

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa



Ciências
ULisboa

**Papel da desregulação da via
Wnt- β -catenina-TCF no
desenvolvimento de cancro
colorretal**

U.C.: Regulação da Expressão Génica

Pedro Ribeiro nº 47734
Tatiana Saraiva nº 53556

Mestrado em Bioquímica Clínica
Ano Letivo 2018/2019

Índice

Introdução.....	3
Via de sinalização Wnt	3
Via inativa.....	4
Via Ativa	5
Regulação dos Fatores de Transcrição TCF	5
Cancro Colorretal (CCR)	6
Desregulação dos Componentes da Via.....	8
Mudanças Moleculares	8
Mutações nos componentes da via.....	8
Genes Alvo Propiciadores do CCR.....	10
Perspetivas de Tratamento	10
Desenvolvimento de Fármacos	10
Terapia genética	11
Referências.....	13
Anexos.....	14

Introdução

A patologia oncológica é uma doença que afeta grande parte da população mundial, devido às suas características invasivas. Atualmente, é uma das maiores causas de morte e um enorme desafio para a Ciência. De entre os diversos tipos de tumores, o cancro colorretal (CCR), um tumor maligno invasivo, é o 3º cancro mais comum a seguir ao cancro da mama e da próstata, com uma taxa de incidência acima dos 30 casos por 100.000 habitantes em Portugal, afetando mais os homens do que as mulheres (dados do Instituto CUF de Oncologia).

O CCR começa frequentemente num pólipó, ou seja, um crescimento anómalo de tecido epitelial na parede do intestino.

A nível bioquímico, de entre as vias potencialmente desencadeadoras desta carcinogénese, destaca-se a ativação aberrante da via de sinalização Wnt (*The Wingless-type MMTV integration site family*) que, para além de ser um fator essencial na iniciação da carcinogénese do cólon, é uma força potenciadora da sua progressão.

A via de sinalização Wnt foi inicialmente descoberta pelo seu papel na carcinogénese do cólon e mama e no desenvolvimento da *Drosophila* e outros organismos eucarióticos.¹ Esta via promove a proliferação epitelial do intestino e a diferenciação da cripta intestinal. Caso ocorra desregulação das proteínas efetoras da via, devido por exemplo a mutações, observar-se-á então uma proliferação descontrolada nestes tecidos. As vias envolvidas no desenvolvimento do CCR estão esquematicamente representadas na Figura 3, colocada em anexo.

Uma das novas formas de prevenção/tratamento deste tipo de alteração celular é atuando diretamente nos genes afetados, prevenindo assim a formação de um fenótipo alterado. No entanto, ainda são necessários diversos estudos para que no futuro possa ser usada em pacientes afetados, tanto sozinha ou combinada com técnicas atualmente utilizadas como quimioterapia ou radioterapia.

Via de sinalização Wnt

A sinalização Wnt tem um papel essencial no desenvolvimento embrionário, controlando a proliferação, renovação de células estaminais, decisão do destino celular e vários outros processos críticos para um bom desenvolvimento do intestino.² Mais tarde, esta via participa na regeneração de tecidos em organismos adultos.³ Devido ao seu papel importante na regulação do destino e homeostase celular, mutações em

componentes da via Wnt estão fortemente associadas à tumorigênese.² Sabe-se atualmente que esta via não só interage também com outras vias presentes na organogênese, mas também está envolvida na regulação da expressão de genes de hormonas e na homeostase do metabolismo. Assim, anormalidades no seu funcionamento pode levar ao desenvolvimento de outras doenças para além de tumores, incluindo a diabetes tipo 2.¹

A via Wnt pode dividir-se em 3 vias de sinalização bem caracterizadas: a via canónica, a via de polaridade planar celular não canónica e a via Wnt/cálcio não canónica. O que distingue a via canónica das não canónicas é o envolvimento da proteína β -catenina, funcionando as vias não canónicas independentemente desta.⁴

A via de sinalização Wnt canónica que envolve a β -catenina e membros da família de fatores de transcrição TCF (*T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor*) é a força motriz do desenvolvimento do CCR e está representada esquematicamente na Figura 1. Para simplificar, a partir de agora iremos referir-nos a esta família apenas como TCF.

