed that in cancer cells this process was altered, resulting in CpG island hypermethylation and global hypomethylation of genomic DNA. Abnormal DNA methylation is now being used clinically to stratify the risk of developing cancer and in early detection and prognosis of the disease. Because DNA methylation alteration is a reversible process, it has recently been studied as a possible target in anti-cancer therapy or combination therapies. Furthermore, several studies point that DNA methylation can be used as a biomarker for the diagnosis, evaluation and prognosis of colorectal cancer

Keywords: Cancer; CRC; Epigenetics; DNA Methylation

Índice Geral

Resumo	1
Abstrat	3
Introdução	11
1. Cancro: Estado de arte	11
Capitulo I.....	14
1. O Cancro Cólon Retal (CCR)	14
1.1. Epidemiologia do CCR	15
1.2. Etiologia	17
1.3. Patofisiologia.....	18
1.4. Fatores de Risco	21
1.5. Sintomatologia	24
1.6. Métodos de rastreio e diagnóstico.....	24
Capitulo II.....	28
2. Mecanismos moleculares associados à carcinogénese do Cancro Cólon Retal .	28
2.1. Via de instabilidade cromossómica.....	29
2.1.1. Via de Transdução de Sinal WNT/ β -catenina	33
2.2. Via de Instabilidade de Microsatélites.....	35
2.2.1. Síndrome de Lynch.....	37
Capitulo III	40
3. Epigenética	40
3.1. Modificações epigenéticas	40
3.1.1. Metilação do DNA	40
3.1.2. Modificação das histonas.....	42
3.2. Alterações epigenéticas no Cancro	43
3.2.1. Hipometilação Global do DNA	44
3.2.2. Hipermetilação do DNA.....	44

3.3. Epigenética e CCR.....	45
3.3.1. Metilação do DNA no desenvolvimento de CCR	45
3.3.1.1. Hipermetilação e o fenótipo metilador CIMP	46
3.3.1.1.1. Metilação do promotor do gene <i>MLH1</i> no CCR esporádico.....	48
3.3.1.2. Hipometilação do DNA no desenvolvimento do CCR	49
3.4. Fatores que afetam a metilação do DNA	50
3.4.1. Envelhecimento	50
3.4.2. Dieta e CCR.....	51
3.4.2.1. Polimorfismos do gene MTHFR no desenvolvimento do CCR.....	53
3.4.3. Tabagismo	56
Capitulo IV	57
4. Aplicações Clínicas da Epigenética e Terapêutica	57
4.1. Inibidores das DNMTs	58
4.2. Inibidores das HDACs	60
4.3. Terapêuticas combinadas	62
Conclusão	64
Bibliografia.....	68

Índice de Figuras

Figura 1 - Adenoma pedunculado e adenoma séssil	19
Figura 2 - Adenomas tubulares, vilosos e tubulovilosos	19
Figura 3 – Representação histopatológica de pólipos serreados.	21
Figura 4- Algoritmo Clínico do Rastreamento do CCR.....	26
Figura 5- Sequência adenoma - carcinoma.....	29
Figura 6 - Localização do gene APC no cromossoma 5.....	30
Figura 7- Via RAS- RAF-MEK-ERK	31
Figura 8- Via de Transdução de Sinal WNT/ β - catenina	34
Figura 9- Metilação da citosina pelas DNMTs.....	41
Figura 10 - Esquema simplificado do metabolismo do folato, que envolve a síntese e metilação do DNA	53
Figura 11 - Estruturas químicas da Citosina (A), Azacitidina (B) e Decitabina (C).....	59

Índice de Tabelas

Tabela 1- Indicadores de Mortalidade relativos a cancro do cólon, em Portugal (2010-2014) Taxas: por 100000 habitantes	16
Tabela 2 - Indicadores de Mortalidade relativos a cancro da junção retossigmóide e do reto, em Portugal (2010-2014). Taxas: por 100000 habitantes	17
Tabela 3- Fatores de risco do CCR.....	23
Tabela 4 – Marcadores de Microsatélites segundo o Instituto Nacional de Cancro dos EUA.....	36
Tabela 5 - Critérios de Amesterdão II.	38
Tabela 6 - Critérios de Bethesda.....	39

Lista de Abreviaturas

- 5- THF – 5-metilenotetrahidrofolato
- 5- FU – 5- Fluoruracilo
- 5-10-THF – 5-10-metilenotetrahidrofolato
- AML – Leucemia mielóide aguda (do inglês acute myeloid leukemia)
- APC – *Adenomatous polyposis coli*
- ASS – Adenoma serreado séssil
- AST – Adenoma serreado tradicional
- AXIN2 – *Axis inhibition protein 2*
- CCR – Carcinoma Cólon Retal
- CIMP – Fenótipo metilador das ilhas CpG (do inglês CpG island methylator phenotype)
- CIMP – L - Fenótipo metilador das ilhas CpG de baixo grau
- CIMP- H - Fenótipo metilador das ilhas CpG de alto grau
- CIN – Instabilidade cromossómica
- CK1 – *Casein Kinase 1*
- CMML – Leucemia mielóide crónica (do inglês chronic myelomonocytic leukemia)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês deoxyribonucleic acid)
- DNMTs – DNA metiltransferases
- DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica
- EGF – *Epidermal growth factor*
- EMA – *Europe Medicines Agency*
- ER α – Receptor de estrogénio humano
- FDA – *Us Food and Drug Administration*
- FIT – Teste imunoquímico das fezes
- GSK-3 – *Glycogen synthase kinase - 3 β*
- HATs – Histonas acetiltransferases

HDACs – Histonas deacetilases

HMTs – Histonas metiltransferases

HNPCC – Cancro cólon Retal hereditário não associado a polipose

IGF2 – *Insuline-like growth factor II*

KMT – Lisina metiltransferases

KRAS – *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LOH – Perda de heterozigotia (do inglês loss of heterozygosity)

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase*

MBDs – *Methyl- CpG binding domain protein*

MDS – Síndromes mielodisplásicas

MMR – *Mismatch repair*

MSI – Instabilidade de microssatélites

MSI -L – Instabilidade de microssatélites baixa

MSI- H – Instabilidade de microssatélites alta

MSS – Estabilidade de microssatélites

MTHFR – Metilenotetrahidrofolato redutase

MYOD – *Myogenic differentiation*

PAF – Polipose adenomatosa familiar

PH – Pólipo hiperplásico

PSOF – Pesquisa de sangue oculto nas fezes

RMT – Arginina metiltransferases

SAM - S- adenosilmetionina

SL – Síndrome de Lynch

TGFβ – *Transforming growth factor, beta*

TP53 – *Tumor protein p53*

TS – Dimetilato sintetase

Introdução

1. Cancro: Estado de arte

Os mecanismos associados ao cancro estão profundamente enraizados na nossa história evolutiva, existindo evidências paleontológicas que sugerem que o aparecimento de cancro no planeta é muito antecedente ao aparecimento da raça humana. Estudos realizados com fragmentos de ossos de dinossauros, oriundos do período Cretáceo, mostraram evidências da presença de cancro (Rothschild, Tanke, Helbing, & Martin, 2003). As primeiras evidências de cancro em humanos foram observadas em múmias Egípcias, datadas de 3000 a.C. e eram relativas a cancro da próstata (Kunjumoideen, 2014).

A palavra cancro tem origem do Grego *karkinos*, que significa caranguejo, e foi utilizada por Hipócrates para descrever carcinomas. Segundo Hipócrates, existiam quatro fluídos corporais, denominados por humores: o sangue, fleuma, a bÍlis amarela e a bÍlis negra. A acumulação da bÍlis negra foi apontada por este, como a causa do cancro (Weinberg, 2014).

Em 1830, com o aparecimento do microscópio, foi identificada a célula - unidade fundamental de todos os tecidos. Nessa altura, surgiu ainda, a teoria de que todas as células surgem da divisão de células preexistentes (Weinberg, 2014).

As células têm a capacidade de proliferar e participar na formação dos tecidos o que, por sua vez, torna possível a manutenção dos mesmos durante o tempo de vida do organismo. No entanto, a estrutura e as atividades básicas das células podem sofrer alterações. As células cancerígenas caracterizam-se por uma alteração no mecanismo de proliferação, existindo assim, uma divisão completamente descontrolada e desorganizada. Esta divisão contínua dá origem a tecidos com uma construção e manutenção anormal, a que chamamos tumores. À doença resultante da divisão anormal das células atribui-se a denominação de cancro (Harrington, 2015; Weingberg, 2014).

O estudo a nível histológico dos tecidos permitiu comparar tecidos constituídos de células cancerígenas e tecidos normais, verificando-se uma maior complexidade e organização nos tecidos normais. Este estudo é, ainda hoje, crucial para perceber qual a

origem do tumor primário e permite classificar o tumor, de acordo com o seu tamanho e agressividade, em benigno e maligno. A classificação em benigno é geralmente atribuída a tumores que não atingem tecidos vizinhos, ou seja, que não originam metástases. No entanto os tumores podem tornar-se malignos, sendo resistentes a terapia, espalhar-se (metastizar) e por vezes, desenvolverem-se novamente após remoção, tendo nestes casos a denominação de cancros (Seeley, Stephen, & Tate, 2001; Weingberg, 2014).

Os tumores podem ainda ser classificados de acordo com os seus tecidos de origem. A maioria dos tumores humanos tem origem nos tecidos epiteliais e quando malignos, são classificados como carcinomas. Dentro dos carcinomas, é ainda possível, distinguir dois tipos de cancros: os carcinomas das células escamosas e os adenocarcinomas. Os primeiros surgem, geralmente, associados as células epiteliais da pele ou queratinócitos enquanto que, os segundos, estão associados a células epiteliais com função secretória, presentes no epitélio de órgãos como o pulmão, cólon, mama, pâncreas, estômago, ovário, endométrio e próstata (Weingberg, 2014).

Os cancros com origem diferente dos tecidos epiteliais são, frequentemente, encontrados nos tecidos hematopoiéticos, conjuntivo ou em células constituintes do sistema nervoso central e periférico. O crescimento anormal e a danificação das células do sistema imunológico, presentes no tecido hematopoiético, origina leucemias - tumores malignos localizados nos eritrócitos- e linfomas - cancros nos linfócitos T e B. Nas células do tecido conjuntivo dá-se o nome de sarcomas (Seeley et al., 2001; Weingberg, 2014).

As causas dos vários tipos de cancros são complexas e variadas, incluindo na maioria das vezes fatores ambientais ou carcinogéneos (químicos, físicos (radiação) e biológicos (vírus)), que normalmente induzem alterações no DNA e mutações que se atingem a linha germinativa aumentam a suscetibilidade dos descendentes para desenvolver cancro mais tarde (Parsa, 2012).

O cancro pode ter consequências graves para a saúde e é definido como a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento (Jemal et al., 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o cancro do pulmão, próstata, cólon retal e estômago são os mais comuns no sexo masculino, enquanto que, o cancro da mama, cólon retal, colo do útero e estômago

surgem, maioritariamente, em mulheres. A probabilidade para desenvolver cancro baseia-se nas diferenças de exposição (por exemplo, ao tabaco), história médica e suscetibilidade genética de cada indivíduo. Estas características podem subestimar ou sobrestimar o risco individual (Siegel, Miller, & Jemal, 2016). Mais de 30% das mortes por cancro poderiam ser evitadas se existisse uma mudança no estilo de vida do indivíduo, evitando os principais fatores de risco, em especial o tabaco. Por outro lado, um diagnóstico precoce é considerado um fator determinante no tratamento da doença (Lieberman, 2012). O cancro pode ser diagnosticado mesmo antes de surgirem sintomas sugestivos do mesmo. O diagnóstico precoce é geralmente conseguido através de programas de rastreio ou através da vigilância de pessoas consideradas com alto risco para desenvolver cancro (Willie Hamilton, Walter, Rubin, & Neal, 2016). As taxas de sobrevivência associadas a esta doença, assim como a qualidade de vida do doente, podem melhorar significativamente quando existe um diagnóstico precoce e um tratamento eficaz. O tratamento vai depender do tipo de cancro e do estágio em que o mesmo foi diagnosticado (Zhou et al., 2016). Alguns doentes realizam apenas um tipo de tratamento, no entanto, a maioria necessita de vários tipos de tratamentos combinados, tais como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia (American Cancer Society, 2014).

Nesta tese, eu foco-me no Cancro Cólon Retal, fazendo uma revisão sobre a epidemiologia, etiologia e fatores de risco associados, debruçando-me, posteriormente, nos mecanismos moleculares associados à carcinogénese cólon retal e no papel que a metilação do DNA (fatores epigenéticos) apresenta no desenvolvimento desta doença, responsável pela morte de cerca de 3797 pessoas por ano, em Portugal (Forno, Poças, & Matos, 2012). Para tal, foi efetuada uma pesquisa bibliográfica no motor de busca Pubmed, utilizando os termos “Cancer”, “Colorectal”, “Methylation” e “Epigenetic”

Capítulo I

1. O Cancro Cólon Retal (CCR)

O Cancro Cólon Retal (CCR) tem como local de origem a primeira porção do intestino grosso, o cólon – ou a última parte, o reto. Desta forma, pode denominar-se apenas como cancro do cólon ou cancro do reto, caso o local onde se inicia seja o cólon ou o reto, respetivamente. No entanto, estes dois tipos de cancro são muitas vezes agrupados por apresentarem características muito semelhantes (American Cancer Society, 2014).

O CCR inicia-se, maioritariamente, com o crescimento de pólipos no revestimento epitelial do cólon ou do reto que se caracterizam por um crescimento saliente, ligado ao tecido subjacente. Os pólipos, não são cancerosos por si, no entanto, é possível que alguns tipos de pólipos apresentem potencial para se transformarem em cancro. Existem dois tipos principais de pólipos - os adenomas ou pré-malignos e os inflamatórios ou benignos. Os primeiros são aqueles que são apontados como pré-cancerosos, isto é, que tendem a evoluir para cancro e que são a causa mais comum deste tipo de cancro. Os pólipos inflamatórios, que são o tipo mais comum de pólipos, não apresentam normalmente potencial canceroso mas devem ser removidos cirurgicamente como modo de prevenção (Bardhan & Liu, 2013).

A carcinogénese, associada ao Cancro Cólon Retal, é resultado da acumulação de alterações genéticas e epigenéticas, que ocorrem nas células do epitélio do cólon (Abdelfatah, Kerner, Nanda, & Ahuja, 2016; Goel & Boland, 2012). As alterações genéticas correspondem a mutações/variações que ocorrem nas sequências de DNA que constituem os genes e, podem afetar diretamente a síntese das proteínas. Isto é, certas mutações/variações podem originar tripletos de nucleótidos que vão codificar aminoácidos diferentes do pressuposto, levando à produção de quantidades diferentes de proteína daquela que era suposto ser produzida ou resultando em proteínas mutantes com atividades funcionais alteradas. As mutações genéticas podem ter como origem fatores intrínsecos - erros de replicação, a extensão do gene, número de intrões, presença de sequências repetidas - que originam mutações espontâneas ou, fatores extrínsecos ou mutagénicos - agentes químicos e físicos. Estas podem dividir-se em mutações de substituição, inserção e deleção. De entre estes tipos, as mutações que

surgem, maioritariamente, associadas ao CCR correspondem a deleções, inserções, transversões e mutações missense e nonsense (Armaghany, Wilson, Chu, & Mills, 2012; Sameer, 2013).

Para além destas alterações/variações genéticas, a carcinogénese do CCR tem sido também associada a alterações epigenéticas, que não envolvem alterações na sequência do DNA. Alterações epigenéticas relacionadas com o desenvolvimento do CCR envolvem principalmente alterações na metilação do DNA e modificações das histonas e alteram os padrões de expressão génica (American Cancer Society, 2014; Goel & Boland, 2012; Lao & Grady, 2011).

1.1.Epidemiologia do CCR

O Cancro Cólon Retal é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, apresentando uma taxa de incidência de cerca de 9% de todos os casos de cancro. Este cancro foi classificado pela Organização Mundial da Saúde, em 2012, como o terceiro cancro mais frequente e o terceiro mais mortal a nível mundial; sendo ainda, o segundo cancro mais comum em mulheres e o terceiro em homens (Ferlay, Jacques.; Shin, Hai-Rim.; Bray, Freddie.; Forman, David.; Mathers, Colin.; Parkin, 2010; Jemal et al., 2011; Siegel et al., 2016).

As taxas de incidência observadas no CCR não são distribuídas de igual forma pelo Mundo, havendo uma grande diferença geográfica na sua distribuição global. Este tipo de cancro é característico dos países desenvolvidos, correspondendo os valores mais elevados de incidência aos países como Nova Zelândia, Austrália, países europeus e da América do Norte. Os valores mais baixos de incidência do CCR são encontrados em países em desenvolvimento, principalmente na África, América do Sul e Centro-Sul Asiático (Hagggar & Boushey, 2009; Jemal et al., 2011). A mortalidade associada ao CCR é aproximadamente metade da sua incidência e, estima-se que ocorrem cerca de 394000 mortes no Mundo, anualmente (Hagggar & Boushey, 2009). Segundo a *American Cancer Society*, é expectável que o CCR seja a causa de 49190 mortes nos EUA, durante o ano de 2016

A diferença que se observa na taxa de incidência entre países é resultado da etiologia multifatorial que caracteriza o CCR, e reflete as diferenças tanto culturais como económicas entre os países desenvolvidos e os países em desenvolvimento (Gonzalez, 2006; Potter, 1999).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos programas de rastreio que auxiliam na deteção e remoção de pólipos pré-cancerosos. Contudo, estes são apenas viáveis em países desenvolvidos, e nestes, têm contribuído para o decréscimo da taxa de incidência de CCR. Porém, estas iniciativas deveriam ser alargadas a todos as áreas que apresentem população de risco, isto é, uma população envelhecida e com estilo de vida ocidentalizado (Jemal et al., 2011).

Em Portugal, a taxa de incidência do cancro do cólon por cem mil habitantes, no ano de 2010, foi de 47,6 e para o cancro do reto de 22,7. Devido à inexistência de dados mais recentes, não é possível verificar se esta taxa aumentou ou diminuiu nos últimos seis anos. Segundo a Direção Geral da Saúde, os indicadores de mortalidade relativos ao cancro do cólon e da junção retossigmóide e reto, no ano de 2014, por cem mil habitantes, registam uma taxa de mortalidade de 25,8 e 10,3, respetivamente (Tabela 1 e 2) (Miranda & Portugal, 2016).

Tabela 1- Indicadores de Mortalidade relativos a cancro do cólon, em Portugal (2010-2014) Taxas: por 100000 habitantes (Miranda & Portugal, 2016).

Cancro do Cólon					
	2010	2011	2012	2013	2014
Ambos os sexos					
Número de óbitos	2647	2740	2686	2724	2687
Taxa de mortalidade	25,0	26,0	25,6	26,1	25,7
Taxa de mortalidade padronizada	15,4	15,5	14,9	15,0	14,5
Sexo Masculino					
Número de óbitos	1511	1500	1533	1560	1526
Taxa de mortalidade	29,9	29,8	30,6	31,4	30,9
Taxa de mortalidade padronizada	21,0	20,5	20,4	20,5	19,7
Sexo Feminino					
Número de óbitos	1136	1240	1153	1164	1161
Taxa de mortalidade	20,6	22,5	21,0	21,2	21,3
Taxa de mortalidade padronizada	11,2	11,8	11,0	11,1	10,7

Tabela 2 - Indicadores de Mortalidade relativos a cancro da junção retossigmóide e do reto, em Portugal (2010-2014). Taxas: por 100000 habitantes (Miranda & Portugal, 2016).

Cancro da junção retossigmóide e do reto					
	2010	2011	2012	2013	2014
Ambos os sexos					
Número de óbitos	1084	1051	1088	1079	1073
Taxa de mortalidade	10,3	10,0	10,4	10,3	10,3
Taxa de mortalidade padronizada	6,5	6,1	6,2	6,1	6,0
Sexo Masculino					
Número de óbitos	703	661	689	653	655
Taxa de mortalidade	13,9	13,1	13,7	13,1	13,3
Taxa de mortalidade padronizada	9,9	9,2	9,3	8,9	8,6
Sexo Feminino					
Número de óbitos	381	390	399	426	418
Taxa de mortalidade	6,9	7,1	7,3	7,8	7,7
Taxa de mortalidade padronizada	4,0	3,8	4,0	4,0	4,0

1.2.Etiologia

O Cancro Cólon Retal pode ser classificado, segundo a sua etiologia, em esporádico e hereditário. Os cancros esporádicos representam a maioria dos casos de CCR, nos quais, o desenvolvimento não está associado a qualquer predisposição hereditária. Os maiores fatores de risco no desenvolvimento deste tipo de CCR incluem: a idade, a dieta, o estilo de vida, fatores ambientais, mutações somáticas adquiridas e história prévia de adenoma maligno ou doença inflamatória do intestino. Os pacientes com CCRs esporádicos não apresentam fatores de risco genéticos ainda identificados (Giglia & Chu, 2016; Mundade, Imperiale, Prabhu, Loehrer, & Lu, 2014).

Contrariamente, os CCRs hereditários, tal como o nome indica, têm origem hereditária ou familiar e representam cerca de um terço do total dos Cancros Cólon Retal (Giglia & Chu, 2016). Este grupo de CCRs está associado a reconhecidas síndromes familiares, como por exemplo, a Síndrome de Lynch e a Síndrome Adenomatosa Familiar (FAP) que apresentam características clínicas e patológicas específicas e possuem mutações genéticas identificáveis. Porém, estas representam apenas 5% dos CCRs hereditários, sendo os restantes associados a famílias, onde a taxa de incidência de CCR está

aumentada mas que, no entanto, não existe um causa genética específica conhecida (Giglia & Chu, 2016).

1.3.Patofisiologia

O Cancro Cólon Retal resulta de uma sequência de alterações da mucosa normal do intestino grosso e tem maioritariamente início em lesões pré-cancerosas benignas, também designadas por pólipos pré-cancerosos ou adenomas. A prevalência dos pólipos adenomatosos, em indivíduos com idade superior a 60 anos, corresponde aproximadamente a 40%, no entanto, nem todos os pólipos do cólon e reto correspondem a adenomas, e mais de 90% dos adenomas não se desenvolvem em cancro (Conteduca, Sansonno, Russi, & Dammacco, 2013).

Os adenomas podem ser classificados endoscopicamente pelo seu tamanho, morfologia macroscópica e morfologia/organização microscópica (histologia), três importantes características que podem prever a malignidade do adenoma bem como orientar o médico na decisão do tratamento. Macroscopicamente os adenomas podem ser sésseis ou pedunculados (Figura 1). Os últimos representam protusões em forma de cogumelo na mucosa do cólon, suportadas por um pedículo (haste) de comprimento variável, enquanto que, os adenomas sésseis crescem num padrão mais achatado sobre a mucosa e com menor separação do epitélio adenomatoso. Histologicamente os adenomas sésseis ou pedunculados podem ser classificados em tubulares, vilosos ou tubulovilosos (Figura 2). Os adenomas tubulares, que representam a maioria dos adenomas, apresentam uma histologia tubular associada a glândulas de pequenos tamanhos e arredondadas, enquanto que, os adenomas vilosos caracterizam-se por longas áreas de arquitetura filamentosa (Simon, 2016). Os adenomas que apresentam características dos adenomas tubulares e dos adenomas vilosos são denominados tubovilosos (Gibson & Odze, 2016; Simon, 2016).

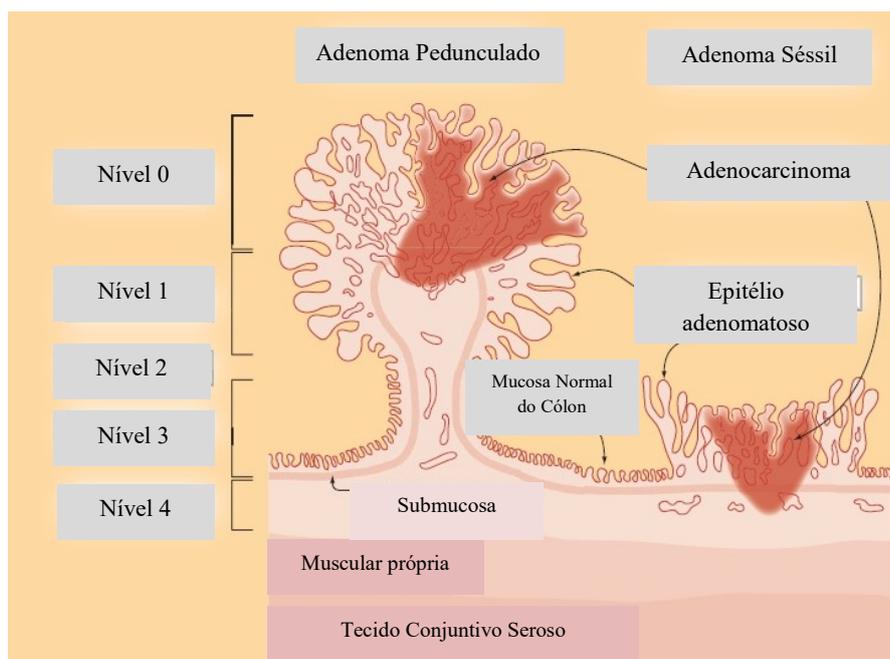


Figura 1 - Adenoma pedunculado e adenoma sésil

Os adenomas pedunculados surgem como protusões alongadas em forma de cogumelo na mucosa do cólon enquanto que, os adenomas sésseis apresentam uma forma mais achatada e mais próxima da mucosa do cólon (Adaptado de Soreide, Nedrebo, Reite, Thorse, & Korner, 2009).

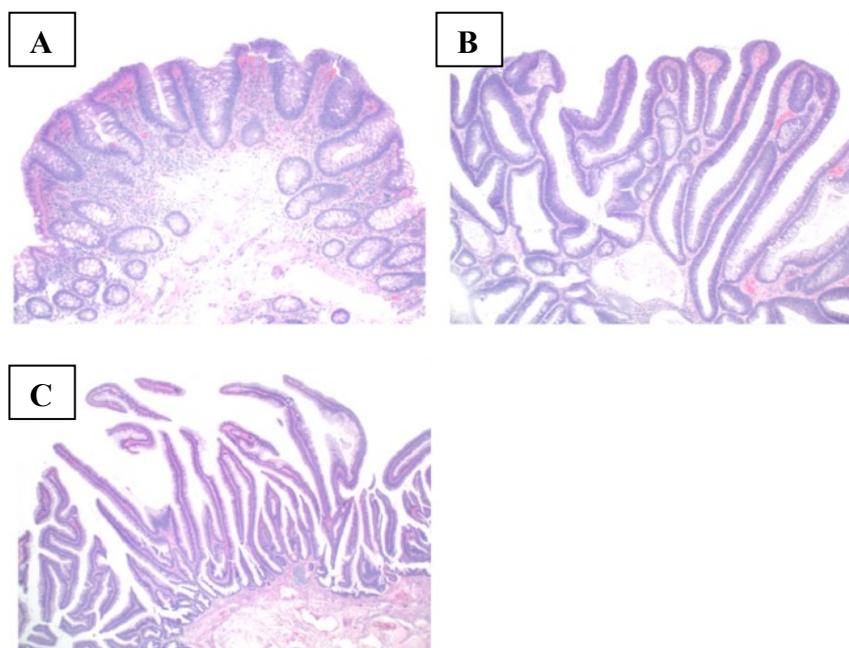


Figura 2 - Adenomas tubulares, vilosos e tubulovilosos

Os adenomas tubulares diferenciam-se pela sua histologia tubular (A) enquanto que, nos adenomas vilosos (C) observa-se, maioritariamente, uma arquitetura filamentosa. Os adenomas tubulovilosos (B) apresentam características dos adenomas tubulares e dos adenomas vilosos (Gibson & Odze, 2016)

Contudo, a definição daquilo que constitui os pólipos vilosos é variável e na prática, a Organização Mundial da Saúde recomenda a seguinte classificação: adenomas tubulares - apresentam 25% ou menos de vilosidades; adenomas vilosos - mais de 75% de vilosidades; adenomas tubulovilosos - 26 a 75% de vilosidades. A incidência de cancro nos diferentes tipos de adenomas é de 2-3% nos adenomas tubulares, 6-8% nos adenomas tubulovilosos e 10-18% nos adenomas vilosos (Konishi & Morson, 1982).

O tamanho dos adenomas é também um fator determinante nesta identificação e orientação clínica (Conteduca et al., 2013; Gibson & Odze, 2016; Simon, 2016). Assim, os tumores com dimensões superiores a dois centímetros são os que geralmente apresentam maior potencial para o desenvolvimento de cancro (Conteduca et al., 2013). Por outro lado, o tamanho do adenoma pode ser também associado à sua classificação histológica. Os adenomas inferiores a um centímetro, estão, muitas vezes, associados a adenomas tubulares, enquanto que, a presença de vilosidades é mais evidente em adenomas de maiores dimensões (Gibson & Odze, 2016). Os adenomas podem ainda ser classificados, pela displasia, em alto e baixo grau. A displasia é o termo que descreve o grau de desordem do pólipo/adenoma, comparativamente com o epitélio normal, o qual exhibe uniformidade no tamanho, forma e núcleo. Os adenomas que apresentam um alto grau de displasia são associados ao aumento da incidência do cancro (Gibson & Odze, 2016; Khatibzadeh et al., 2005).

Além dos adenomas, é ainda conhecido outro grupo de pólipos que podem conduzir ao desenvolvimento da carcinogénese cólon retal, os pólipos serrados. Este tipo de pólipos está associado ao desenvolvimento de cerca de 10-15% de todos os CCRs e, podem definir-se como um conjunto de lesões, cuja arquitetura das criptas é comparada com os dentes de uma serra (Azevedo, 2011; Conteduca et al., 2013). É possível distinguir três subgrupos de pólipos serrados: os pólipos hiperplásicos (PH), os adenomas serrados sésseis (P/ASS) e os adenomas serrados tradicionais (P/AST) (Figura 3). Os pólipos hiperplásicos (HP) correspondem a cerca de 80-90% de todas as lesões serradas e representam os pólipos mais inofensivos deste grupo. Estes apresentam, geralmente, dimensões reduzidas (<5mm) e a sua maioria, tem origem no cólon distal (Yamane et al., 2014). Os HP caracterizam-se por criptas alongadas, com arquitetura serrada na metade superior das mesmas e uma zona proliferativa na parte inferior (Azevedo, 2011) Os adenomas serrados sésseis (P/ASS), representam 10-25% dos pólipos serrados e, ao contrário dos HP, surgem, maioritariamente, no cólon

proximal (Yamane et al., 2014). A identificação dos P/ASS é feita através da observação de criptas com a base dilatada, ramificadas e com serreação mais evidente nos alongamentos das mesmas (Azevedo, 2011; East, Vieth, & Rex, 2015; Yamane et al., 2014). Por último, os adenomas serreados tradicionais (P/AST), correspondem a uma percentagem mínima de todos os pólipos serreados e caracterizam-se pela presença de criptas ectópicas, resultando num padrão de crescimento complexo, por possuírem um citoplasma eosinófilo e estratificação nuclear (Azevedo, 2011; East et al., 2015).

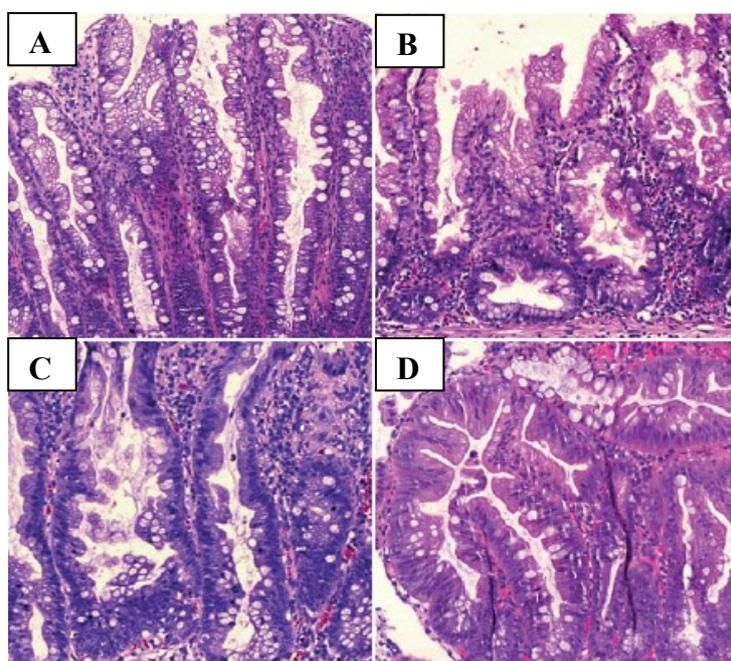


Figura 3 – Representação histopatológica de pólipos serreados.

É possível distinguir três subgrupos de pólipos serreados: os pólipos hiperplásicos (A), os adenomas serreados sésseis (B) e os adenomas serreados tradicionais (D). Em C podemos observar um adenoma serreado sésstil com displasia (Ijspeert, Vermeulen, Meijer, & Dekker, 2015).

1.4. Fatores de Risco

O termo fator de risco, em oncologia, é apontado a qualquer atributo, característica ou exposição que aumente a probabilidade de um indivíduo para desenvolver cancro (Hamoya et al., 2016).

O risco de desenvolvimento de Cancro Cólon Retal está, maioritariamente, dependente de fatores de risco não modificáveis. No entanto, existe uma percentagem com particular interesse, que está associada a fatores modificáveis e, é estimado que cerca de 66-75 % dos CCRs poderiam ser evitados através da modificação do estilo de vida (Binefa, Rodríguez-moranta, Teule, & Medina-hayas, 2014; Hamoya et al., 2016; Kolligs, 2016). Os fatores de risco modificáveis que estão, até à data, associados com o desenvolvimento do CCR estão, maioritariamente, relacionados com a dieta, o sedentarismo, a ingestão excessiva de álcool e o tabagismo (Tabela 3) (Binefa et al., 2014; Gonzalez, 2006; Hamoya et al., 2016).

O CCR é uma doença associada a países industrializados e, em especial, a indivíduos com dietas ricas em gorduras e pobres em fibras, frutas e vegetais. A literatura publicada sugere que todo o tipo de gordura, satura e insaturada, tem potencial para aumentar o risco associado ao desenvolvimento deste cancro. Existem também evidências que sugerem uma associação entre o consumo de carnes vermelhas e o CCR. Denomina-se como carne vermelha, a carne muscular de mamíferos como o bovino, porco, cordeiro, carneiro e cavalo (Boada, Luzardo, & Henríquez-Hernández, 2016). Um estudo da saúde das enfermeiras concluiu que, mulheres que faziam uma dieta à base de carnes vermelhas apresentavam um risco de desenvolver CCR superior, comparativamente com as mulheres que raramente consumiam estas carnes. O mesmo foi verificado para homens que consumiam este tipo de carne, cinco ou mais vezes por semana, em comparação com homens que apenas comiam carnes vermelhas uma vez por mês (Potter, 1999). Mais recentemente, também o consumo de carnes processadas foi apontado como um fator de risco para o desenvolvimento de CCR. Estas referem-se a toda a carne que tenha sido transformada por secagem, fermentação, fumo, salga, ou outro processo, de forma a realçar o seu sabor e melhorar a preservação e geralmente incluem carnes vermelhas (Boada et al., 2016). O processamento das carnes vermelhas, através de processos que atingem temperaturas elevadas, tais como cozer, fritar ou grelhar, provoca a degradação de aminoácidos e da creatinina presente no músculo, resultando na formação de certos compostos, incluindo as amins heterocíclicas, que são mutagénicas e cancerígenas (Durko & Malecka-panas, 2014). Vários estudos publicados até à data sugerem que um consumo diário de cem gramas de carne vermelha, ou cinquenta gramas de carne processada, aumenta o risco de desenvolver CCR em aproximadamente 18% (Boada et al., 2016; Durko & Malecka-panas, 2014).

Os baixos níveis de atividade física assim como a obesidade também têm sido associados a um aumento do risco de CCR. Indivíduos que durante muitos anos da sua vida realizaram atividades físicas, parecem apresentar um menor risco de CCR, comparativamente com aqueles que levaram uma vida sedentária (Potter, 1999). Uma meta-análise conduzida por Wolin et al indica que, indivíduos fisicamente ativos têm uma redução de 24% no risco de desenvolver CCR (Wolin, Yan, Colditz, & Lee, 2009). O tabagismo e o elevado consumo de álcool são também sugeridos como potenciais indutores do desenvolvimento de CCR e o mecanismo pelo qual estes atuam na carcinogénese é descrito mais à frente.

Apesar de serem alguns os fatores de risco potencialmente modificáveis, e de esta modificação conduzir a uma elevada percentagem de redução do risco de CCR, os fatores de risco não modificáveis têm um papel importante no desenvolvimento desta neoplasia. De entre os fatores não modificáveis, é de destacar o aumento da idade, com a justificação de que, mais de metade dos CCRs são diagnosticados após os setenta anos. Além do fator idade, podemos ainda referir como fatores de risco não modificáveis, a história familiar de CCR, a predisposição genética em indivíduos com síndromes hereditárias do CCR (por exemplo, a Síndrome de Lynch e a Síndrome Adenomatosa Familiar), a doença inflamatória do intestino, diabetes tipo II e hipertrigliceridémia (Tabela 3) (Hamoya et al., 2016).

Tabela 3- Fatores de risco do CCR

Fatores de risco não modificáveis	Fatores de risco modificáveis
Envelhecimento (>50 anos)	Dieta rica em gorduras
História familiar de CCR	Dieta pobre em fruta, fibras e vegetais
Síndrome FAP	Carnes vermelhas / Carnes processadas
Síndrome de Lynch	Sedentarismo
Doença Inflamatória do Intestino	Obesidade
Diabetes tipo II	Tabagismo
Hipertrigliceridémia	Elevado consumo de álcool

1.5.Sintomatologia

O Cancro Cólon Retal como a maioria dos cancros não apresenta sintomas detetáveis na sua fase inicial (John, George, Primrose, & Fozard, 2010), sendo que os sintomas surgem principalmente em estádios mais avançados da doença, estando dependentes da localização e do tamanho do tumor (Labianca et al., 2013). O sintoma mais comum e precoce no desenvolvimento do CCR, é a perda de sangue pelo ânus ou, o seu aparecimento nas fezes precoce (John et al., 2010). Outros sintomas referidos pelos doentes incluem anemia, dor abdominal persistente, perda de peso sem causa associada, anorexia, constipação, cansaço, náuseas e vômitos e alterações dos hábitos intestinais como diarreia, obstipação e mudanças na consistência das fezes (Fletcher, 2009; W Hamilton, Round, Sharp, & Peters, 2005).

1.6. Métodos de rastreio e diagnóstico

O rastreio, no âmbito da doença oncológica, define-se como uma estratégia de prevenção secundária e, consiste num conjunto de atividades que são orientadas com o objetivo de detetar uma condição pré-cancerosa numa população aparentemente saudável, bem como, a deteção da doença em estádios recentes, potencialmente curáveis (Labianca et al., 2013).

O prognóstico do Cancro Cólon Retal, à semelhança de outros cancros, está intimamente relacionado com o estágio da doença no momento do diagnóstico inicial, verificando-se que quanto mais precoce for diagnosticado o adenoma, menor será a taxa de mortalidade relacionada com o CCR (George, 2014).

O diagnóstico precoce passa pela realização de programas organizados de rastreio e de vigilância e compreende a confirmação da existência ou não da doença. Os programas de rastreio são indicados para identificar indivíduos assintomáticos cujo risco de desenvolverem CCR é significativo, sendo que, a estratificação dos pacientes de acordo com o risco associado à carcinogénese cólon retal é uma estratégia chave para o diagnóstico precoce. Deste modo, podemos distinguir dois tipos de risco: risco médio e risco elevado. O risco médio é atribuído aos pacientes assintomáticos com idade igual ou superior a 50 anos, sem história familiar de CCR. O risco elevado atribui-se a

pacientes com história familiar associada, ou seja, com um ou mais familiares de primeiro grau com CCR, a pacientes com síndromes hereditárias tais como, a Síndrome de Lynch e a Síndrome de FAP e ainda a pacientes com doença inflamatória intestinal (Lieberman, 2012). Segundo a norma 003/ 2014 da Direção Geral da Saúde, devem ser incluídos no rastreio os utentes assintomáticos, com idades compreendidas entre os 50 e os 74 anos. Depois desta idade, o rastreio deve ser descontinuado dado as crescentes cormobilidades que se verificam nesta população (Labianca et al., 2013).

Atualmente, o rastreio do Cancro Cólon Retal faz-se principalmente através de três métodos: a pesquisa de sangue oculto nas fezes (PSOF), a sigmoidoscopia flexível e a colonoscopia (Kolligs, 2016; Labianca et al., 2013; Lieberman, 2012).

Os pólipos ou as lesões associadas ao CCR podem resultar em sangramento que, pode ser detetado nas fezes muito antes de aparecem sintomas relacionados com a patologia. Desta forma, a PSOF é o método de rastreio mais utilizado, a partir do qual são identificadas pessoas com um maior risco de desenvolver CCR e, posteriormente, encaminhadas para a realização de uma colonoscopia (Benton, Seaman, & Halloran, 2015). A PSOF é um método não invasivo, que deve ser realizado em homens e mulheres, com idades compreendidas entre os 50 e os 70 anos e que utiliza um papel reativo impregnado numa resina de guaiaque que muda de cor quando oxidado por peroxidases ou atividade da heme peroxidase (Hebden, Donnelly, & Ricketts , 2009). Este método permite a redução da mortalidade por CCR em 15 % e o benefício parece ser maior quando o teste é repetido anualmente ou, pelo menos, de dois em dois anos (Kolligs, 2016; Labianca et al., 2013)

No entanto, a PSOF apresenta algumas limitações, principalmente devido a falsos-positivos que resultam da baixa sensibilidade na pesquisa de adenomas e da ingestão de carne vermelha crua, vegetais e fruta que contenham peroxidase (por exemplo, brócolos, couve-flor e nabo) assim como a ingestão de aspirina e anti-inflamatórios não esteróides, nos três dias antecedentes à realização do teste (Hebden, Donnelly, & Ricketts , 2009). Recentemente, um teste imunoquímico das fezes (FIT) tem sido estudado como alternativa à PSOF. À semelhança da PSOF, este método também procura vestígios de sangue, porém, recorrendo a técnicas imunoquímicas (Hebden, Donnelly, & Ricketts , 2009). O FIT pesquisa especificamente a hemoglobina humana, uma proteína presente nos eritrócitos, sendo por isso, um teste mais específico que a

PSOF e menos suscetível de ser confundido com determinados alimentos (Benton et al., 2015). No entanto, o resultado positivo quer da PSOF quer do FIT, deve ser seguido de uma colonoscopia (Figura 4) para confirmar o diagnóstico (Kolligs, 2016; Labianca et al., 2013; Lieberman, 2012; Segman, Patnick, & von Karsa, 2010)

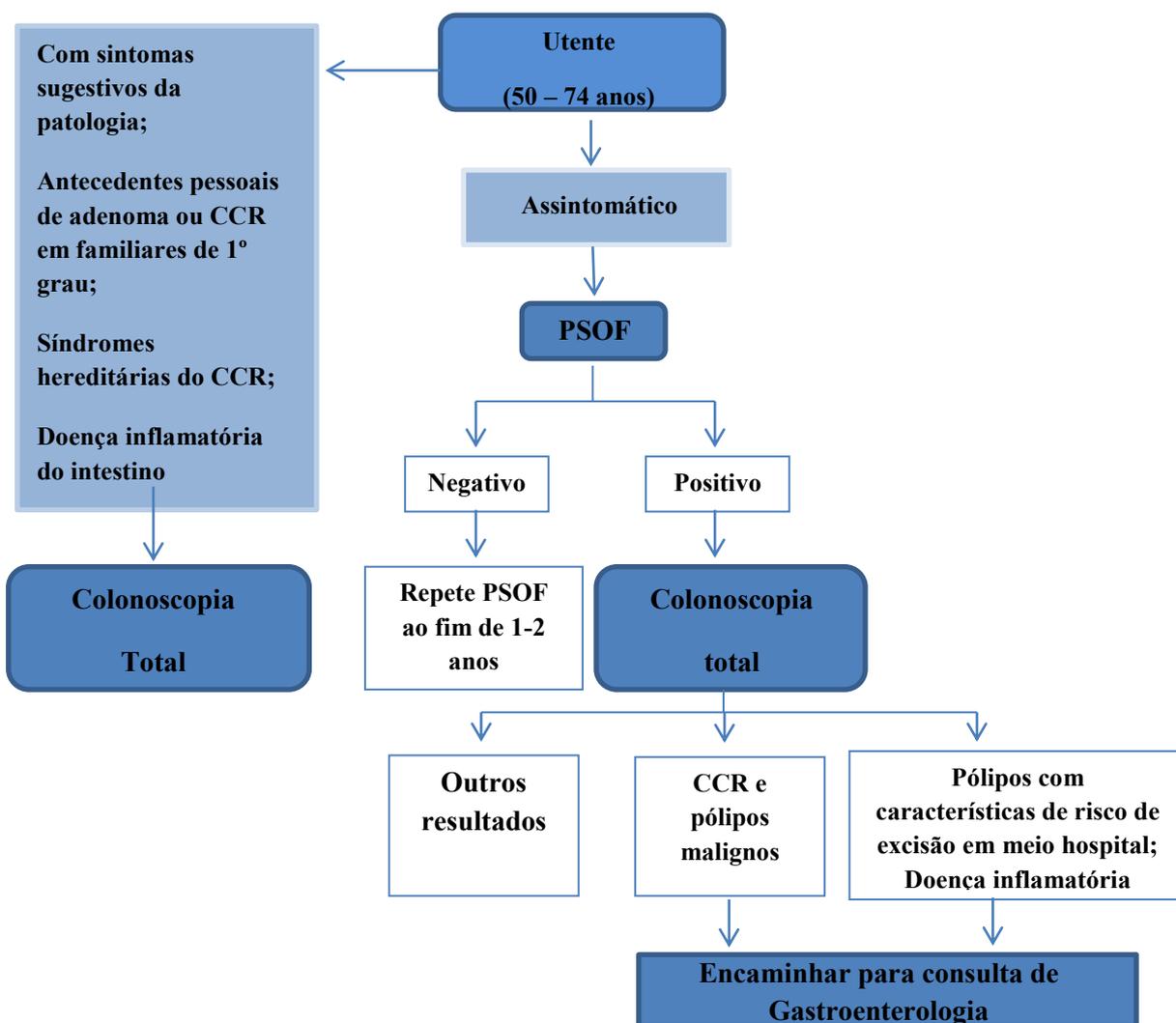


Figura 4- Algoritmo Clínico do Rastreio do CCR.

O rastreio inicia-se em utentes na faixa etária de 50-74 anos. Deste grupo, são excluídos utentes com sintomas sugestivos da patologia, com história familiar de adenoma ou CCR, com síndromes hereditárias do CCR e ainda, com doença inflamatória intestinal. Estes são submetidos, de imediato à realização da colonoscopia total. Os restantes realizam a pesquisa de sangue oculto nas fezes e, em caso de resultado positivo, realizam a colonoscopia total. Legenda: PSOF - pesquisa de sangue oculto nas fezes. Norma 003/2014, Direção Geral da Saúde (George, 2014)

A sigmoidoscopia flexível e a colonoscopia podem definir-se como métodos endoscópicos. Estes são os principais métodos na realização e confirmação do diagnóstico de CCR, com preferência para a colonoscopia. O procedimento associado à endoscopia tem como base a inserção de um tubo flexível no ânus do paciente, com o intuito de inspecionar o cólon e o reto. Este método permite, detetar anomalias e remove-las num único procedimento. Na sigmoidoscopia flexível, apenas metade do cólon é observado, enquanto que na colonoscopia, geralmente observa-se o cólon por completo (Segman et al., 2010).

A sigmoidoscopia flexível permite detetar pólipos e CCRs, ressecar pólipos e retirar amostras para exame histológico, a partir de um endoscópio flexível de sessenta centímetros. Este é um exame mais simples que a colonoscopia, podendo causar algum desconforto mas não dor (Hebden, Donnelly, & Ricketts, 2009). Segundo as Guidelines Europeias de 2012, uma única realização da sigmoidoscopia flexível é capaz de reduzir a incidência do CCR em 23-80% e a mortalidade em 31-50%. A faixa etária preferível para realização deste método está compreendida no intervalo dos 55 aos 64 anos (Labianca et al., 2013). O benefício associado à sigmoidoscopia está limitado ao cólon distal, não existindo evidências da redução da incidência e mortalidade por CCR associado cólon proximal (Lieberman, 2012). Os estudos disponíveis sugerem que o intervalo óptimo para rastreio com este método não deve ser inferior a dez anos, podendo mesmo ser alargado até aos vinte anos (Labianca et al., 2013; Segman et al., 2010).

Após resultado positivo da PSOF ou da sigmoidoscopia flexível, é essencial a realização de uma colonoscopia de modo a confirmar o pré-diagnóstico da PSOF ou verificar a existência de mais adenomas não detetados na sigmoidoscopia flexível (Figura 4). Este é considerado o exame de eleição na avaliação do cólon e permite a polipectomia bem como, a realização de biópsias em todo o cólon (Hebden, Donnelly, & Ricketts, 2009). A colonoscopia é um método invasivo e caro, cuja realização requer utilizadores especializados, apresentando uma elevada sensibilidade ($\approx 95\%$) e especificidade na deteção de adenomas e cancro (Hebden, Donnelly, & Ricketts, 2009). No entanto, a eficácia deste método de diagnóstico na redução da incidência e mortalidade associada ao CCR é limitada, devido principalmente à falta de estudos de acompanhamento dos doentes após colonoscopia. Para além disto, estudos recentes sugerem que, este método, não é tão eficiente no cólon proximal (Labianca et al., 2013; Segman et al., 2010). De

acordo com as Guidelines Europeias, a colonoscopia não deve ser realizada em indivíduos com menos de 50 anos, uma vez que, a prevalência de CCR nesta faixa etária não justifica esta intervenção e deve ser descontinuada em indivíduos com mais de 74 anos. O intervalo óptimo para rastreio por colonoscopia, à semelhança da sigmoidoscopia, não deve ser inferior a dez anos, podendo estender-se até aos vinte anos (Labianca et al., 2013).

Os indivíduos de risco elevado, não são incluídos no rastreio, devendo ser submetidos a uma colonoscopia total, assim como os que apresentam sintomas sugestivos da existência de Cancro Cólon Retal, tais como anemia, perda de peso e sangramento retal permanente (Figura 4). Para estes indivíduos, a colonoscopia é utilizada como um método de vigilância, sendo a idade ideal para realização da primeira colonoscopia e o intervalo de rastreio diferentes do descrito anteriormente e dependente da condição pela qual o risco elevado foi atribuído (Hebden, Donnelly, & Rickets, 2009; Gorge, 2014).

No entanto, a biópsia, realizada a partir da análise microscópica de uma amostra do tumor, recolhida durante a colonoscopia, é a única análise que permite saber se a lesão detetada é benigna ou maligna (Strum, 2016).

Capítulo II

2. Mecanismos moleculares associados à carcinogénese do Cancro Cólon Retal

O Cancro Cólon Retal é um tipo de cancro heterogéneo, apresentando perfis moleculares e vias de sinalização complexas e características clinico-patológicas e vias de progressão muito variáveis (Zambirinis, Theodoropoulos, & Gazouli, 2009).

A identificação e compreensão das causas genéticas e vias moleculares que resultam na carcinogénese do Cancro Cólon Retal têm vindo a aumentar nos últimos anos. Atualmente consideram-se três principais vias que conduzem à carcinogénese do CCR, nomeadamente, a instabilidade cromossómica (CIN), a instabilidade de microssatélites (MSI) e o fenótipo metilador das ilhas CpG (CIMP), também conhecido como instabilidade epigenética (Azevedo, 2011; Pino & Chung, 2010).

2.1. Via de instabilidade cromossômica

A via de instabilidade cromossômica (CIN), também denominada por sequência adenoma-carcinoma ou via supressora, foi descrita pela primeira vez, em 1990, por Fearon e Vogelstein. Segundo estes autores, o desenvolvimento de CCR, através desta via, tem como base uma acumulação gradual de alterações genéticas e epigenéticas, que vão desde a ativação de proto-oncogenes à inativação de vários genes supressores do tumor, responsáveis por regular o crescimento e a diferenciação celular (Figura 5).

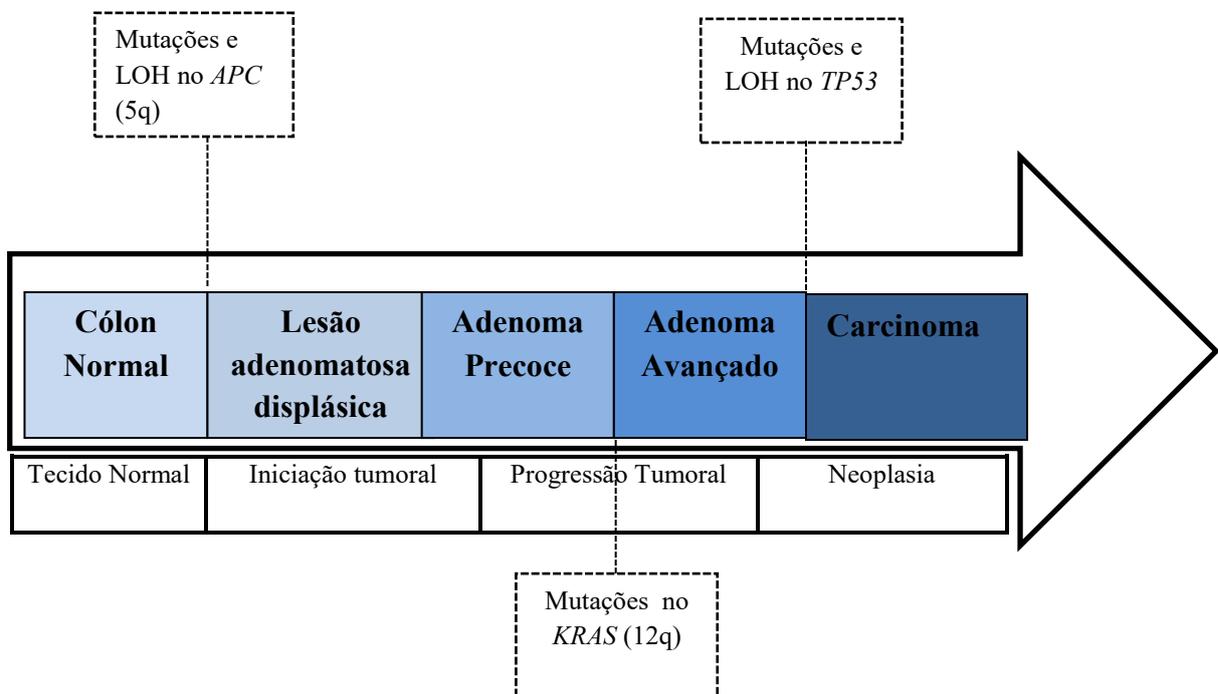


Figura 5- Sequência adenoma - carcinoma

Mutações no gene *APC* conduzem à formação de um adenoma a partir da mucosa cólica normal, iniciando deste modo a tumorigênese e, em seguida, ocorrem mutações no oncogene *KRAS*, responsáveis pela progressão do adenoma. Simultaneamente verificam-se outras mutações genéticas, tais como a perda da heterozigotia (LOH), que vão também contribuir para a progressão e transformação maligna do adenoma. Por último, a transição do adenoma avançado para carcinoma é mediada pela inativação do gene supressor de tumor *TP53*. Legenda: *APC* – *Adenomatous polyposis coli*, *LOH*- perda de heterozigotia, *KRAS*- *V-ki-Ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*, *TP53*- tumor protein p53 (Adaptado de Fearon & Vogelstein, 1990).

Os oncogenes são formas mutadas de genes normais denominados proto-oncogenes e são responsáveis por estimular o aumento da proliferação de células anormais através de fatores de crescimento, recetores e proteínas envolvidas na transdução de sinal (Weingberg, 2014). Os genes supressores de tumor codificam proteínas cuja função é inibir os mecanismos que conduzem à divisão e proliferação celular quando são detetadas anomalias, prevenindo a transformação maligna das células e quando mutados, podem conduzir ao desenvolvimento de cancro (Harrington, 2015; Weingberg, 2014).

Estima-se que a via CIN seja responsável por cerca de 70 a 85% dos casos de Cancro Cólon Retal (Armaghany et al., 2012; Bardhan & Liu, 2013).

A nível histológico, a sequência adenoma-carcinoma, inicia-se ao nível das células epiteliais do intestino, com uma hiperplasia da mucosa que progride, posteriormente, para adenoma de baixo grau de displasia, iniciando-se deste modo a tumorigénese (Shiller & Boostrom, 2015).

Geneticamente, a inativação do gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*) assume-se como a primeira etapa da transformação mucosa normal- adenoma precoce. Este gene, localizado no braço longo do cromossoma 5 na posição 22.2 (5q22.2) (Figura 6) atua como um gene supressor tumoral codificando para uma proteína que regula a diferenciação, adesão, polaridade celular, migração, desenvolvimento, apoptose celular e segregação dos cromossomas (Genetics Home Reference, 2016; Pino & Chung, 2010).

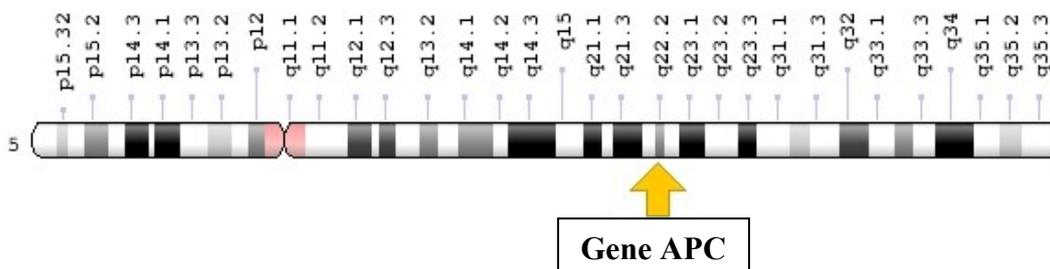


Figura 6 - Localização do gene APC no cromossoma 5 (Genetics Home Reference, 2016)

Enquanto proteína supressora de tumor, a sua principal função compreende a regulação dos níveis intracelulares da β -catenina, na via de transdução de sinal Wnt/ β -catenina (Lao & Grady, 2011; Pino & Chung, 2010).

A fase seguinte na sequência adenoma-carcinoma compreende a transformação do adenoma precoce a adenoma avançado. Esta fase caracteriza-se pela ocorrência de mutações no oncogene *KRAS*. Este gene encontra-se mutado em cerca de 30-50% de todos os CCRs (Pino & Chung, 2010).

O proto-oncogene *KRAS* localiza-se no braço curto do cromossoma 12 na posição 12.1 (12p12.1) codificando uma proteína da família da proteína RAF, juntamente com a ARAF e RAF1 (Pino & Chung, 2010). Estas proteínas intervêm, na transdução do sinal da via de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK (*mitogen-activated protein/extracellular signal - regulated kinase - extracellular signal - regulated kinase*), também denominada por MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (Figura 7) (Lao & Grady, 2011; Palomba et al., 2016).

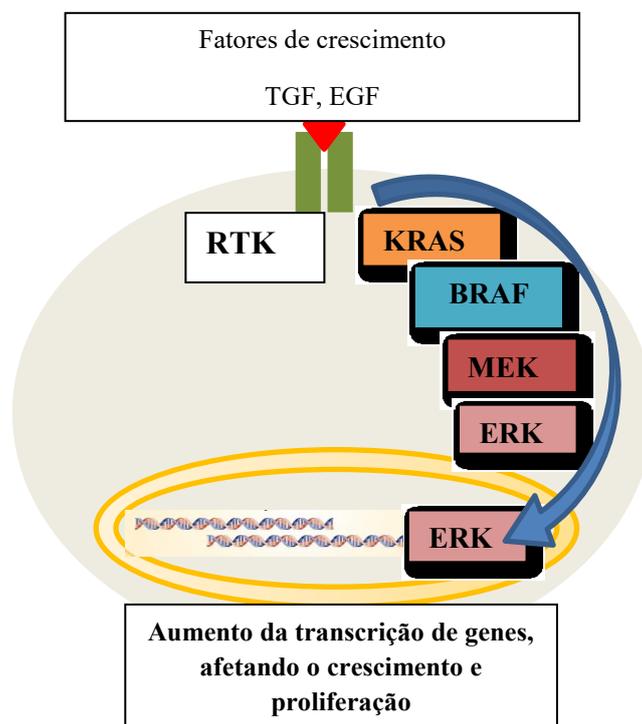


Figura 7- Via RAS- RAF-MEK-ERK

As proteínas BRAF e KRAS, a partir de estímulos externos, medeiam a transdução do sinal da via de sinalização MAPK. Quando a via está ativa, a ERK, é transferida para o núcleo da célula onde vai ativar os fatores de transcrição e, conseqüentemente, alterar a expressão dos genes responsáveis pelo

crescimento e proliferação celular. Legenda: TGT – *Transformin growth factor beta*, EGF- *Epidermal growth factor*, RTK- *Receptor of tyrosine kinase*, KRAS- *V-ki-Ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*, BRAF – *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1* (Adaptado de Leggett & Whitehall, 2010).

A via de sinalização MAPK é ativada pela ligação de fatores de crescimento, tal como o EGF (*epidermal growth factor*) e o TGF β (*Transforming growth factor beta*), intervindo em processos celulares essenciais como a proliferação, diferenciação, migração, regulação da expressão génica e a apoptose (Figura 7) (Bardhan & Liu, 2013; Leggett & Whitehall, 2010; Pino & Chung, 2010).

Outra forma de ativação desta via ocorre devido a mutações no oncogene *KRAS*, levando à ativação permanente da via e, por consequente, ao aumento da proliferação celular, contribuindo para o desenvolvimento do carcinoma (Palomba et al., 2016).

Apesar da sua importância, as mutações no oncogene *KRAS* não são suficientes por si só para o desenvolvimento do carcinoma. A transformação, de adenoma avançado a carcinoma, é consequência da inativação do gene supressor tumoral *TP53* (Shiller & Boostrom, 2015).

O gene *TP53* localiza-se no braço curto do cromossoma 17 na posição 13.1 (17p13.1) e codifica uma proteína designada por p53 (Arvelo, Sojo, & Cotte, 2015). Esta atua como um fator de transcrição, cuja função é controlar os genes envolvidos no mecanismo de reparação do DNA e regular a divisão celular, impedindo que as células se dividam de forma descontrolada e levando a diferentes respostas celulares antiproliferativas. Quando o DNA de uma célula é danificado, por exposição a radiação UV, produtos químicos, etc, a p53 desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase da célula (Naccarati et al., 2012). Os danos no DNA funcionam como um sinal para a ativação desta proteína que, mediante o tipo de dano, pode induzir três respostas distintas. No caso de o DNA poder ser reparado, a p53 vai induzir um bloqueio transitório do ciclo celular, através da transcrição de genes efetores, fornecendo o tempo suficiente para a reparação. Por vezes, quando o dano no DNA é muito extenso e a reparação não é possível, a proteína p53 induz a senescência celular ou a apoptose. A senescência celular define-se como uma paragem permanente do ciclo celular e é um mecanismo muito útil na prevenção do desenvolvimento da carcinogénese (Rossi,

Daniele, Melino, & Annicchiarico, 2015). A apoptose consiste numa série de alterações celulares que levam à autodestruição das células, desencadeada por uma variedade de estímulos e envolve a ativação de enzimas caspases, resultando na fragmentação rápida de uma célula e na fagocitose de fragmentos resultantes da célula pelas células vizinhas (Weingberg, 2014).

Deste modo, ao evitar a divisão celular de uma célula, em que o DNA foi danificado, a p53 desempenha um papel preventivo evitando o desenvolvimento do cancro. Quando ocorre a inativação do gene *TP53*, a proteína p53 deixa de exercer a sua função, resultando na transição de grandes adenomas em carcinomas invasivos (Markowitz & Bertagnolli, 2009; Pino & Chung, 2010).

2.1.1. Via de Transdução de Sinal WNT/ β -catenina

A via de transdução de sinal WNT/ β -catenina está associada à proliferação e diferenciação celular, envolvendo proteínas e genes que regulam estes processos, bem como os processos de apoptose e estabilidade genética (Centelles, 2012; Markowitz & Bertagnolli, 2009).

Na ausência do ligando WNT, a β -catenina citoplasmática é constantemente degradada pelo complexo de degradação formado pelas proteínas AXIN, a proteína supressora de tumores APC (*adenomatous polyposis coli*), GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) e CK1 (*casein kinase 1*). A formação deste complexo induz a fosforilação da β -catenina pelas proteínas GSK-3 β e CK1 que é posteriormente reconhecida pela ubiquitina, e marcada para degradação pelo proteossoma. Esta eliminação contínua da β -catenina vai impedir a sua transferência para o núcleo e, por consequente, a transcrição de genes alvo da WNT (Figura 8, lado esquerdo). A ativação desta via é iniciada pela ligação da proteína WNT a um receptor transmembranar da família da proteína *Frizzled (FZD)* e ao seu coreceptor, a lipoproteína de baixa densidade 5 ou 6 (LRP5/6). A formação deste complexo WNT-FZ-LPR6 juntamente com o recrutamento da proteína Dishevelled (Dsh) pela FZD resulta na fosforilação do coreceptor LRP5/6 e no recrutamento da proteína AXIN para os receptores, impedindo a formação do complexo de destruição e consequentemente, a fosforilação da β -catenina pelas proteínas GSK-3 β e CK1. Isto

permite que β -catenina se acumule no núcleo, induzindo uma resposta celular através da ativação dos fatores de transcrição LEF/TCF (*lymphocyte enhancer binding factor/T-cell factor*) (Figura 8, lado direito) (Centelles, 2012; Farahmand, Daevishi, Majidzadeh-A, & Madjid Ansari, 2016; Macdonald, Tamai, & He, 2009).

Quando o gene *APC* está mutado, o complexo de degradação é igualmente afetado, impedindo a degradação da β -catenina pelo proteossoma e, como consequência, ocorre a sua acumulação ao nível do citoplasma (Arvelo et al., 2015). Esta acumulação de β -catenina no citoplasma leva, por sua vez, a um aumento da translocação desta proteína para o núcleo, onde se vai ligar às proteínas LEF/TCF que funcionam como fatores de transcrição de genes implicados no crescimento tumoral (Centelles, 2012; Markowitz & Bertagnolli, 2009).

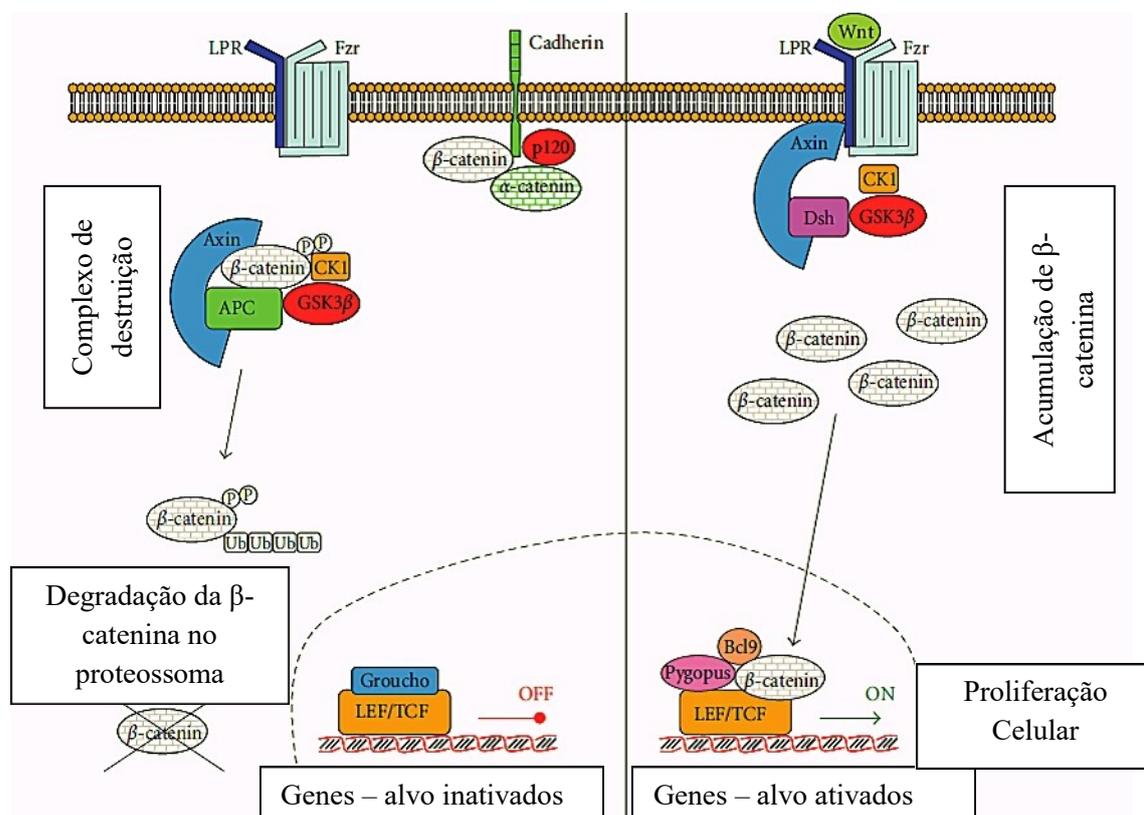


Figura 8- Via de Transdução de Sinal WNT/ β - catenina

A via de transdução de sinal WNT/ β -Catenina pode apresentar dois estados distintos: o estado inativo ou OFF (representado do lado esquerdo) e o estado ativo ou ON (representado do lado direito). Na ausência do sinal WNT, o complexo de destruição induz a fosforilação da β -catenina que é posteriormente reconhecida pela ubiquina e, por fim, degradada no proteossoma. Quando o sinal está ativo, não ocorre a fosforilação da β -catenina e consequentemente não ocorre a sua destruição. A β -catenina é transferida para o núcleo e ativa a transcrição dos genes (Adaptado de Centelles, 2012).

2.2. Via de Instabilidade de Microssatélites

A instabilidade de microssatélites (MSI) pode definir-se como um fenótipo hipermutável que resulta de mutações na linha germinal em genes responsáveis pela reparação do DNA, *mismatch repair (MMR)*. Estes genes, que atuam de modo a manter a estabilidade genética, são parte integrante dos mecanismos de reparação de DNA e, têm como função reparar o DNA de erros de emparelhamento dos nucleótidos que podem ocorrer durante a replicação do DNA (Zhang, Lv, Gong, Yu, & Chen, 2016). Este mecanismo de reparação inclui cinco proteínas, a MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 e PMS2, que formam um complexo que se liga à região do DNA danificado, excisando os erros e inserindo a sequência correta de nucleótidos no local da região danificada (Zambirinis et al., 2009).

Os microssatélites são sequências curtas e repetitivas, distribuídos ao longo de todo o genoma, particularmente propensos a erros na replicação, e de estrutura polimórfica. Contudo, dentro de cada tecido do indivíduo, são únicos e uniformes (Boland & Goel, 2010; Lee, Murphy, Le, & Diaz, 2016; Pawlik, Raut, & Rodriguez-Bigas, 2004; Zambirinis et al., 2009).

Durante a replicação do DNA, a DNA polimerase pode cometer erros que têm, geralmente, maior incidência em regiões de sequências repetitivas, como os microssatélites. As células com um mecanismo MMR eficaz conseguem reparar o DNA, evitando desta forma a acumulação de mutações e as variações no comprimento dos microssatélites. A MSI é consequência da incapacidade de reparação destes erros (Sehgal et al., 2014; Umar et al., 2004).

Os microssatélites são muitas vezes usados no estudo de genes associados a doenças, devido ao seu padrão hereditário e às suas características polimórficas. Desta forma, estas sequências são usadas no estudo de células cancerígenas, nas quais se observam diferenças no número de sequências repetidas dos microssatélites, quando comparadas com as células normais (Boland & Goel, 2010).

Nos EUA, o Instituto Nacional de Cancro introduziu um conjunto de cinco marcadores de microssatélites: BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S2720 (Tabela 4), que permitem identificar tumores com MSI. Com base na proporção de marcadores e do tipo dos mesmos, mononucleotídicos e dinucleotídicos, podemos classificar o genótipo

MSI em alto e baixo, MSI-H e MSI-L, respetivamente. Assim, o diagnóstico é feito com base no número de marcadores que apresentam instabilidade. Tumores que apresentem uma percentagem superior a 30% dos marcadores de microssatélites com MSI, o que representa, dois ou mais dos cinco microssatélites *standards* mutados, são classificados como MSI-H. No caso de a percentagem ser inferior a 30%, o que equivale a aproximadamente, um marcador padrão mutado, o tumor é classificado como MSI-L. Quando a percentagem for de 0%, atribui-se a designação de estabilidade de microssatélites (MSS) (Boland & Goel, 2010; Carethers & Jung, 2016; Pawlik et al., 2004).

Tabela 4 – Marcadores de Microssatélites segundo o Instituto Nacional de Cancro dos EUA (Losso, Moraes, Gentili, & Messias- Reason, 2012)

Microssatélite	Localização	Tamanho
BAT25	Gene <i>c-Kit</i> cr. 4q12	110 - 130 pb
BAT26	Gene <i>hMSH2</i> cr. 2p	100 - 120 pb
D2S123	Gene <i>hMSH2</i> cr. 2p	200 - 230 pb
D5S346	Gene <i>APC</i> cr. 5q21q22	100 - 130 pb
D17S2720	Gene <i>BRCA1</i> cr.17q11.2-q12	140 - 170 pb

A instabilidade de microssatélites que surge nos marcadores mononucleotídicos, BAT25 e BAT26, está geralmente associada a tumores MSI-H, enquanto que os marcadores dinucleotídicos, em geral, são menos sensíveis na deteção destes tumores (Boland & Goel, 2010).

Com base nestes critérios é possível agrupar os tumores de acordo com as suas características clínicas e patológicas. Os tumores classificados como MSI-H, em comparação com os tumores MSI-L e MSS apresentam, frequentemente, características clínicas e patológicas distintas. Tumores com MSI-H tendem a ser pouco diferenciados, apresentam um crescimento mais exacerbado, a nível histológico, são mais diversificados e apresentam geralmente uma reação inflamatória associada. Os tumores MSI-L apresentam características clinico-patológicas semelhantes às apresentadas pelos tumores classificados como estáveis (MSS). (Pawlik et al., 2004).

A MSI é detetada em 15% de todos os CCRs, sendo que 3% estão associados com a Síndrome de Lynch e os outros 12% a cancros esporádicos. Os cancros esporádicos com MSI surgem, maioritariamente, associados ao silenciamento epigenético do promotor do gene *MLH1*, o qual será abordado mais à frente (Boland & Goel, 2010).

2.2.1. Síndrome de Lynch

A Síndrome de Lynch (SL) foi descrita, pela primeira vez, em 1966 pelo Dr. Henry T. Lynch e os seus colaboradores. Estes apresentaram a designação de síndrome de cancro familiar, após terem observado uma família onde existiam vários casos de CCR. Posteriormente, de forma a distinguirem esta síndrome da síndrome polipose adenomatosa familiar, esta designação foi alterada para HNPCC, que traduzida à letra significa cancro cólon retal hereditário não associado a polipose e está associada ao desenvolvimento do cancro na presença de um número reduzido de pólipos (Giardiello et al., 2014). Em 1984, Boland e Troncale, utilizaram o termo Síndrome de Lynch para definir a condição familiar anteriormente descrita. Este termo é mais apropriado que HNPCC uma vez que, a maioria dos pacientes com SL irá desenvolver um ou mais pólipos adenomatosos (Giardiello et al., 2014; Imai & Yamamoto, 2008).

A Síndrome de Lynch classifica-se como uma síndrome hereditária do CCR, de transmissão autossómica dominante, responsável por cerca de 3% de todos os CCRs e é apontada como a causa mais comum dos CCRs hereditários (Bouguenouch et al., 2016; Silva, Wernhoff, Dominguez-barrera, & Dominguez-valentin, 2016). Caracteriza-se a nível molecular pela existência de mutações germinativas nos genes do sistema de reparação de erros do DNA, sendo os mais afetados, os genes *MLH1* e o *MSH2* e, menos frequentemente, o *MSH6*. No entanto, o gene *PMS2* raramente aparece associado a esta síndrome (Boland & Goel, 2010; Giardiello et al., 2014; Imai & Yamamoto, 2008).

O diagnóstico da Síndrome de Lynch incide, muitas vezes, na história familiar e na idade do paciente (Shenoy, 2016; Silva et al., 2016). Em comparação com CCRs esporádicos, que por norma surgem aproximadamente aos 69 anos, a SL manifesta-se em idades mais precoces, sendo muitas vezes diagnosticada entre os 44 e os 61 anos

(Shenoy, 2016). Outra característica peculiar que se verifica com frequência nesta síndrome é a localização dos tumores, que eclodem, geralmente, no cólon direito, também denominado por cólon proximal (Silva et al., 2016).

Em termos histológicos, os carcinomas apresentam-se pouco diferenciados, com uma elevada produção de muco e possuem normalmente uma infiltração de linfócitos no interior do tumor e ao seu redor (Giardiello et al., 2014; Shenoy, 2016; Shiller & Boostrom, 2015).

O risco de desenvolver tumores, no contexto de Síndrome de Lynch, é bastante elevado e relaciona-se com o sexo do indivíduo e com o gene MMR afetado. Deste modo, indivíduos do sexo feminino e com os genes *MLH1* e *MSH2* mutados parecem ser os mais afetados. Para além do CCR, existe ainda o risco de doentes com SL desenvolverem outros tumores, que são considerados pertencentes ao espectro da HNPCC, como o tumor do endométrio, intestino delgado, uréter e pélvis renal (Giardiello et al., 2014).

Até ao desenvolvimento do CCR, a Síndrome de Lynch não apresenta características fenóticas que possam evidenciar o seu diagnóstico, pelo que este deve ser realizado tendo como base a história familiar do indivíduo, juntamente com as suas características clínicas e patológicas (Sousa et al., 2007). Porém, devido à dificuldade deste diagnóstico, em 1999, o *International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* definiu os critérios de Amesterdão II (Tabela 5) (Giardiello et al., 2014). As famílias que preenchem os critérios de Amesterdão II consideram-se como possíveis detentores de SL e passam a ser alvo de estudo. O preenchimento dos critérios de Amesterdão II surge, com frequência, associado à deteção de mutações germinais nos genes MMR (Shiller & Boostrom, 2015).

Tabela 5 - Critérios de Amesterdão II (Adaptado de Giardiello, et al., 2014).

<u>Critérios de Amesterdão II</u>
1. Três ou mais familiares afetados com tumores do espectro da HNPCC histologicamente confirmado (CCR, endométrio, intestino delgado, uréter e pélvis renal), sendo um deles familiar em primeiro grau dos outros dois;
2. Exclusão da síndrome de Polipose adenomatosa familiar (FAP);

3. Duas ou mais gerações com Cancro Cólon Retal;
4. Pelo menos um indivíduo com CCR, diagnosticado antes dos 50 anos;

Com a descoberta dos genes envolvidos na Síndrome de Lynch foi desenvolvido um novo conjunto de critérios, os Critérios de Bethesda (Tabela 6), cujo objetivo era identificar, dentro das famílias afetadas, os indivíduos que deveriam ser submetidos a testes moleculares, como a pesquisa de MSI (Giardiello et al., 2014; Sousa et al., 2007). A instabilidade de microssatélites alta (MSI-H) é encontrada em cerca de 90% dos casos de CCR na SL e, como tal, foi-lhe atribuída a função de marcador genético (Imai & Yamamoto, 2008). Nos casos em que esta característica é identificada, prossegue-se ao diagnóstico genético, ou seja, realiza-se um “screening” de mutações germinativas aos genes maioritariamente afetados por esta síndrome, nomeadamente, os genes *MLH1* e *MSH2*. Esta análise tem como objetivo confirmar o diagnóstico numa família suspeita e incluir a mesma num programa de vigilância que tem como fim reduzir a incidência e a mortalidade associada por CCR (Boland & Goel, 2010; Giardiello et al., 2014).

Tabela 6 - Critérios de Bethesda (Adaptado de Giardiello, et al., 2014).

<u>Critérios de Bethesda</u>
1. CCR diagnosticado em indivíduos com menos de 50 anos;
2. Indivíduos com CCRs síncronos ou metacrónicos, ou associação com outros tumores do espectro da síndrome de Lynch;
3. Indivíduos com CCR com características histológicas de instabilidade alta (MSI-H) infiltrado linfocitário, reação <i>Crohn-like</i> , tumores mucinosos ou com diferenciação em “anel de sinete” ou padrão de crescimento medular diagnosticado em idade inferior a 60 anos;
4. Indivíduos com CCR e um ou mais familiares em 1º grau com um tumor do espectro da SL, um dos quais diagnosticado em idade inferior a 50 anos;
5. Indivíduos com CCR e dois ou mais familiares de 1º e 2º grau com tumor com espectro da SL, independente da idade;

Capítulo III

3. Epigenética

A epigenética refere-se ao estudo de modificações no genoma, herdáveis durante a divisão celular, que não envolvem alterações na sequência do DNA (Nebbioso, Carafa, Benedetti, & Altucci, 2012). À semelhança dos processos genéticos, está envolvida no normal desenvolvimento dos mamíferos, apresentando funções fisiológicas básicas, como o desenvolvimento embrionário, o *imprinting* genómico, a diferenciação dos tecidos e a inativação do cromossoma X no sexo feminino (Lao & Grady, 2011). A epigenética, está ainda, envolvida na determinação da conformação da cromatina que, conseqüentemente, vai determinar a acessibilidade dos fatores de transcrição ao DNA, contribuindo desta forma para a regulação da expressão do gene (Bardhan & Liu, 2013; Lao & Grady, 2011)

Os estudos epigenéticos têm revelado um leque complexo de mecanismos de regulação, que podem ser encontrados tanto em tecidos normais como em tecidos cancerosos. Estes mecanismos incluem, a metilação do DNA, a modificação das histonas, a modificação da estrutura da cromatina e ainda, as alterações na expressão de micro RNAs (Juo, Gong, Baylin, Azad, & Ahuja, 2015). De entre os vários mecanismos, a metilação do DNA e a modificação das histonas são aqueles que mais frequentemente são associados ao desenvolvimento de cancro (Bardhan & Liu, 2013; Goel & Boland, 2012; Lao & Grady, 2011).

3.1. Modificações epigenéticas

3.1.1. Metilação do DNA

A metilação do DNA corresponde a uma modificação química na estrutura do DNA, que consiste na adição de um grupo metil (-CH₃) no carbono 5' da base nucleotídica citosina (Bardhan & Liu, 2013; Pisanic II, Athamanolap, & Wang, 2016). Este é um processo mediado por um grupo de enzimas, as DNA metiltransferases (DNMTs), as

quais são responsáveis por catalizar a transferência do grupo metil, da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5' da molécula de citosina, e produzir assim o 5-metilcitosina (Figura 9) (Goel & Boland, 2012; Lao & Grady, 2011; Pisanic II et al., 2016; Saavedra, Molina-márquez, Saavedra, Zambrano, & Salazar, 2016).

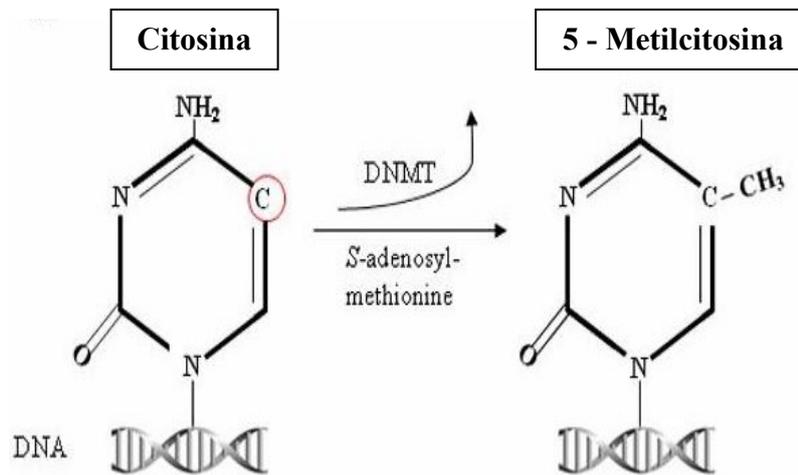


Figura 9- Metilação da citosina pelas DNMTs (Huang, Kuo, Stoner, Huang, & Wang, 2011).

Esta modificação química ocorre, geralmente, em sequências dinucleotídicas específicas, as sequências CpG, sendo o p relativo à ligação fosfodiéster, o C correspondente ao nucleótido citosina e o G correspondente ao nucleótido guanina (Bardhan & Liu, 2013; Reis, Vargas, & Lemos, 2016). A maioria dos locais CpG estão geralmente metilados, no entanto, existem regiões no DNA que são exceção e aparecem num estado não-metilado, as chamadas ilhas CpG (Lao & Grady, 2011). Estas ilhas são definidas como sequências nucleotídicas localizadas no genoma, com mais de 200 pares de bases e com um conteúdo de CG superior a 50% do conteúdo total (Bardhan & Liu, 2013). A metilação das ilhas CpG, localizadas na região promotora, está normalmente relacionada com o silenciamento transcricional (Saavedra et al., 2016). No entanto, este mecanismo por vezes é essencial ao funcionamento fisiológico do organismo, como nos casos de inativação do cromossoma X e *imprinting* genómico que ocorrem devido à metilação do DNA. Ultimamente, a metilação do DNA é um meio de regulação da expressão génica (Reis et al., 2016).

3.1.2. Modificação das histonas

A modificação das histonas pode definir-se como um mecanismo epigenético, cuja função é regular não só a expressão dos genes como também a modulação da estrutura da cromatina (Højfeldt, Agger, & Helin, 2013). A unidade estrutural da cromatina, o nucleossoma, é composto por 150 a 200pb de DNA, envolto em torno de quatro pares de proteínas chamadas histonas (H2A,H2B, H3 e H4) (Goel & Boland, 2012).

As modificações nas histonas podem incluir a metilação, acetilação, a fosforilação, ubiquinação, entre outras e são acompanhadas por mudanças na estrutura da cromatina (Gezer & Holdenrieder, 2014; Graça et al., 2016; Saavedra et al., 2016). O tipo de modificação e o aminoácido da proteína afetado, vai definir o efeito provocado na estrutura da cromatina. A posição e a natureza das modificações, assim como as consequências por estas provocadas, constituem no seu conjunto o código das histonas (Gezer & Holdenrieder, 2014; Goel & Boland, 2012; Graça et al., 2016).

Deste modo, é possível a distinção de dois estados da cromatina: eucromatina, quando a cromatina está acessível e é possível a ligação de fatores de transcrição aos promotores dos genes, iniciando-se assim a transcrição, e a heterocromatina, quanto a cromatina está condensada e não é possível transcrever os genes presentes nesta região (Coppede, 2014).

A acetilação das histonas é um mecanismo mediado por enzimas, conhecidas por, histonas acetiltransferases (HATs) e histonas deacetilases (HDACs), e ocorre geralmente nos resíduos de lisina localizados na cauda terminal das histonas, particularmente na histona H3 (Pellegrini, Argibay, & Gomez, 2010; Saavedra et al., 2016). No processo de acetilação, o grupo acetil, ao ligar-se à lisina é neutralizado por ação de uma carga oposta, ou seja, a carga negativa do grupo acetil é neutralizada pela carga positiva da lisina e conseqüentemente, as histonas vão ligar-se com menor força ao DNA, permitindo uma maior acessibilidade dos fatores de transcrição ao DNA (Coppede, 2014). Esta modificação está frequentemente associada à eucromatina. Contrariamente, os baixos níveis de acetilação estão associados à heterocromatina e conseqüentemente ao silenciamento transcricional dos genes (Pellegrini et al., 2010).

Outra forma de modificação das histonas é a metilação das mesmas. Este processo é mediado por um grupo de enzimas, designadas histonas metiltransferases (HMTs) e como a acetilação, interfere também no processo de regulação dos genes (Liu, Kimball, Liu, & Holowatyj, 2014). As HMTs atuam nos aminoácidos lisina e arginina, localizados na zona terminal da histona e, ao contrário do verificado pela acetilação, a metilação não induz alterações na carga da proteína. Ao invés disso, a metilação vai alterar a basicidade e a hidrofobicidade das histonas, alterando desta forma a afinidade dos fatores de transcrição para se ligarem ao DNA (Nebbioso et al., 2012). É possível distinguir dois grupos de HMTs: as lisina metiltransferases (KMT) e as arginina metiltransferases (RMT) (Bannister & Kouzarides, 2011). A ligação ao aminoácido, arginina ou lisina, pelas metiltransferases (HMTs) vai determinar a ativação dos genes ou o seu silenciamento, dependendo da histona em questão (Pellegrini et al., 2010).

3.2. Alterações epigenéticas no Cancro

As alterações epigenéticas têm surgido, cada vez mais, associadas com o desenvolvimento de vários tipos de patologias, incluindo o cancro. Atualmente, estas alterações são tão comuns como as mutações genéticas que estão na origem da carcinogénese (Ellis, Atadja, & Johnstone, 2009; Gnyszka, Jastrzębski, & Flis, 2013).

Os mecanismos epigenéticos estão envolvidos na transcrição de genes responsáveis pela diferenciação e proliferação celular. Em caso de ocorrerem alterações epigenéticas, estes genes podem perder a sua função, ocorrendo conseqüentemente a desregulação do ciclo celular, o que pode conduzir à progressão tumoral (Ellis et al., 2009).

De entre os mecanismos epigenéticos, a metilação das ilhas CpG, as modificações das histonas e da estrutura da cromatina têm sido referidos como as alterações epigenéticas com maior peso no desenvolvimento de carcinomas (Coppede, 2014; Tarayrah & Chen, 2013).

Os padrões de metilação podem aparecer alterados em indivíduos com idade avançada ou em estádios iniciais de carcinogénese. Nas células tumorais, essas alterações podem incluir a hipometilação generalizada do genoma e a hipermetilação de zonas promotoras localizadas em genes específicos, sendo que, a alteração do estado de metilação pode

conduzir a um aumento da divisão e proliferação das células tumorais (Gnyszka et al., 2013).

3.2.1. Hipometilação Global do DNA

A hipometilação global do DNA refere-se à perda global do conteúdo 5' metilcitosina e afeta, tipicamente, os dinucleotídeos CpG situados em sequências repetidas do DNA (Kaneda et al., 2004; Vaiopoulos, Athanasoula, & Papavassiliou, 2014). Nos tecidos normais, os dinucleotídeos CpG, presentes nessas sequências, encontram-se normalmente metilados. Porém, quando observamos os mesmos locais, em tecidos cancerígenos, verifica-se uma perda desta metilação (Baylin & Jones, 2016).

O contributo da hipometilação para o desenvolvimento de cancro têm sido, até à data, explicado a partir de três mecanismos. O primeiro refere que a desmetilação do DNA conduz a um estado de instabilidade cromossomal. O segundo atribui a reativação de retrotransposões como resultado da hipometilação. Os retrotransposões são sequências de DNA que têm a capacidade de se mover dentro no genoma, causando alterações na estrutura e função normais dos genes e, por este motivo, são normalmente silenciados. O terceiro mecanismo, defende que a desmetilação do DNA leva à perda de *imprinting* (LOI), conduzindo a um aumento da proliferação das células cancerígenas. (Baylin & Jones, 2016; Esteller, 2008; Wong, Hawkins, & Ward, 2007). Alguns autores defendem ainda, que a perda da metilação seja responsável pela ativação de oncogenes, levando a uma proliferação celular aumentada, podendo promover a formação do tumor (Harrington, 2015).

3.2.2. Hipermetilação do DNA

Nos tecidos normais, as ilhas CpG surgem geralmente, num estado “não-metilado”, permitindo a ligação dos fatores de transcrição em qualquer fase do desenvolvimento e, conseqüentemente, a expressão do gene associado. Em tecidos cancerígenos, estes locais, presentes nas zonas promotoras dos genes, encontram-se na maioria dos casos hipermetilados (Baylin & Jones, 2016). Esta metilação aberrante do DNA impede a

ligação dos fatores de transcrição aos locais de ligação e, parece ainda, estar relacionada com os mecanismos envolvidos na regulação da estrutura da cromatina. (Esteller, 2002; Rountree, Bachman, Herman, & Baylin, 2001). A hipermetilação das ilhas CpG tem sido observada em genes supressores de tumor (Baylin & Jones, 2016), em genes envolvidos no ciclo celular e em genes *mismatch repair* (Rountree et al., 2001). Para além disto, esta hipermetilação das ilhas CpG e o consequente silenciamento transcricional dos genes tem sido apontado, como a alteração do padrão de metilação com maior significado no desenvolvimento do cancro (Gnyszka et al., 2013).

Existem dois mecanismos que permitem explicar o silenciamento dos genes associado à metilação. O primeiro está relacionado com a diminuição da afinidade de certos fatores de transcrição aos locais CpG quando estes se encontram metilados. Após a adição do grupo metil na posição 5' da citosina, ocorre uma alteração na conformação tri-dimensional do DNA que vai impedir a interação com os fatores de transcrição e, consequentemente, silenciar a expressão dos genes. O segundo mecanismo envolve a alteração da estrutura da cromatina e, impede a ligação dos fatores de transcrição ao DNA através de proteínas repressoras da transcrição, designadas MBDs (*methyl-CpG binding domain protein*) (Gnyszka et al., 2013; Stirzaker et al., 2016). Estas proteínas têm um domínio de ligação às ilhas CpG metiladas e, quando ligadas a estas, recrutam outras proteínas, as histonas-desacetilases (HDACs) e as histonas metiltransferases (HMTs) que, por sua vez, vão promover a alteração da estrutura da cromatina e bloquear o acesso dos fatores de transcrição ao DNA (Esteller, 2002; Lao & Grady, 2011; Rountree et al., 2001).

3.3. Epigenética e CCR

3.3.1. Metilação do DNA no desenvolvimento de CCR

As vias de desenvolvimento do CCR incluem, como descrito anteriormente, a via de instabilidade de microssatélites e a sequência adenoma-carcinoma, sendo a última aceite como a via principal. Apesar de ambas serem aceites, e permitirem entender algumas causas e a forma como o tumor evolui, a elevada variedade e heterogeneidade,

frequentemente observada no cancro, deram origem a uma nova via de carcinogénese, a metilação do DNA. Clinicamente, o reconhecimento da metilação do DNA como causa e via de progressão do CCR permitiu desenvolver novos potenciais de diagnóstico e novas opções terapêuticas no CCR (Kim, Lee, & Sidransky, 2010).

3.3.1.1.Hipermetilação e o fenótipo metilador CIMP

A metilação das ilhas CpG, pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), é um evento epigenético que surge, frequentemente, associado ao silenciamento transcricional de genes supressores de tumores e de genes de reparação do DNA e, é encontrado em cerca de 20-30 % de todos os CCRs (Leggett & Whitehall, 2010).

Em 1999, Baylin, Issa e outros colaboradores aplicaram a denominação de “fenótipo metilador das ilhas CpG” ou CIMP. Este refere-se ao fenótipo observado quando os promotores dos genes supressores de tumor estão hipermetilados e, posteriormente ocorre carcinogénese (Toyota et al., 1999). No mesmo ano, Toyota et al realizaram um estudo, no qual analisaram um conjunto de sequências CpG num painel de CCRs e adenomas e, com base nessa análise, propuseram a existência de dois tipos de CIMP: o CIMP-A e CIMP-C. No primeiro a metilação era observada não apenas nas amostras de cancro, mas também nos tecidos que circundavam o tumor. No segundo, a metilação era restrita a genes no tumor. Verificou-se ainda que, a maioria dos locais CpG metilados no CCR, apareciam igualmente metilados na mucosa normal do cólon e que, nestes casos, o estado de metilação era mais evidente em doentes mais velhos. Desta forma, Toyota et al (1999) relacionaram a metilação verificada no tipo A com o envelhecimento e a metilação tipo C com o cancro (Gonzalo, Castellví-bel, Balaguer, Pellisé, & Ocaña, 2008; Toyota et al., 1999).

Os CCRs com CIMP possuem características clínicas, patológicas e moleculares muito peculiares, podendo realçar-se a associação do tumor ao sexo feminino, à idade avançada, a localização proximal no cólon, a diferenciação celular empobrecida e as mutações mais frequentes nos genes *BRAF* e *KRAS* e menos frequentes no gene *p53* (Bardhan & Liu, 2013).

Em 1999, Toyota et al propuseram um painel de cinco genes, do qual fazem parte os genes *MLH1*, *p16*, *MINT1*, *MINT2*, *MINT31* como marcadores de CIMP (Abdelfatah et al., 2016; Toyota et al., 1999). Estes genes apresentam-se frequentemente metilados no CCR e passaram a ser comumente usados na determinação do fenótipo metilador CIMP. Mais tarde, Weisenberg et al (2006), propuseram um novo painel, o qual inclui os genes *NEUROG1*, *RUNX3*, *SOCS1*, *IGF2* e *CACNA1G* (Gallois, Laurent-puig, & Taieb, 2015; Hinoue et al., 2012). No entanto, ainda não existe consenso no número de marcadores metilados necessários para definir um CCR com CIMP-positivo, verificando-se diferenças entre vários estudos (Bardhan & Liu, 2013).

Posteriormente, Shen et al definiram três subgrupos distintos de CCRs, com base na análise de alterações genéticas e epigenéticas. Segundo este autor, os CCRs poderiam ser agrupados em CIMP-negativos, CIMP-1 e CIMP-2 (Shen et al., 2007). Os CCRs com CIMP-negativo distinguiam-se dos restantes, pela fraca metilação nos genes analisados e pela presença de mutações no gene *p53*. Nos tumores CIMP-1, era possível observar uma forte metilação em múltiplos genes marcadores, assim como a presença de mutações do gene *BRAF*. Estes tumores tinham a particularidade de estar associados a um estado de instabilidade de microssatélites (MSI). Por último, nos tumores CIMP-2, a metilação estava restrita a alguns genes, tornando-se mais acentuada em tecidos de indivíduos mais velhos. Nestes, verificava-se ainda, a presença de mutações no gene *KRAS* (Coppede, 2014; Shen et al., 2007).

Existem ainda estudos que apresentam uma classificação distinta, na qual o fenótipo metilador CIMP aparece dividido em três epigenótipos: CIMP-alto, CIMP-baixo e CIMP-ausente. Segundo esta classificação, o CIMP-alto à semelhança do CIMP-1 associa-se a tumores que apresentam mutações no gene *BRAF* e que detêm um estado de MSI (Coppede, 2014). Em adição, estes tipos de tumor, foram ainda associados ao sexo feminino e a uma localização no cólon proximal (Hinoue et al., 2012). Os epigenóticos CIMP-baixo e CIMP-ausente apresentam características genéticas e epigenéticas consistentes com as observadas nos tumores CIMP-2 e CIMP-negativos, respetivamente (Coppede, 2014; Hinoue et al., 2012; Leggett & Whitehall, 2010).

3.3.1.1.1. Metilação do promotor do gene *MLH1* no CCR esporádico

O gene *MLH1* é um gene de reparação de erros no DNA, que quando mutado, origina um fenótipo denominado por instabilidade de microssatélites (MSI). Este fenótipo, como referido anteriormente, é detetado em 15% de todos os casos de CCRs, dos quais 3% estão associados ao desenvolvimento da Síndrome de Lynch, em cancros hereditários (Bouguenouch et al., 2016). Os restantes observam-se em cancros esporádicos, nos quais a metilação do gene *MLH1* é definida como a primeira causa de MSI (Goel & Boland, 2012).

Toyota et al (1999) consideraram que, a maioria dos CCRs esporádicos com MSI, eram causados por CIMP seguido da metilação do promotor do gene *MLH1*, originando assim a perda da expressão do gene e, conseqüentemente, uma deficiência nos mecanismos de reparação de DNA. Sugerindo assim a existência de uma relação estabelecida entre o fenótipo CIMP, a metilação do gene *MLH1* e o fenótipo MSI no CCR (Toyota et al., 1999).

Os tumores CIMP-alto ou CIMP-1 são, muitas vezes, associados à metilação do promotor do gene *MLH1* e à conseqüente instabilidade de microssatélites (Leggett & Whitehall, 2010). Estes tumores são associados a uma via de carcinogénese distinta da sequência adenoma-carcinoma, na qual os adenomas convencionais são substituídos por pólipos serrados. A presença de mutações no gene *BRAF* parece também estar associada a esta via e estas surgem, geralmente, numa fase mais precoce da carcinogénese (Coppede, 2014; Leggett & Whitehall, 2010). A proteína BRAF é uma proteína integrante da via MAPK, descrita anteriormente, e cuja atividade está implicada no crescimento celular. Na presença de mutações nesta proteína, a via MAPK fica com uma ativação permanente, resultando numa proliferação celular descontrolada e podendo culminar em cancro (Coppede, 2014). No entanto, mutações neste gene, não são encontradas em casos de Síndrome de Lynch, o que parece realçar a sua importância no diagnóstico desta síndrome. Em adição, as mutações do gene *BRAF* e o fenótipo metilador CIMP, são sempre encontrados conjuntamente nos casos de CCR (Leggett & Whitehall, 2010).

3.3.1.2. Hipometilação do DNA no desenvolvimento do CCR

A hipometilação global do DNA pode resultar da desmetilação de sequências repetitivas presentes no genoma. Estas sequências ou elementos repetitivos, que incluem os retrotransposões, transposões e os microssatélites (Miousse & Koturbash, 2015), constituem uma grande parte do genoma e, são responsáveis pela sua estabilidade, estando ainda envolvidas, na regulação da expressão dos genes (Barchitta, Quattrocchi, Maugeri, Vinciguerra, & Agodi, 2014; Vaiopoulos et al., 2014).

A ação dos elementos retrotransposónicos conduz à diversidade genética, no entanto, esta diversidade deve ser controlada para que exista uma transmissão fidedigna do conteúdo genómico, de pais para filhos. Assim, a metilação do DNA define-se como um importante mecanismo na regulação destes elementos e a sua ação é essencial para o silenciamento dos mesmos. Desta forma, os locais CpG, presentes em sequências repetitivas, encontram-se, num estado metilado (Barchitta et al., 2014).

Os LINE-1 são conhecidos como os elementos retrotransposónicos mais abundantes no genoma e, quando analisados, em células somáticas, encontram-se metilados o que se traduz no seu silenciamento. Estes elementos, foram os primeiros a ser relatados, por Miki et al, no desenvolvimento do cancro (Miki et al., 1992). Miki et al (1992), verificaram, que a inserção da porção do elemento LINE-1 no último exão do gene *APC* tinha como resultado a desregulação da função do gene. No entanto, não foi possível concluir se a inserção foi a causa para a tumorigénese ou se apenas ocorreu após esta já ter sido iniciada (Miousse & Koturbash, 2015).

Estudos posteriores mostraram que a perda global do conteúdo 5-metilcitosina no genoma está associada com a desmetilação dos retrotransposões, como os LINE-1, (Barchitta et al., 2014; Bardhan & Liu, 2013; Miousse & Koturbash, 2015) e que esta perda é possível de encontrar em praticamente todos os tumores. Deste modo, os elementos LINE-1 funcionam como marcadores em famílias com elevada suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro, incluindo o CCR (Barchitta et al., 2014; Bardhan & Liu, 2013; Miousse & Koturbash, 2015).

A hipometilação dos elementos LINE-1 pode ter efeitos significativos na expressão da informação genética e, por concordância, a hipometilação global do DNA surge,

geralmente, associada com a instabilidade genômica e a um aumento do número de mutações genômicas (Bardhan & Liu, 2013; Miousse & Koturbash, 2015).

A perda da metilação do DNA pode ainda conduzir ao *imprinting* genômico. Este é, também, um fator de risco no desenvolvimento de inúmeros cânceros, incluindo o CCR (Esteller, 2008), sendo o exemplo mais claro deste fenômeno observado no gene *IGF2* (*insuline-like growth factor-II gene*). O gene *IGF2* codifica para um fator de crescimento, semelhante à insulina, responsável por promover o crescimento e alguns efeitos metabólicos nos vários tipos de células (Cui, 2007) Neste gene, enquanto o alelo paterno é geralmente expresso, o alelo materno é normalmente silenciado devido à metilação das ilhas CpG nas regiões promotoras do gene (Kaneda & Feinberg, 2005). Quando ocorre a desmetilação destas zonas, verifica-se a perda de *imprinting* do gene que, por conseguinte, leva à ativação do alelo materno e à alteração da expressão do gene *IGF2* (Kaneda & Feinberg, 2005).

3.4. Fatores que afetam a metilação do DNA

3.4.1. Envelhecimento

O aumento da idade é um fator de risco, muito importante, no desenvolvimento de inúmeros cânceros, verificando-se que a incidência de CCR aumenta bruscamente após os 50 anos. De um ponto de vista genético, o envelhecimento conjuntamente com a exposição a determinados agentes mutagénicos, aumenta a predisposição para a acumulação de mutações somáticas. O mecanismo de metilação do DNA está também envolvido do processo de envelhecimento, aparecendo muitas vezes associado tanto com a hipometilação como com a hipermetilação do DNA (Pal & Tyler, 2016).

Estudos, nos quais foram analisados tecidos envelhecidos evidenciam uma diminuição global da metilação do DNA, verificando-se ainda, que a mesma é proporcional ao envelhecimento. Para além disto, a hipermetilação do DNA também é observável nestes tecidos, com a diferença que, esta surge associada a genes específicos. Por exemplo, em tecidos normais da mucosa do cólon, a hipermetilação surge associada ao receptor de estrógeno humano ($ER\alpha$), ao gene *IGF2* (*insulin-like growth factor*) e ao *MYOD*

(*myogenic differentiation*). Contudo, esta alteração não é detetável quando os tecidos analisados pertencem a indivíduos jovens (Jaenisch & Bird, 2003). Apesar de estes genes apresentarem já um processo de metilação alterado nestes tecidos, e mesmo sendo este processo dependente da idade, verifica-se que a hipermetilação dos genes *ERα*, *IGF2* e *MYOD* é um processo mais acelerado em doentes com CCR. Por este fator, o envelhecimento é apontado como uma das principais causas desta doença (Wong et al., 2007).

3.4.2. Dieta e CCR

A influência da dieta na carcinogénese cólon retal foi demonstrada a partir de estudos, realizados em pessoas que migravam de áreas de baixa incidência de CCR para áreas com incidência mais elevada. Estes estudos mostraram que, a mudança no estilo de vida e na dieta, consequentes da mudança para um país de alto risco, aumentavam a incidência de cancro nas pessoas recém-chegadas (Migliore, Migheli, Spisni, & Copped, 2011).

No que diz respeito a fatores dietéticos, a associação do folato à carcinogénese cólon retal, é talvez o melhor tema estudado (Wong et al., 2007).

O folato é uma vitamina B, solúvel em água, presente em vários alimentos e cuja forma sintética, utilizada em suplementos, é designada por ácido fólico (Baluz, Carmo, & Rosas, 2002). Esta vitamina está envolvida na síntese e reparação do DNA e em reações de metilação e, devido à sua capacidade de doar ou aceitar unidades de um carbono, atua também como cofactor em inúmeras reações bioquímicas (Wong et al., 2007).

Os níveis de folato, avaliados pela ingestão de ácido fólico na dieta ou pela medição no sangue, têm demonstrado que, os níveis baixos estão associados ao elevado risco de desenvolver CCR. Contrariamente, uma elevada ingestão de ácido fólico parece funcionar de forma preventiva no desenvolvimento deste cancro (Migliore et al., 2011). Além disso, a associação do ácido fólico ao desenvolvimento do Cancro Cólon Retal foi recentemente reforçada por observações de polimorfismos genéticos na via metabólica do folato (Sanderson et al., 2007).

De forma a entendermos o mecanismo, pelo qual a deficiência de ácido fólico pode conduzir à carcinogênese, é necessário conhecer os processos metabólicos que são dependentes deste nutriente. Estes processos são regulados por uma enzima, a MTHFR ou metilenotetrahidrofolato-redutase e, parecem ser influenciados pela ingestão de folato e por polimorfismos genéticos que possam ocorrer associados à via metabólica (Kono & Chen, 2005).

A enzima MTHFR é responsável por catalizar a redução da 5-10-metilenotetrahidrofolato (5-10-THF) a 5-metilenotetrahidrofolato (5-THF) (Figura 10, passo 1) sendo que, este último vai atuar como dador de um grupo metil, na remetilação da homocisteína para metionina (Figura 10, passo 2). A metionina é um precursor do SAM que é o maior dador intracelular de grupos metil na maioria das reações bioquímicas, onde se inclui a metilação da citosina no DNA (Duthie, 1999; Y.-I. Kim, 2004).

O 5-metilenotetrahidrofolato é a principal forma circulante do folato e quando este se encontra reduzido, numa situação de deficiência de folato, o SAM torna-se insuficiente, ocorrendo uma drástica redução da metilação das citosinas no DNA. Como consequência desta hipometilação do DNA, ocorre a ativação de proto-oncogenes e a indução da progressão para o cancro (Duthie, 1999).

Por outro lado, o 5-10-THF atua como um dador do grupo metil para a enzima dimetilato sintetase (TS) que, por sua vez, vai converter a desoxiuridina monofosfato (dUMP) a timidina monofosfato (dTMP) (Figura 10, passo 3) (Duthie, 1999; Hubner & Houlston, 2009). Este é um processo limitante na síntese de DNA das células em mamíferos (Hubner & Houlston, 2009) e na falta de folato, a conversão de dUMP para dTMP é bloqueada, resultando na acumulação de dUMP. Por consequência, esta acumulação pode conduzir à incorporação de uracilo no DNA, no lugar da timina, resultando em quebras do DNA que, por sua vez, podem levar a aberrações cromossómicas e a transformação maligna (Duthie, 1999).

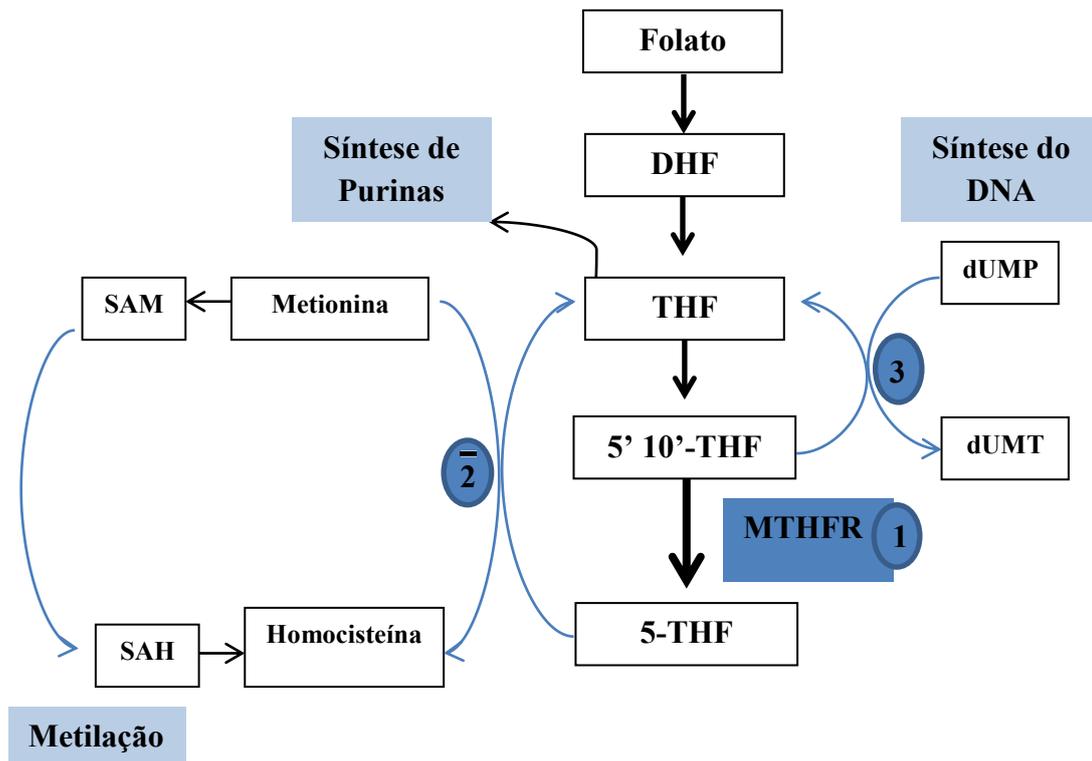


Figura 10 - Esquema simplificado do metabolismo do folato, que envolve a síntese e metilação do DNA
 Legenda: 1-A enzima MTHFR cataliza a redução da 5'10- THF a 5-THF; 2 - O 5- THF fornece um grupo metil para a remetilação da homocisteína a metionina; 3- O 5-10-THF atua como um dador do grupo metil na conversão do dUMP a dTMP (Adaptado de Y.-I. Kim, 2004).

3.4.2.1. Polimorfismos do gene MTHFR no desenvolvimento do CCR

O gene *MTHFR* é responsável por codificar a enzima MTHFR que é a enzima-chave na regulação do metabolismo do folato e afeta a metilação e a síntese de DNA (Kono & Chen, 2005; Levin & Varga, 2016). Polimorfismos presentes no gene *MTHFR* alteram a atividade normal desta enzima e podem modificar o risco de CCR em relação à ingestão de ácido fólico (Kono & Chen, 2005).

São conhecidos dois polimorfismos funcionais no gene *MTHFR*: o C677T e o A1298C. No primeiro ocorre a transição de uma citosina para uma timina no exão 4, do nucleótido 677, tendo como resultado a substituição do aminoácido alanina pela valanina na posição 222 da sequência proteica (p.A222V). No segundo, ocorre a transição da adenina para a citosina, no exão 7, do nucleótido 1298, que resulta na substituição de um aminoácido glutamato por um aminoácido alanina, na posição 429

da proteína (p.E429A) (Kono & Chen, 2005; Langevin et al., 2009; Sharp & Little, 2004; Varela-Rey, Woodhoo, Martinez-Chantar, Mato, & Lu, 2013).

Ambos os polimorfismos estão associados com a redução da atividade da enzima MTHFR. Assim, para o polimorfismo C677T, tendo como termo comparativo o genótipo normal, 677CC, observa-se que indivíduos com genótipo heterozigótico 677CT apresentam uma redução de 45% da atividade normal da enzima e, os indivíduos portadores do genótipo homozigótico 677TT apresentam uma enzima MTHFR com, aproximadamente 30% da atividade normal (Kono & Chen, 2005; Varela-Rey et al., 2013). O polimorfismo A1298C resulta numa redução de 60% na atividade normal da enzima, em indivíduos que apresentam o genótipo homozigótico (Levin & Varga, 2016; Yin et al., 2004).

A associação entre os polimorfismos do gene *MTHFR* e o desenvolvimento da carcinogênese cólon retal tem sido, intensivamente, estudada. No entanto, os resultados destes estudos parecem ser muito heterogêneos e, além disso, muito focados no polimorfismo C667T (Zhao, Li, Xing, & Zhou, 2013). Enquanto que, alguns estudos sugerem que o polimorfismo C677T está associado a um aumento do risco de desenvolver CCR, outros sugerem que, a presença deste polimorfismo, pode estar associada a uma redução do risco CCR, funcionando assim como um fator de proteção (Shannon, Granasampanthan, Beilby, & Lacopecta, 2002; Yang, Zhang, Liu, & Zhao, 2012). Existem também estudos que defendem que o risco de CCR é menor em indivíduos com uma elevada concentração de folato e que este depende da localização geográfica do indivíduo. Segundo estes, indivíduos residentes em zonas com hábitos alimentares ricos em folato, apresentam menores riscos de desenvolver CCR (Levin & Varga, 2016).

Em 1996, Chen et al sugeriu que o polimorfismo C667T estava envolvido na metilação anormal do DNA e que deste modo, poderia levar ao desenvolvimento da carcinogênese (Chen et al., 1996). Posteriormente, Shannon et al confirmou que, os indivíduos com o genótipo homozigótico 677TT apresentavam um risco aumentado para desenvolver CCR (Shannon et al., 2002).

Mais tarde, numa meta-análise levada a cabo por Yang et al (2012), conclui-se que, em indivíduos com uma elevada concentração de folato no plasma, a variante T do polimorfismo C677T atua como um fator de proteção, diminuindo o risco de CCR. No

entanto, o mesmo não se verifica para indivíduos com baixos níveis de folato (Yang et al., 2012). De forma semelhante, Kim et al (2012), reportaram que o genótipo homozigótico 677TT está associado a um baixo risco de se desenvolver CCR. Estes autores sugeriram também que a ingestão de folato funciona como um fator de proteção contra o desenvolvimento do CCR nos indivíduos com os genótipos 677CC e 677CT. Este estudo demonstra ainda que o elevado consumo de bebidas alcoólicas conduz a um aumento do risco de carcinogénese, sendo que nos indivíduos portadores do genótipo TT, a elevada ingestão de álcool tem como consequência o desaparecimento do fator de proteção (Kim et al., 2012). As associações descritas por Kim et al (2012) mostraram-se mais evidentes nos cancros do cólon que do reto enquanto segundo Zhao et al (2013), o polimorfismo no gene *MTHFR* está claramente associado com a carcinogénese do cólon e do reto (Zhao et al., 2013)

A heterogeneidade dos vários estudos está associada a um conjunto de fatores não genéticos que podem, também influenciar a associação entre o *MTHFR* e o risco de cancro. Estes fatores incluem a localização geográfica da população, o número de amostras em estudo e fatores de risco ambientais tais como a dieta, o tabagismo e a ingestão de álcool (Guo et al., 2013).

Vários estudos têm relatado o papel protetor do folato no desenvolvimento do CCR, no entanto, este parece ser dependente da dose, da fonte e do momento da administração do ácido fólico durante o processo de carcinogénese. Assim, o uso de suplementos de folato para redução do risco de desenvolvimento de CCR tem sido questionável (Kim et al., 2012). O ácido fólico ou os suplementos apresentam diferenças na sua composição quando comparados com o folato biológico. Estas diferenças por vezes podem conduzir a um efeito diferente na carcinogénese do CCR. Além disso, o momento da administração de folato, na forma de suplementos ou ácido fólico, também é muito importante para o desenvolvimento e progressão da carcinogénese. Se a administração dos suplementos ocorrer antes de estarem estabelecidas lesões neoplásicas, o desenvolvimento e progressão do tumor é suprimido. Por outro lado, se esta for iniciada após já existirem lesões neoplásicas, vai aumentar o seu crescimento e progressão (Kim et al., 2012).

3.4.3. Tabagismo

O tabagismo é um fator de risco comum numa grande variedade de doenças, incluindo doenças cardiovasculares, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), osteoporose e ainda, vários tipos de cancro (Kleinschmidt et al., 2013). Os principais agentes cancerígenos encontrados no fumo do tabaco correspondem a amins aromáticas, nitrosaminas, amins heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos cíclicos (Durko & Malecka-panas, 2014). Vários estudos apontam que, o consumo excessivo de tabaco tem como consequência alterações no padrão de metilação do DNA. Nomeadamente, o tabagismo tem sido associado a alterações da metilação global do DNA e com a metilação dos locais CpG, em vários genes intervenientes no desenvolvimento de cancro (Breitling, Yang, Korn, Burwinkel, & Brenner, 2011). Contudo, outros estudos sugerem que apenas a metilação dos locais CpG é resultado do impacto do tabagismo, justificando com o facto de serem observadas diferenças na metilação dos locais CpG entre indivíduos fumadores e não fumadores. Sendo menos evidente a metilação destes locais em vários genes, em indivíduos não fumadores (Wan et al., 2012).

A maioria das questões acerca do impacto do tabaco na metilação do DNA têm-se centrado no cancro. Deste modo, têm sido desenvolvidos vários estudos com o objetivo de comparar os locais CpG, de genes envolvidos na carcinogénese, em pacientes fumadores e não fumadores (Breitling et al., 2011). Esta pesquisa tem-se ainda alargado a indivíduos ex-fumadores, de forma a perceber qual o impacto do tabaco na metilação do DNA a longo prazo. Recentemente foi realizado um estudo, no qual se analisaram amostras de sangue de 15907 participantes, pertencentes a indivíduos fumadores, ex-fumadores e não fumadores. No genoma dos indivíduos fumadores observou-se que, cerca de sete mil genes, o que corresponde a aproximadamente um terço dos genes conhecidos no genoma, apresentavam o DNA metilado. Os mesmos genes estão implicados em doenças relacionadas com o tabagismo, tais como o cancro. Por outro lado, foi observado que em indivíduos ex-fumadores, a metilação dos locais CpG destes genes tornou-se menos evidente e, é possível que, cinco anos após a cessação tabágica, possa ser comparada à metilação dos locais CpG de indivíduos não fumadores. Desta forma, consegue-se explicar o facto do risco de muitas doenças relacionadas com o tabagismo diminuir após a cessação tabágica. Contudo, foi também observado que, em alguns locais CpG, as alterações do padrão de metilação são permanentes. Concluindo-

se que, nestes casos, a cessação tabágica não reduz o risco associado à doença e que, mesmo os indivíduos ex-fumadores apresentam um risco acrescido para o cancro (Joehanes et al., 2016).

Capítulo IV

4. Aplicações Clínicas da Epigenética e Terapêutica

A epigenética é um campo relativamente recente da biologia molecular e vários estudos, realizados até à data, demonstram que os mecanismos epigenéticos estão envolvidos na diferenciação, envelhecimento e desenvolvimento de doença (Abdelfatah et al., 2016). Como referido anteriormente, o cancro compreende um estado de doença que resulta principalmente da desregulação generalizada dos mecanismos epigenéticos, conjuntamente, com inúmeras mutações genéticas (Abdelfatah et al., 2016; Goel & Boland, 2012). As alterações epigenéticas, ao inverso das genéticas, são potencialmente reversíveis, facto que conduziu a que o epigenoma se tornasse um alvo na terapêutica utilizada para combater o cancro (Gnyszka et al., 2013; Juo et al., 2015).

De entre o vasto conjunto de alterações epigenéticas, a metilação do DNA e a acetilação das histonas, são as alterações mais estudadas e das quais os mecanismos de ação são melhor compreendidos até ao momento (Abdelfatah et al., 2016; Azad, Zahnow, Rudin, & Baylin, 2013). Na maior parte dos casos de cancro, o epigenoma das células caracteriza-se por uma hipometilação global intercalada com uma hipermetilação pronunciada nas ilhas CpG, localizadas nas zonas promotoras dos genes (Abdelfatah et al., 2016; Juo et al., 2015). Esta hipermetilação, nas zonas promotoras, resulta normalmente no silenciamento de genes supressores de tumor e, conseqüentemente, no desenvolvimento de cancro. Para além deste mecanismo, a acetilação ou deacetilação das histonas é outro importante mecanismo envolvido na regulação da transcrição, podendo levar à ativação ou silenciamento transcripcional de genes associados ao desenvolvimento de CCR, como referido anteriormente (Abdelfatah et al., 2016).

Deste modo, estes dois mecanismos representam os dois principais alvos epigenéticos usados na terapêutica das células cancerígenas, existindo duas classes de fármacos que modelam estes processos (Abdelfatah et al., 2016; Gnyszka et al., 2013). Os inibidores

das DNMTs - cujo objetivo é a inibição das enzimas DNMTs e, por consequente, a reversão da metilação, permitindo desta forma a re-expressão dos genes silenciados aberrantemente - e os inibidores das HDACs - que promovem a inibição das enzimas HDACs, ocorrendo um aumento da acetilação das histonas, permitindo desta forma, uma transcrição mais ativa (Abdelfatah et al., 2016; Gnyszka et al., 2013; Goel & Boland, 2012).

4.1. Inibidores das DNMTs

Os inibidores das enzimas DNMTs começaram por ser designados e testados como agentes citotóxicos e, só mais tarde, foi conhecida a sua capacidade para reverter a metilação (Azad et al., 2013). Estudos realizados com estes fármacos, enquanto agentes citotóxicos, mostraram uma eficácia reduzida e uma baixa tolerância, dado às elevadas doses utilizadas (Abdelfatah et al., 2016).

Os inibidores das DNMTs são análogos da citosina e atuam, através da sua incorporação no DNA, seguida da ligação covalente com as enzimas DNMTs, resultando numa redução da atividade das mesmas e, consequentemente, da desmetilação do DNA, após vários ciclos celulares (Abdelfatah et al., 2016; Goel & Boland, 2012). Além da inibição da metilação, estes fármacos podem ainda, atuar através de outros mecanismos. A ligação covalente enzima-inibidor, pode induzir a morte celular, assim como a ocorrência de erros no DNA, resultantes da instabilidade estrutural que se verifica no local onde o inibidor se incorporou (Abdelfatah et al., 2016; Goffin & Eisenhauer, 2002). De forma a tornarem-se ativos, os inibidores da DNMTs têm que ser integrados no genoma durante a fase S (replicação) do ciclo celular. Este facto faz com que, exista alguma preferência para a incorporação destes fármacos em células que se dividam rapidamente, tal como as células cancerosas (Fahy, Jeltsch, & Arimondo, 2012).

Os inibidores das DNMTs mais estudados até ao momento designam-se por 5-Azacitidina e 5-Aza-2-Desoxicitidina também conhecido como Decitabina (Gros et al., 2012). Como referido anteriormente, estes inibidores são análogos da citosina, nos quais o átomo de carbono, presente na posição cinco da estrutura química da citosina, é

substituído por um átomo de azoto que está ligado a uma ribose no caso do Azacitidina, ou a uma desoxirribose no Decitabina (Figura 11) (Derissen, Beijnen, & Schellens, 2013; Gros et al., 2012). Este último incorpora-se preferencialmente no DNA, enquanto que, o inibidor Azacitidina pode incorporar-se no DNA e no RNA (Fahy et al., 2012; Gnyszka et al., 2013). O facto de a incorporação do inibidor Decitabina ocorrer exclusivamente no DNA, permite explicar a maior efetividade deste inibidor em comparação com o Azacitidina. Ao ser também incorporado no RNA, o inibidor Azacitidina, é conseqüentemente menos incorporado no DNA resultando na desregulação da síntese das proteínas. A menor ocorrência de efeitos adversos associada à utilização do inibidor Decitabina também pode ser explicada por este princípio (Fahy et al., 2012; Gros et al., 2012).

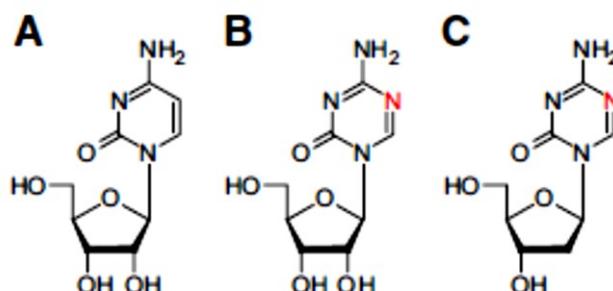


Figura 11 - Estruturas químicas da Citosina (A), Azacitidina (B) e Decitabina (C)

(Derissen, Beijnen, & Schellens, 2013).

A capacidade destes dois fármacos para reverter a metilação, pela inibição das enzimas DNMTs, pode ser conseguida através de doses baixas de ambos os inibidores (Gnyszka et al., 2013). Estudos preliminares, utilizando doses elevadas, mostraram uma elevada toxicidade e uma eficácia reduzida (Bardhan & Liu, 2013; Juo et al., 2015). Posteriormente, estudos realizados utilizando baixas doses de Azacitidina e Decitabina demonstraram uma redução da toxicidade. O uso de doses mais baixas destes fármacos minimiza a sua ação citotóxica e, permite que estes funcionem como agentes terapêuticos epigenéticos, revertendo a metilação através da inibição das enzimas DNMTs (Abdelfatah et al., 2016).

Estudos realizados em pacientes com doenças hematológicas malignas revelaram que, a utilização destes dois fármacos, em doses baixas, os torna particularmente efetivos

(Abdelfatah et al., 2016). Com bases nestes resultados, os inibidores das DNMTs, Azacitabina e Decitabina, estão aprovados pela FDA (*US Food and Drug Administration*), no tratamento de síndromes mielodisplásicas (MDS) e, pela EMA (*Europe Medicines Agency*), no tratamento da leucemia mielóide aguda (AML) e leucemia mielóide crónica (CMML) (Derissen et al., 2013). O inibidor Azacitabina é administrado através de injeções subcutâneas, numa dose inicial de $75\text{mg}/\text{m}^2$, durante sete dias, seguindo-se um período de vinte e um dias, ausente de tratamento. O ciclo deve ser repetido a cada quatro semanas e pode ser necessário um ajustamento da dose. Num ciclo de tratamento com Decitabina é administrada uma dose de $20\text{mg}/\text{m}^2$ por perfusão intravenosa durante uma hora, durante cinco dias consecutivos. O ciclo deve ser, tal como na Azacitabina, repetido a cada quatro semanas (Derissen et al., 2013).

A utilização destes fármacos no tratamento de cancro sólidos, como o CCR, está a ser exaustivamente estudada (Bardhan & Liu, 2013).

4.2. Inibidores das HDACs

Os inibidores das HDAC são uma classe importante de fármacos epigenéticos, cuja finalidade é impedir a ação das enzimas HDACs (Bardhan & Liu, 2013). São conhecidas dezoito enzimas histonas deacetilases nas células dos mamíferos, agrupadas por quatro classes distintas: classe I, II, III e IV (Abdelfatah et al., 2016). As HDACs têm uma ação antagonista à ação das HATs, as quais são responsáveis por catalizar a acetilação da lisina nas histonas (Pellegrini et al., 2010). Os inibidores destas enzimas podem ser divididos com base na classe da HDAC a que se dirigem, estrutura e composição (Abdelfatah et al., 2016). Assim, podemos classificar os inibidores das HDACs em ácidos hidróxicos, péptidos cíclicos, benzamidas e ácidos gordos de cadeia curta (Hull, Montgomery, & Leyva, 2016).

Os mecanismos de ação destes inibidores são complexos e ainda não estão completamente elucidados, no entanto, apresentam vários mecanismos envolvidos na terapia anti-tumoral, nomeadamente estes inibidores promovem o aumento da acetilação das histonas que, por sua vez, vai permitir que a cromatina fique acessível para transcrição e, desta forma, ocorra a expressão dos genes previamente silenciados (Abdelfatah et al., 2016). Em adição, estudos realizados com os inibidores das HDACs

têm mostrado que estes apresentam a capacidade de induzir a apoptose e a inibição da proliferação celular (Juo et al., 2015).

Estão em curso diversos ensaios clínicos que visam avaliar a eficácia destes fármacos no tratamento do cancro, sendo que, dois destes inibidores foram aprovados pela FDA para a utilização no tratamento de linfomas cutâneos das células T (Abdelfatah et al., 2016; Bardhan & Liu, 2013). O Vorinostat foi o primeiro inibidor a ser aprovado, em 2006 (Abdelfatah et al., 2016; Nebbioso et al., 2012). Este pertence à classe de inibidores ácidos hidróxicos, na qual se incluem a maioria dos inibidores das HDACs que estão, correntemente, em ensaios clínicos (Yang et al., 2012). Os inibidores inseridos nesta classe, apresentam uma elevada eficácia na inibição da classe I e II das HDACs (Wang, Cui, Lu, & Zhang, 2016). O segundo inibidor aprovado denomina-se por Romidepsin e está agrupado nos inibidores péptidos cíclicos, cuja ação incide, principalmente, na inibição da atividade da classe I das HDACs (Gołębek, Strzelczyk, Wiczowski, & Michalski, 2015).

O inibidor Vorinostat pode classificar-se como o fármaco mais evoluído de entre as classes de inibidores das HDACs, incluindo-se numa vasta diversidade de ensaios clínicos, em diversas doenças, entre as quais o linfoma, síndromes mielodisplásicas, cancro cólon retal, cancro do rim, cancro da próstata, cancro do pulmão, entre outras (Nebbioso et al., 2012). No entanto, apesar da eficiência deste inibidor no tratamento de linfomas das células T, os resultados dos estudos em tumores sólidos têm sido decepcionantes (Lakshmaiah, Jacob, Aparna, Lokanatta, & Saldanha, 2014).

O facto da terapêutica com inibidores HDACs, em monoterapia, se ter mostrado insuficiente no tratamento de tumores sólidos, entre os quais o CCR, conjuntamente com o conhecimento de que estes fármacos têm capacidades para reprogramar as células, conduziu ao desenvolvimento de estudos com terapêuticas combinadas (Abdelfatah et al., 2016).

4.3. Terapêuticas combinadas

Os mecanismos epigenéticos que ocorrem durante o desenvolvimento da carcinogênese, tais como, o silenciamento de genes e a metilação do DNA, têm a capacidade de afetar a sensibilidade das células cancerígenas à quimioterapia, assim como, a resposta do cancro face a esta terapêutica (Steele, Finn, Brown, & Plumb, 2009). Deste modo, tem sido proposto que o desenvolvimento de resistências à quimioterapia se deve, em parte, à regulação epigenética e que, através da utilização de inibidores DNMTs e HDACs, é possível reprogramar as células cancerígenas, sensibilizando-as para o agente citotóxico (Abdelfatah et al., 2016; Sharma et al., 2010). Assim, o uso da terapia epigenética, combinada com as convencionais terapêuticas do cancro, tem revelado potencial interesse na reversão de resistências, geralmente observadas com alguns fármacos citotóxicos, bem como na re-expressão de genes supressores de tumor envolvidos nas vias citotóxicas (Juo et al., 2015).

Estudos *in vitro*, realizados em linhas celulares de CCR têm demonstrado que, a combinação de inibidores de HDACs, entre os quais o Vorinostat, com 5-Fluoruracilo (5-FU) conduz, através de um efeito sinérgico, ao aumento da morte celular e da inibição do crescimento do tumor (Mariadason, 2008). Em adição, alguns estudos concluíram que o pré-tratamento com inibidores DNMTs, como por exemplo, o Azacitidina e o Decitabina, pode ser usado para sensibilizar as células à terapêutica com 5-FU e Irinotecano (Ishiguro et al., 2006; Miyaki, Suzuki, Koizumi, Kato, & Saito, 2012). Estas observações confirmam assim que os inibidores das HDACs e das DNMTs podem ser potencialmente utilizados como agentes adjuvantes na terapêutica do CCR com 5-FU ou Irinotecano, devido à sua eficácia na redução das resistências, já conhecidas, a estes agentes neoplásicos (Bardhan & Liu, 2013).

O uso de inibidores HDACs apresenta também benefícios quando combinado com a radioterapia. A hiperacetilação das histonas, induzida por estes inibidores, vai aumentar o acesso da radiação ionizante ao DNA (Mariadason, 2008). Além disso, a inibição das enzimas HDACs resulta num conjunto de mecanismos anti-tumorais, entre os quais, a paragem do ciclo celular e a inibição de proteínas envolvidas na reparação do DNA (Abdelfatah et al., 2016). Estes são potenciais mecanismos pelos quais, os inibidores das HDACs permitem melhorar a eficácia da radioterapia (Ree et al., 2010).

Um estudo de fase 1, levado a cabo por Ree et al, avaliou o uso do inibidor das HDACs, Vorinostat, combinado com radioterapia paliativa pélvica para o carcinoma gastrointestinal. Segundo este, o pré-tratamento com Vorinostat tem como resultado uma sensibilização à radioterapia, aumentando desta forma, a eficácia da mesma na redução do tumor (Ree et al., 2010).

Existem ainda estudos que sugerem que a combinação de terapias epigenéticas pode aumentar a eficácia do tratamento anticancerígeno. A inibição da atividade das HDACs, em monoterapia, influencia a expressão de muitos genes. Contudo, genes hipermetilados, silenciados por mecanismos epigenéticos, parecem não ser re-expressados pela ação destes inibidores. Este mecanismo só é observado na presença de agentes desmetilantes, como os inibidores das DNMTs (Juergens et al., 2012). Assim, a combinação destas terapias, inibindo a atividade das enzimas DNMTs e das HDACs, pode induzir a re-expressão de genes metilados e resultar numa resposta tumoral (Mariadason, 2008). Confirmando esta hipótese, um estudo realizado por Juergens et al, demonstrou que a combinação terapêutica de Azacitidina (um inibidor das DNMTs) com Entinostat (um inibidor das HDACs), em baixas doses, apresenta respostas tumorais duráveis em doentes com tumores sólidos, resposta que não é conseguida através de monoterapia (Juergens et al., 2012).

Conclusão

Os estudos e factos apresentados nesta tese, relativos às diferentes vias de progressão, características clinico-patológicas e perfis moleculares, demonstram que o Cancro Cólon Retal (CCR) é uma neoplasia heterogénea, tendo uma apresentação clínica, características moleculares e prognósticos diferentes, dependendo de cada paciente. O CCR é conhecido por ser um dos cancros com maior incidência a nível mundial, sendo o terceiro mais frequente. Em Portugal, no ano de 2014, este tipo de neoplasia distinguiu-se como a terceira mais frequente no sexo masculino e a segunda no sexo feminino de acordo com os dados da Direção Geral da Saúde.

O CCR pode ser classificado, segundo a etiologia que lhe é adjacente, em esporádico e hereditário. O cancro esporádico não está associado a qualquer predisposição hereditária e, neste caso, o processo de carcinogénese pode ser influenciado por diversos fatores, como a idade, a dieta, o estilo de vida, fatores ambientais, mutações somáticas e história prévia de adenoma maligno. O cancro hereditário, por sua vez, apresenta características clinico-patológicas e moleculares/genéticas bem definidas.

Na última década vários avanços e desenvolvimentos têm sido feitos em todos os aspetos do CCR, incluindo novas técnicas de imagiologia e *screening*, identificação de novos mecanismos moleculares que levam à doença e aparecimento de tratamentos adjuvantes e neoadjuvantes. No entanto, a remoção cirúrgica continua a ser o procedimento mais aplicado na maioria dos casos.

A patogenése do Cancro Cólon Retal está bem descrita e inclui principalmente a sequência adenoma-carcinoma. A nível histológico, esta via inicia-se com um aumento da proliferação das células da mucosa epitelial, com posterior progressão para adenoma benigno, em que o aumento da displasia, tamanho e agressividade culminam na formação do carcinoma. Em concomitância com estas alterações histopatológicas, surge uma acumulação gradual de mutações genéticas e epigenéticas nos genes *APC*, *KRAS* e *p53*, que estão envolvidos na iniciação e progressão da carcinogénese cólon retal. Uma percentagem mais reduzida de CCRs está associada à instabilidade de microssatélites. Esta é uma via de progressão tumoral que se caracteriza pela ocorrência de mutações em sequências repetitivas na linha germinal, em genes responsáveis pela reparação do

DNA, resultando numa reparação deficiente dos erros que ocorrem durante o processo de replicação. O desenvolvimento da síndrome hereditária do CCR, a síndrome de Lynch, está também associado a esta via molecular de carcinogénese.

Do ponto de vista molecular, os estádios bem definidos e as mutações identificáveis na sequência adenoma- carcinoma, representam alvos ideais a ser utilizados no diagnóstico precoce do CCR. A capacidade para identificar estas mutações genéticas em indivíduos assintomáticos, com elevada sensibilidade e especificidade, devia ser, na teoria, um método viável de rastreio. Contudo, a pesquisa de eventos moleculares como ferramentas de diagnóstico tem mostrado resultados pouco promissores e, correntemente, os testes como a pesquisa de sangue oculto nas fezes e a colonoscopia continuam a ser os mais utilizados no rastreio realizado em alguns países, enquanto que noutros países, não existem programas de rastreio. Para além disto, as mutações genéticas apresentam também um papel limitado como indicadores de prognóstico no CCR. Assim sendo, a procura de novos e mais precisos indicadores de resposta ao tratamento, bem como prognóstico continua a ser uma das principais áreas de investigação neste tipo de cancro.

Recentemente foi identificada uma nova via molecular no desenvolvimento do CCR. Esta via inclui mecanismos epigenéticos como as modificações das histonas, modificações da estrutura da cromatina, alterações na expressão de micro RNAs e a metilação do DNA. De facto, as alterações na metilação do DNA, são agora consideradas uma anormalidade comum na iniciação do cancro e na sua progressão, ocorrendo no início do processo de formação do cancro, na fase pré-maligna da sequência adenoma-carcinoma.

A metilação do DNA é um processo epigenético que conduz ao silenciamento individual dos genes, através da inibição da expressão dos mesmos. A metilação observa-se, geralmente, em sequências dinucleotídeas CpG, situadas na região promotora do gene, designadas ilhas CpG e é observada em vários tipos de cancros, num vasto espectro de genes, em particular genes supressores do tumor. Em tecidos normais, as ilhas CpG apresentam-se geralmente no estado não metilado, permitindo a ligação dos fatores de transcrição e consequentemente, a expressão do gene associado. No CCR, assim como em outros cancros, a metilação das ilhas CpG inibe diretamente a ligação dos fatores de transcrição ou recruta proteínas repressoras da transcrição, que

alteram a estrutura da cromatina, tornando-a mais condensada e inacessível (heterocromatina) aos mecanismos de transcrição, impedindo desta forma a expressão dos genes. No CCR estão definidos dois painéis de cinco genes que se observam frequentemente metilados e, com base no número de genes metilados é possível definir o fenótipo metilador (CIMP). Deste modo, os CCRs podem ser divididos em três tipos distintos de CIMP: CIMP- alto, CIMP- baixo e CIMP - ausente. Os CCRs com CIMP-alto apresentam, geralmente, mutações no gene *BRAF* e estão também associados à instabilidade de microssatélites, enquanto os CCRs com CIMP baixo apresentam com frequência mutações no oncogene *KRAS*. Mutações no gene p53 estão associadas a CCRs sem CIMP.

Outra alteração no padrão de metilação que tem sido observada na carcinogênese cólon retal, é a hipometilação global do DNA. Esta refere-se à perda global do conteúdo 5' metilcitosina e observa-se geralmente nos dinucleotídeos CpG, situados em sequências repetidas do DNA. Esta perda pode contribuir para o desenvolvimento do CCR através da reativação dos elementos retrotransposônicos LINE-1, da ativação de oncogenes ou ainda, pela indução de um estado de instabilidade cromossomal.

As alterações na metilação do DNA têm sido associadas ao envelhecimento natural dos indivíduos, ao tabagismo e à dieta, importantes fatores de risco no desenvolvimento do CCR. Conclui-se assim, que o aumento da idade define uma pré-disposição para a metilação aberrante das ilhas CpG, que o tabagismo é responsável por alterações no padrão de metilação do DNA, sendo que, o genoma de indivíduos fumadores apresenta um maior número de locais CpG metilados e que mesmo após cessação tabágica, alguns desses locais permanecem metilados. Para além disto, alguns alimentos têm também sido apontados como fatores que afetam a metilação do DNA. Destes, o folato é talvez o melhor fator dietético estudado e sobre o qual se têm levantado muitas questões. Se por um lado está estabelecido que a deficiência de folato no organismo pode conduzir à carcinogênese e que a ingestão de suplementação em forma de ácido fólico pode ser usada como uma medida de prevenção, por outro sabe-se que esta estratégia só é válida na ausência de lesões neoplásicas e que quando estas estão presentes, a suplementação com ácido fólico vai aumentar o seu crescimento e progressão. Desta forma, os suplementos de ácido fólico, enquanto medicamentos não sujeitos a receita médica, podem representar um fator de risco no desenvolvimento do CCR, ou qualquer outro

tipo de cancro, devendo a carência de folato ser preferencialmente preenchida através de alimentos ricos em ácido fólico, tais como os brócolos e os espinafres.

Desta forma, a metilação do DNA pode ser claramente estabelecida como uma via distinta e alternativa no desenvolvimento e progressão do CCR.

O estudo epigenético do cancro permitiu o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que compreendem, até à data, duas classes de fármacos, os inibidores das enzimas DNMTs e os inibidores das enzimas HDACs. Os primeiros têm como alvo terapêutico a metilação do DNA e atuam na reversão da metilação responsável pelo silenciamento de genes supressores de tumor. Nos segundos, o alvo terapêutico é o processo de acetilação das histonas, em que os fármacos permitem que a cromatina fique acessível para transcrição, ocorrendo a expressão dos genes previamente silenciados. Apesar de já existirem alguns fármacos destas classes aceites pela FDA para o tratamento de síndromes mielodisplásicas, leucemias e linfomas, o uso destes em monoterapia demonstrou-se ineficaz em tumores sólidos, incluído o CCR. Desta forma, os estudos da terapia em tumores sólidos passaram a incidir na combinação de terapêuticas anticancerígenas convencionais juntamente com um fármaco epigenético, ou a combinação de vários fármacos epigenéticos. Estes estudos, que se encontram agora em fase I/II, parecem demonstrar que a presença dos fármacos epigenéticos sensibiliza as células para o agente citotóxico, permitindo uma maior eficácia na redução do tumor e a reversão de possíveis resistências. No entanto, de forma a serem validados e aceites pela FDA, estes novos agentes terapêuticos devem ser testados numa população mais heterogénea, em estádios mais iniciais da doença e a dose ideal e combinação de terapêutica devem ser otimizadas.

Em sumário, os mecanismos epigenéticos apresentam grande potencial na deteção precoce, *screening*, monitorização e predição de prognóstico ou resposta terapêutica nos pacientes com CCR. Futuras investigações neste campo poderão aumentar o conhecimento de como as alterações epigenéticas têm impacto no CCR e permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, mais eficazes em estádios mais precoces da doença

Bibliografia

- Abdelfatah, E., Kerner, Z., Nanda, N., & Ahuja, N. (2016). Epigenetic therapy in gastrointestinal cancer: the right combination. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 9(4), 560–579. <http://doi.org/10.1177/1756283X16644247>
- American Cancer Society. (2014). *Colorectal Cancer facts & Figures 2014-2016*. American Cancer Society. Atlanta: American Cancer Society.
- Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., & Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Research*, 5(1), 19–27. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603996>
- Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2015). Biology of colorectal cancer. *Ecancer Medicals Science*, 9(520), 1–20. <http://doi.org/10.3332/ecancer.2015.520>
- Azad, N., Zahnow, C. A., Rudin, C. M., & Baylin, S. B. (2013). The future of epigenetic therapy in solid tumours—lessons from the past. *Nat Rev Clin Oncol*, 10(5), 256–266. <http://doi.org/10.1038/nreclinonc.2013.42>.The
- Azevedo, S. A. X. (2011). O papel da via serreada na carcinogênese colo-rectal. *Arquivos de Medicina*, 25(5–6), 205–212. Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/pdf/am/v25n5-6/v25n5-6a07.pdf>
- Baluz, K., Carmo, M. das G. T. do C., & Rosas, G. (2002). O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48(4), 597–607. Disponível em http://www1.inca.gov.br/rbc/n_48/v04/pdf/revisao5.pdf
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. <http://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barchitta, M., Quattrocchi, A., Maugeri, A., Vinciguerra, M., & Agodi, A. (2014). LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 9(10), 1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0109478>

- Bardhan, K., & Liu, K. (2013). Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers*, 5(2), 676–713. <http://doi.org/10.3390/cancers5020676>
- Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8, 1–35. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>
- Benton, S. C., Seaman, H. E., & Halloran, S. P. (2015). Faecal Occult Blood Testing for Colorectal Cancer Screening : the Past or the Future. *GI ONCOLOGY*, 17(7), 1–9. <http://doi.org/10.1007/s11894-015-0428-2>
- Binefa, G., Rodríguez-moranta, F., Teule, À., & Medina-hayas, M. (2014). Colorectal cancer : From prevention to personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*, 20(22), 6786–6808. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6786>
- Boada, L. D., Luzardo, O. P., & Henríquez-Hernández, L. A. (2016). The impact of red and processed meat consumption on cancer and other health outcomes: Epidemiological evidences. *Food and Chemical Toxicology*, 92, 236–244. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.008>
- Boland, R. C., & Goel, A. (2010). Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073–2087. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>
- Bouguenouch, L., Samri, I., Belhassan, K., Sayel, H., Abbassi, M., Bennis, S., ... Ouldin, K. (2016). Case report- Syndrome de Lynch: à propos d'un cas et revue de la littérature. *PanAfrican Medical Journal*, 24, 1–5. <http://doi.org/10.11604/pamj.2016.24.142.4398>
- Breitling, L. P., Yang, R., Korn, B., Burwinkel, B., & Brenner, H. (2011). Tobacco-Smoking-Related Differential DNA Methylation : 27K Discovery and Replication. *The American Journal of Human Genetics*, 88(4), 450–457. <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.03.003>
- Carethers, J. M., & Jung, B. H. (2016). Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 149(5), 1177–1190. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.06.047>
- Centelles, J. J. (2012). General aspects of colorectal cancer. *ISRN Oncology*, 2012, 1–

19. <http://doi.org/10.5402/2012/139268>
- Chen, J., Giovannucci, E., Kelsey, K., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., ... Hunter, D. J. (1996). A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 56(21), 4862–4864. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895734>
- Conteduca, V., Sansonno, D., Russi, S., & Dammacco, F. (2013). Precancerous colorectal lesions (Review). *International Journal of Oncology*, 43(4), 973–984. <http://doi.org/10.3892/ijo.2013.2041>
- Coppede, F. (2014). The role of epigenetics in colorectal cancer. *Expert Reviews, Gastroenterol Hepatol*, 8(8), 935–948. <http://doi.org/10.1586/17474124.2014.924397>
- Cui, H. (2007). Loss of imprinting of IGF2 as an epigenetic marker for the risk of human cancer. *Disease Markers*, 23(1–2), 105–112. <http://doi.org/10.1155/2007/363464>
- Derissen, E. J. B., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2013). Concise Drug Review: Azacitidine and Decitabine. *The Oncologist*, 18, 619–624. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0465>
- Durko, L., & Malecka-panas, E. (2014). Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 10, 45–54. <http://doi.org/10.1007/s11888-013-0203-4>
- Duthie, S. J. (1999). Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *British Medical Bulletin*, 55(3), 578–592. <http://doi.org/10.1258/0007142991902646>
- East, J. E., Vieth, M., & Rex, D. K. (2015). Serrated lesions in colorectal cancer screening: detection, resection, pathology and surveillance. *GUT Recent Advances In Clinical Practice*, 64(9), 1–10. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-309041>
- Ellis, L., Atadja, P. W., & Johnstone, R. W. (2009). Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(6), 1409–1420. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0860>

- Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21(35), 5427–40. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1205600>
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148–1156. <http://doi.org/10.1056/NEJMra072067>
- Fahy, J., Jeltsch, A., & Arimondo, P. B. (2012). DNA methyltransferase inhibitors in cancer : a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies. *Expert Opinion*, 22(12), 1–16. <http://doi.org/10.1517/13543776.2012.729579>
- Farahmand, L., Daevishi, B., Majidzadeh-A, K., & Madjid Ansari, A. (2016). Naturally occurring compounds acting as potent metastatic agents and their suppressing effects on Hedgehog and WNT / β - - catenin signalling pathways. *Cell Proliferation*, 1–12. <http://doi.org/10.1111/cpr.12299>
- Fearon, E. F., & Vogelstein, B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)
- Ferlay, Jacques.; Shin, Hai-Rim.; Bray, Freddie.; Forman, David.; Mathers, Colin.; Parkin, D. . (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008 : GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893–2917. <http://doi.org/10.1002/ijc.25516>
- Fletcher, R. H. (2009). The diagnosis of colorectal cancer in patients with symptoms : finding a needle in a haystack. *Biomed Central*, 7(18), 3–5. <http://doi.org/10.1186/1741-7015-7-18>
- Forno, S. E. A. do, Poças, F. C., & Matos, M. E. G. D. dos S. (2012). O cancro colorretal e o rastreio : conhecimentos e atitudes dos portuenses. *Jornal Português de Gastreenterologia*, 19(3), 118–125.
- Gallois, C., Laurent-puig, P., & Taieb, J. (2015). Methylator phenotype in colorectal cancer: A prognostic factor or not? *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 99, 74–80. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.11.001>
- Genetics Home Reference. (2016). APC gene. Disponível Julho 22, 2016, em

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/APC>

- George, F. H. M. (2014). Norma da Direcção - Geral da Saúde 003/2014. *Direcção - Geral Da Saúde*, pp. 1–12.
- Gezer, U., & Holdenrieder, S. (2014). Post-translational histone modifications in circulating nucleosomes as new biomarkers in colorectal cancer. *In Vivo*, 28(3), 287–292. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24815828>
- Giardiello, F. M., Allen, J. I., Axilbund, J. E., Boland, C. R., Burke, C. A., Burt, R. W., ... Rex, D. K. (2014). Guidelines on genetic evaluation and management of lynch syndrome: A consensus statement by the us multi-society task force on colorectal cancer. *Gastroenterology*, 147(2), 502–526. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.04.001>
- Gibson, J. A., & Odze, R. D. (2016). Pathology of premalignant colorectal neoplasia. *Digestive Endoscopy*, 28(3), 312–323. <http://doi.org/10.1111/den.12633>
- Giglia, M. D., & Chu, D. I. (2016). Familial Colorectal Cancer : Understanding the Alphabet Soup. *Clin Colon Rectal Surg*, 29(3), 185–195. <http://doi.org/10.1055/s-0036-1584290>
- Gnyszka, A., Jastrzębski, Z., & Flis, S. (2013). DNA Methyltransferase Inhibitors and Their Emerging Role in Epigenetic Therapy of Cancer. *Anticancer Research*, 33, 2989–2996. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23898051>
- Goel, A., & Boland, C. R. (2012). Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 143(6), 1442–1460. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.032>.Epigenetics
- Goffin, J., & Eisenhauer, E. (2002). DNA methyltransferase inhibitors — state of the art. *Annals of Oncology*, 13(11), 1699–1716. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdf314>
- Gołąbek, K., Strzelczyk, J. K., Wiczowski, A., & Michalski, M. (2015). Potential use of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Contemporary Oncology*, 19(6), 436–440. <http://doi.org/10.5114/wo.2015.51824>
- Gonzalez, C. A. (2006). Nutrition and cancer: the current epidemiological evidence. *Br J Nutr*, 96(1), S42–S45. <http://doi.org/S0007114506002339> [pii]

- Gonzalo, V., Castellví-bel, S., Balaguer, F., Pellisé, M., & Ocaña, T. (2008). Epigenética del cáncer. *Gastroenterol Hepatol*, 31(1), 37–45. <http://doi.org/10.1157/13114573>
- Graça, I., Pereira-silva, E., Henrique, R., Packham, G., Crabb, S. J., & Jerónimo, C. (2016). Epigenetic modulators as therapeutic targets in prostate cancer. *Clinical Epigenetics*, 8(98), 1–24. <http://doi.org/10.1186/s13148-016-0264-8>
- Gros, C., Fahy, J., Halby, L., Dufau, I., Erdmann, A., Gregoire, J., ... Arimondo, P. B. (2012). Biochimie DNA methylation inhibitors in cancer: Recent and future approaches. *Biochimie*, 94(11), 2280–2296. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.025>
- Guo, X., Wang, Y., Zhao, H., Song, S., Zhou, J., & Han, Y. (2013). Association of MTHFR C677T polymorphisms and colorectal cancer risk in Asians: evidence of 12,255 subjects. *Clin Transl Oncol*, 16(623). <http://doi.org/10.1007/s12094-013-1126-x>
- Haggar, F. A., & Boushey, R. P. (2009). Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 22(212), 191–197. <http://doi.org/10.1055/s-0029-1242458>.
- Hamilton, W., Round, A., Sharp, D., & Peters, T. J. (2005). Clinical features of colorectal cancer before diagnosis: a population-based case – control study. *British Journal of Cancer*, 93(4), 399–405. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602714>
- Hamilton, W., Walter, F. M., Rubin, G., & Neal, R. D. (2016). Improving early diagnosis of symptomatic cancer. *Nature Reviews*, 1–10. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.109>
- Hamoya, T., Fujii, G., Miyamoto, S., Takahashi, M., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., ... Mutoh, M. (2016). Effects of NSAIDs on the risk factors of colorectal cancer: a mini review. *Genes and Environment*, 38(6), 1–7. <http://doi.org/10.1186/s41021-016-0033-0>
- Harrington, K. J. (2015). The biology of cancer. *Medicine*, 44(1), 1–5. <http://doi.org/10.1016/j.mpmed.2015.10.005>

- Hinoue, T., Weisenberger, D. J., Lange, C. P. E., Shen, H., Byun, H., Berg, D. Van Den, ... Laird, P. W. (2012). Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Research*, 22(2), 271–282. <http://doi.org/10.1101/gr.117523.110.22>
- Højfeldt, J. W., Agger, K., & Helin, K. (2013). Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(2), 917–930. <http://doi.org/10.1038/nrd4154>
- Huang, Y.-W., Kuo, C.-T., Stoner, K., Huang, T. H.-Y., & Wang, L.-S. (2011). An overview of Epigenetics and Chemoprevention. *FEBS Letters*, 585(13), 2129–2136. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.002>
- Hubner, R. a, & Houlston, R. S. (2009). Folate and colorectal cancer prevention. *British Journal of Cancer*, 100(2), 233–239. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604823>
- Hull, E. E., Montgomery, M. R., & Leyva, K. J. (2016). HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System : Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases. *BioMed Research International*, 2016, 1–15. <http://doi.org/10.1155/2016/8797206>
- Ijspeert, J. E. G., Vermeulen, L., Meijer, G. A., & Dekker, E. (2015). Serrated neoplasia - Role in Colorectal carcinogenesis and clinical implications. *Nature Reviews*, 12, 401–409. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.73>
- Imai, K., & Yamamoto, H. (2008). Carcinogenesis and microsatellite instability: The interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*, 29(4), 673–680. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgm228>
- Ishiguro, M., Iida, S., Uetake, H., Morita, S., Makino, H., Kato, K., ... Sugihara, K. (2006). Effect of Combined Therapy With Low-Dose 5-Aza-2'-Deoxycytidine and Irinotecan on Colon Cancer Cell HCT-15. *Annals of Surgical Oncology*, 14(5), 1752–1762. <http://doi.org/10.1245/s10434-006-9285-4>
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33, 245–254. <http://doi.org/10.1038/ng1089>

- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics. *CA CANCER J CLIN*, *61*(2), 69–90. <http://doi.org/10.3322/caac.20107>. Available
- Joehanes, R., Just, A. C., Marioni, R. E., Pilling, L. C., Reynolds, L. M., Mandaviya, P. R., ... Si, B. (2016). Epigenetic Signatures of Cigarette Smoking. *Circulation: Cardiovascular Genetic*, *9*(5), 436–447. <http://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.116.001506>
- John, S. K. P., George, S., Primrose, J. N., & Fozard, J. B. J. (2010). Symptoms and signs in patients with colorectal cancer. *The Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, *13*(1), 17–25. <http://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2010.02221.x>
- Juergens, R. A., Wrangle, J., Vendetti, F. P., Murphy, S. C., Zhao, M., Coleman, B., ... Charles, M. (2012). Combination Epigenetic Therapy Has Efficacy in Patients with Refractory Advanced Non Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.*, *1*(7), 598–607. <http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0214>
- Juo, Y.-Y., Gong, X.-J., Baylin, S. B., Azad, N. S., & Ahuja, N. (2015). Epigenetic therapy for solid tumors : from bench science to clinical trials. *Epigenomics*, *7*(2), 215–234. <http://doi.org/10.2217/epi.14.73>
- Kaneda, A., & Feinberg, A. P. (2005). Loss of imprinting of IGF2: A common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Research*, *65*(24), 11236–11240. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2959>
- Kaneda, A., Tsukamoto, T., Takamura-Enya, T., Watanabe, N., Kaminishi, M., Sugimura, T., ... Ushijima, T. (2004). Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Science*, *95*(1), 58–64. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03171.x>
- Khatibzadeh, N., Ziaee, S., Rahbar, N., Molanie, S., Arefian, L., & Fanaie, S. (2005). The indirect role of site distribution in high- grade dysplasia in adenomatous colorectal polyps. *J Cancer Res Ther*, *1*(4), 204–207. <http://doi.org/10.4103/0973-1482.19587>

- Kim, J., Ae Cho, Y., Kim, D.-H., Lee, B.-H., Hwang, D.-Y., Jeong, J., ... Ahn, Y.-O. (2012). Dietary intake of folate and alcohol , MTHFR C677T polymorphism , and colorectal cancer risk in Korea. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(3), 405–412. <http://doi.org/10.3945/ajcn.111.020255>
- Kim, M. S., Lee, J., & Sidransky, D. (2010). DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 29(1), 181–206. <http://doi.org/10.1007/s10555-010-9207-6>
- Kim, Y.-I. (2004). Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: Lessons from animal studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(1), 10–25. <http://doi.org/10.1002/em.20025>
- Kleinschmidt, A., Klopp, N., Zeilinger, S., Ku, B., Gieger, C., Weidinger, S., ... Illig, T. (2013). Tobacco Smoking Leads to Extensive Genome-Wide Changes in DNA Methylation. *PLOS ONE*, 8(5), 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0063812>
- Kolligs, F. T. (2016). Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Visceral Medicine*, 32(3), 158–164. <http://doi.org/10.1159/000446488>
- Konishi, F., & Morson, B. (1982). Pathology of colorectal adenomas: a colonoscopic survey. *J Clin Pathol*, 35(8), 830–841. <http://doi.org/10.1136/jcp.35.8.830>
- Kono, S., & Chen, K. (2005). Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma. *Cancer Science*, 96(9), 535–542. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00090.x>
- Kunjumodeen, K. (2014). History of Cancer. *Mediceworld.org*, 1–8. Disponível em <http://medicineworld.org/cancer/history.pdf>
- Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G. D., Mosconi, S., Cervantes, A., & Arnold, D. (2013). clinical practice guidelines Early colon cancer : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis , treatment and follow-up † clinical practice guidelines. *Clinical Practice Guidelines*, 24(6), 64–71. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdt354>
- Lakshmaiah, K. C., Jacob, L. A., Aparna, S., Lokanatta, D., & Saldanha, S. C. (2014). Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(3), 469–478. <http://doi.org/10.4103/0973->

1482.137937

- Langevin, S. M., Lin, D., Matsuo, K., Gao, C. M., Takezaki, T., Stolzenberg-Solomon, R. Z., ... Taioli, E. (2009). Review and pooled analysis of studies on MTHFR C677T polymorphism and esophageal cancer. *Toxicology Letters*, *184*(2), 73–80. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.09.003>
- Lao, V. V., & Grady, W. M. (2011). Epigenetic and Colorectal Cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *8*(12), 686–700. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.173>.
- Lee, V., Murphy, A., Le, D. T., & Diaz, L. A. (2016). Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade. *The Oncologist*, *21*(10), 1–12. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0046>
- Leggett, B., & Whitehall, V. (2010). Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*, *138*(6), 2088–2100. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.066>
- Levin, B. L., & Varga, E. (2016). MTHFR : Addressing Genetic Counseling Dilemmas Using Evidence-Based Literature. *Journal of Genetic Counseling*, *25*(5), 901–911. <http://doi.org/10.1007/s10897-016-9956-7>
- Lieberman, D. (2012). Colorectal Cancer Screening : Practice Guidelines. *Digestive Diseases*, *30*(2), 34–38. <http://doi.org/10.1159/000341891>
- Liu, L., Kimball, S., Liu, H., & Holowatyj, A. (2014). Genetic alterations of histone lysine methyltransferases and their significance in breast cancer. *Oncotarget*, *6*(4), 2466–2482. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.2967>
- Losso, G. M., Moraes, R. da S., Gentili, A. C., & Messias- Reason, I. T. (2012). Microsatellite instability - MSI Markers (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) in rectal cancer. *ABCD Arq Bras Cir Dig*, *25*(4), 240–244. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0102-67202012000400006>
- Macdonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Review Wnt / b -Catenin Signaling : Components , Mechanisms , and Diseases. *Developmental Cell*, *17*(1), 9–26. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- Mariadason, J. M. (2008). HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics*,

- 3(1), 28–37. <http://doi.org/10.4161/epi.3.1.5736>
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular Origins of Cancer. *N Engl J Med.*, 361(25), 2449–2460. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0804588>.
- Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., & Copped, F. (2011). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–19. <http://doi.org/10.1155/2011/792362>
- Miki, Y., Nishisho, I., Horri, A., Miyoshi, Y., Utsunomiya, J., Kinzler, K., ... Nakamura, Y. (1992). Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res.*, 52(3), 643–645. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1310068>
- Miousse, I. R., & Koturbash, I. (2015). The Fine LINE: Methylation Drawing the Cancer Landscape. *BioMed Research International*, 2015, 1–8. <http://doi.org/10.1155/2015/131547>
- Miranda, N., & Portugal, C. (2016). *Portugal - Doenças Oncológicas em Números – 2015*. Lisboa: Direção Geral da Saúde.
- Miyaki, Y., Suzuki, K., Koizumi, K., Kato, T., & Saito, M. (2012). Identification of a potent epigenetic biomarker for resistance to camptothecin and poor outcome to irinotecan-based chemotherapy in colon cancer. *International Journal of Oncology*, 40(1), 217–226. <http://doi.org/10.3892/ijo.2011.1189>
- Mundade, R., Imperiale, T. F., Prabhu, L., Loehrer, P. J., & Lu, T. (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 1(6), 400–406. <http://doi.org/10.1056/NEJM199412223312501>
- Naccarati, A., Polakova, V., Pardini, B., Vodickova, L., Hemminki, K., Kumar, R., & Vodicka, P. (2012). Mutations and polymorphisms in TP53 gene - An overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis*, 27(2), 211–218. <http://doi.org/10.1093/mutage/ger067>
- Nebbioso, A., Carafa, V., Benedetti, R., & Altucci, L. (2012). Trials with “ epigenetic ” drugs: An update. *Molecular Oncology*, 6(6), 657–682. <http://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.09.004>

- Pal, S., & Tyler, J. (2016). Epigenetics and aging. *Sci. Adv.*, 2(7), 1–19. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2009.12.007>
- Palomba, G., Cossu, A., Paliogiannis, P., Pazzola, A., Baldino, G., Scartozzi, M., ... Palmieri, G. (2016). Prognostic role of KRAS mutations in Sardinian patients with colorectal carcinoma. *Oncology Letters*, 12(2), 1415–1421. <http://doi.org/10.3892/ol.2016.4798>
- Parsa, N. (2012). Environmental Factors Inducing Human Cancers. *Iranian J Publ Health*, 41(11), 1–9. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3521879/>
- Pawlik, T. M., Raut, C. P., & Rodriguez-Bigas, M. A. (2004). Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Disease Markers*, 20(4–5), 199–206. <http://doi.org/10.1155/2004/368680>
- Pellegrini, M., Argibay, P., & Gomez, D. (2010). Correlation of obesity and osteoporosis : Effect of free fatty acids on bone marrow-derived mesenchymal stem cell differentiation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(4), 241–250. <http://doi.org/10.3892/etm>
- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2059–2072. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.065>.
- Pisanic II, T. R., Athamanolap, P., & Wang, T. (2016). Defining, distinguishing and detecting the contribution of heterogeneous methylation to cancer heterogeneity. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.030>
- Potter, J. D. (1999). Colorectal Cancer : Molecules and Populations. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(11), 916–932. <http://doi.org/10.1093/jnci/91.11.916>
- Ree, A. H., Dueland, S., Folkvord, S., Hole, K. H., Seierstad, T., Johansen, M., ... Flatmark, K. (2010). Vorinostat , a histone deacetylase inhibitor , combined with pelvic palliative radiotherapy for gastrointestinal carcinoma : the Pelvic Radiation and Vorinostat (PRAVO) phase 1 study. *Lancet Oncology*, 11(5), 459–464. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70058-9](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70058-9)

- Reis, A. H. O., Vargas, F. R., & Lemos, B. (2016). Biomarkers of genome instability and cancer epigenetics. *Tumor Biology*, 37(10), 13029–13038. <http://doi.org/10.1007/s13277-016-5278-5>
- Rossi, A., Daniele, N. Di, Melino, G., & Annicchiarico, M. (2015). DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *AGING*, 7(12), 1050–1065. <http://doi.org/10.18632/aging.100858>
- Rothschild, B., Tanke, D., Helbing, M., & Martin, L. (2003). Epidemiologic study of tumors in dinosaurs. *Naturwissenschaften*, 90(11), 495–500. <http://doi.org/10.1007/s00114-003-0473-9>
- Rountree, M. R., Bachman, K. E., Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2001). DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene*, 20(24), 3156–3165. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1204339>
- Saavedra, K., Molina-márquez, A. M., Saavedra, N., Zambrano, T., & Salazar, L. A. (2016). Epigenetic Modifications of Major Depressive Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1–20. <http://doi.org/10.3390/ijms17081279>
- Sameer, A. S. (2013). Colorectal Cancer: Molecular Mutations and Polymorphisms. *Frontiers in Oncology*, 3(114), 1–8. <http://doi.org/10.3389/fonc.2013.00114>
- Sanderson, P., Stone, E., Kim, Y.-I., Mathers, J. C., Kampman, E., Downes, C. S., ... Baron, J. A. (2007). Folate and colo-rectal cancer risk. *The British Journal of Nutrition*, 98(6), 1299–304. <http://doi.org/10.1017/S0007114507771908>
- Seeley, R. R., Stephen, T. D., & Tate, P. (2001). *Anatomia & Fisiologia* (3ª Edição). Lisboa: Lusodidacta.
- Segman, N., Patnick, J., & von Karsa, L. (2010). *European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis First*. Luxemburgo: Publicationns Office of the Europe Union.
- Sehgal, R., Sheahan, K., O’Connell, P. R., Hanly, A. M., Martin, S. T., & Winter, D. C. (2014). Lynch Syndrome: An updated review. *Genes*, 5(3), 497–507. <http://doi.org/10.3390/genes5030497>
- Shannon, B., Granasampanthan, S., Beilby, J., & Lacopecta, B. (2002). A

- polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut*, 50(4), 520–524. <http://doi.org/10.1136/gut.50.4.520>
- Sharma, S. V, Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P., Maheswaran, S., Mcdermott, U., ... Settleman, J. (2010). A chromatin-mediated reversible drug tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*, 141(1), 69–80. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.027.A>
- Sharp, L., & Little, J. (2004). Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review, 159(5), 423–443. <http://doi.org/10.1093/aje/kwh066>
- Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., ... Issa, J.-P. J. (2007). Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18654–18659. <http://doi.org/10.1073/pnas.0704652104>
- Shenoy, S. (2016). Genetic risks and familial associations of small bowel carcinoma. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 8(6), 509–519. <http://doi.org/10.4251/wjgo.v8.i6.509>
- Shiller, M., & Boostrom, S. (2015). The Molecular Basis of Rectal Cancer. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 28(1), 53–60. <http://doi.org/10.1055/s-0035-1545070>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2016). Cancer Statistics , 2016. *CA CANCER J CLIN*, 66(1), 7–30. <http://doi.org/10.3322/caac.21332>
- Silva, F. C. D. S., Wernhoff, P., Dominguez-barrera, C., & Dominguez-valentin, M. E. V. (2016). Update on Hereditary Colorectal Cancer. *Anticancer Research*, 36(9), 4399–4406. <http://doi.org/10.21873/anticanres.10983>
- Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging*, 11, 967–976. <http://doi.org/10.2147/CIA.S109285>
- Soreide, K., Nedrebo, B. S., Reite, A., Thorse, K., & Korner, H. (2009). Endoscopy,morphology,morphometry and molecular markers : predicting cancer risk in colorectal adenoma. *Expert Reviews*, 9(2), 125–137.

<http://doi.org/10.1586/14737159.9.2.125>.

- Sousa, R., Lage, P., Ferreira, S., Claro, I., Francisco, I., Filipe, B., ... Nobre-Leitão, C. (2007). Necessidade de novos critérios clínicos: Para a identificação de famílias com síndrome de lynch em base genética. *Acta Medica Portuguesa*, 20(6), 535–541.
- Steele, N., Finn, P., Brown, R., & Plumb, J. A. (2009). Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity in vivo. *British Journal of Cancer*, 100(5), 758–763. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604932>
- Stirzaker, C., Song, J. Z., Ng, W., Du, Q., Armstrong, N. J., Locke, W. J., ... Zotenko, E. (2016). Methyl-CpG-binding protein MBD2 plays a key role in maintenance and spread of DNA methylation at CpG islands and shores in cancer. *Oncogene*, 1–11. <http://doi.org/10.1038/onc.2016.297>
- Strum, W. B. (2016). Colorectal Adenomas. *The New England Journal of Medicine*, 374(11), 1065–1075. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1513581>
- Tarayrah, L., & Chen, X. (2013). Epigenetic regulation in adult stem cells and cancers. *Cell & Bioscience*, 3(1), 2--10. <http://doi.org/10.1186/2045-3701-3-41>
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J., Baylin, S. B., & Issa, J.-P. J. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Medical Sciences*, 96(4), 8681–8686. <http://doi.org/10.11569/wcjd.v24.i4.558>
- Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Rüschoff, J., ... Srivastava, S. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(4), 261–268. <http://doi.org/10.1093/jnci/djh034>
- Vaiopoulos, A. G., Athanasoula, K. C., & Papavassiliou, A. G. (2014). Biochimica et Biophysica Acta Epigenetic modifications in colorectal cancer: Molecular insights and therapeutic challenges. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1842(7), 971–980. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.02.006>
- Varela-Rey, M., Woodhoo, A., Martinez-Chantar, M.-L., Mato, J. M., & Lu, S. C.

- (2013). Alcohol, DNA methylation, and cancer. *Alcohol Research : Current Reviews*, 35(1), 25–35. <http://doi.org/10.4067/S0370-41062008000700008>
- Wan, E. S., Qiu, W., Baccarelli, A., Carey, V. J., Bacherman, H., Rennard, S. I., ... Demeo, D. L. (2012). Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome. *Hu*, 21(13), 3073–3082. <http://doi.org/10.1093/hmg/dds135>
- Wang, W., Cui, S., Lu, R., & Zhang, H. (2016). Is there any therapeutic value for the use of histone deacetylase inhibitors for chronic pain? *Brain Research Bulletin*, 125(145), 44–52. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.04.010>
- Weingberg, R. A. (2014). *The Biology of Cancer* (2^a edição). New York: Garland Science.
- Wolin, K. Y., Yan, Y., Colditz, G. A., & Lee, I. (2009). Physical activity and colon cancer prevention : a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 100(4), 611–616. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604917>
- Wong, J. J. L., Hawkins, N. J., & Ward, R. L. (2007). Colorectal cancer: a model for epigenetic tumorigenesis. *Gut*, 56(1), 140–148. <http://doi.org/10.1136/gut.2005.088799>
- Yamane, L., Scapulatempo-neto, C., Reis, R. M., Guimarães, D. P., Yamane, L., Reis, R. M., & Guima-, D. P. (2014). Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(10), 2634–2640. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i10.2634>
- Yang, Z., Zhang, X., Liu, H., & Zhao, C. (2012). MTHFR C677T Polymorphism and Colorectal Cancer Risk in Asians , a Meta-analysis of 21 Studies. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 1203–1208. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.4.1203>
- Yin, G., Kono, S., Toyomura, K., Hagiwara, T., Nagano, J., Mizoue, T., ... Imaizumi, N. (2004). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and colorectal cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Science*, 95(11), 908–913. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb02201.x>

- Zambirinis, C. P., Theodoropoulos, G., & Gazouli, M. (2009). Undefined familial colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 1(1), 12–20. <http://doi.org/10.4251/wjgo.v1.i1.12>
- Zhang, C., Lv, J., Gong, L., Yu, L., & Chen, X. (2016). Role of Deficient Mismatch Repair in the Personalized Management of Colorectal Cancer. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(9), 1–17. <http://doi.org/10.3390/ijerph13090892>
- Zhao, M., Li, X., Xing, C., & Zhou, B. (2013). Association of methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms with colorectal cancer risk: A meta-analysis. *Biomedical Reports*, 1(5), 781–791. <http://doi.org/10.3892/br.2013.134>
- Zhou, Y., Abel, G. A., Hamilton, W., Pritchard-jones, K., Gross, C. P., Walter, F. M., ... Lyratzopoulos, G. (2016). Diagnosis of cancer as an emergency: a critical review of current evidence. *Nature Publishing Group*, 1–12. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.155>