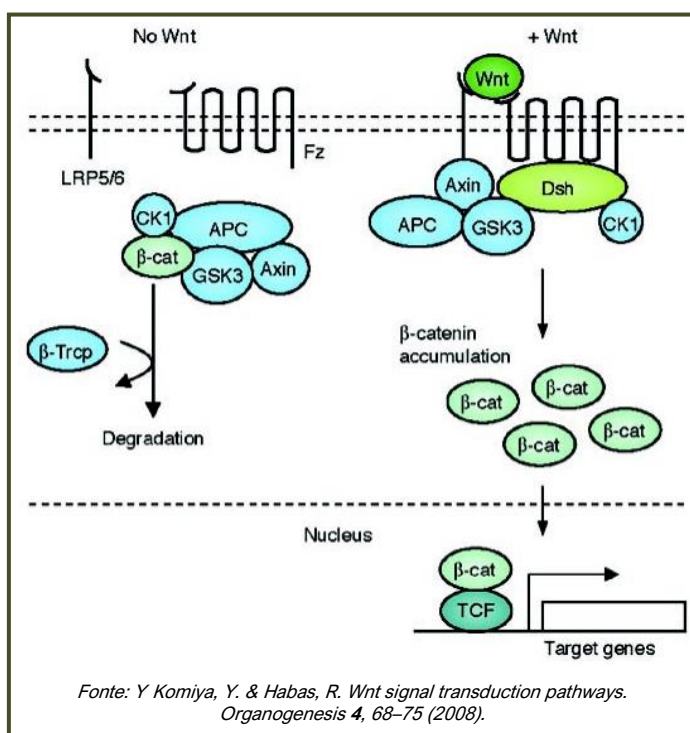


Figura 1: Via de sinalização Wnt Canónica - Na ausência de um sinal WNT, ocorre a formação de um complexo multiproteico que leva à fosforilação e consequente degradação da catenina no proteossoma. A APC e a axin servem como o “scaffold”, enquanto GSK-3 e CK-1 α fosforilam certos resíduos de serina e treonina da β -catenina. Uma vez fosforilada, será ubiquitinada e degradada pelo proteossoma. No entanto, na presença de uma estimulação WNT este complexo multiproteico é recrutado para a membrana e a β -catenina não é fosforilada, acumulando-se no citoplasma. Esta catenina livre será

então translocada para o núcleo e levará à transcrição de genes alvo, entre os quais CCND1 e MYC.

Via inativa

Na via canónica, a ausência de ligandos leva à fosforilação da β -catenina pelo complexo de destruição, que é constituído pelos supressores tumorais, Axin e *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), as cinases de serina e treonina GSK-3 e CK1,

proteína fosfatase A (PP2A), e a E3-ubiquitina ligase β -TrCP. O complexo gera um local de reconhecimento para a β -TrCP através da fosforilação perto do terminal N da β -catenina. Primeiro é fosforilada a serina 45 pela CK1 e depois as serinas 33, 37 e a treonina 41 pela GSK-3.⁵ Esta fosforilação sequencial necessita de ser coordenada e é feito através da Axin que atua com *scaffold* das cinases e da β -catenina. Após esta proteína ser ubiquitinada, vai ser degradada pelo proteassoma.⁶ Sem β -catenina nuclear, os TCF estão associados à proteína Groucho e este complexo vai reprimir a transcrição de genes alvo através do recrutamento de histonas deacetilases.^{2,7}

Via Ativa

A via é ativada com a interação dos ligandos Wnt a recetores membranares Frizzled e co-recetores LRP5/6. Esta interação resulta no recrutamento para a membrana de proteínas Dishevelled com função de *scaffolding*, que leva, por sua vez, à fosforilação do LRP5/6 e ao recrutamento de axin e GSK-3, afastando-os do complexo de destruição. Esta destabilização do complexo vai resultar na estabilização e acumulação de β -catenina que é translocada para o núcleo. Aqui, esta proteína vai afastar a Groucho e vão se formar complexos de TCF/ β -catenina, recrutando co-ativadores e ativando a transcrição dos genes alvo.^{2,7}

Regulação dos Fatores de Transcrição TCF

A família de fatores de transcrição TCF é a principal parceira da β -Catenina na regulação da expressão génica. Nesta família estão o TCF1, LEF, TCF3 e TCF4 e estes exibem padrões de splicing alternativo, uso de promotores alternativos e ambas atividades de repressão e ativação. Os TCF interagem com o repressor *Groucho*, promovendo a deacetilação de histonas e a compactação da cromatina, reprimindo a expressão. A estabilização e acumulação de β -catenina nuclear, resultante da ativação da via, vai afastar o *Groucho* e são recrutados outros co-ativadores para ativação da transcrição de determinados genes alvo.⁷

Os TCF têm diversos domínios importantes para a sua atividade. Um deles é o domínio de ligação à β -catenina no terminal N. A ligação a este domínio conservado induz mudanças conformacionais noutra região do fator. O domínio regulatório dependente de contexto é o mais variado e é o local onde se liga o Groucho resultando num efeito repressor. O seu nome reflete bem a sua função visto que dependendo das suas interações com outras moléculas vai ter um efeito repressor ou ativador.

Adicionalmente tem um domínio de ligação do DNA *high mobility group* (HMG)

que é o mais conservado de todos. Este liga-se ao *Wnt responsive element* (WRE) que tem uma sequência consensus CCTTTGWW (em que W representa ou T ou A) e isto resulta num *bending* do DNA, alterando a estrutura local da cromatina. Estes TCF apresentam alguma diversidade no seu terminal C dependendo de processos de *splicing* alternativo. A relevância destas diferentes caudas ainda está a ser estudada e só os genes da TCF1 e TCF4 codificam para este segundo domínio de ligação ao DNA e apenas como uma isoforma de *slicing* alternativo.⁸

Existem diversos mecanismos de regulação da transcrição de TCF/ β -Catenina. Um deles é o padrão de expressão dos TCF e as isoformas resultantes. No cólon humano normal estes são diferentes dos presentes no cancro do cólon. Por exemplo, em situações normais o TCF1 funciona como um supressor do cancro intestinal, sendo um antagonista do TCF4 na renovação celular, mas em células cancerígenas do cólon o TCF1 e TCF4 são ambas formas promotoras da via Wnt.²

Adicionalmente, antagonistas nucleares como Chibby e ICAT ligam-se à β -Catenina, o que irá perturbar as interações entre os TCF e co-ativadores, promovendo o exporte nuclear da proteína. Também, outros fatores de transcrição ligam-se ao DNA e têm um papel antagonista à transcrição TCF/ β -Catenina.⁵

As modificações pós traducionais são outro mecanismo da sua regulação, como a fosforilação do TCF4 que diminui a ligação ao DNA e o conduz à sua degradação. Também pode sofrer SUMOilação que aumenta a sua transcrição ou sofrer acetilação mediada pelo CBP que resulta na repressão da transcrição. Estas diferentes modificações são maioritariamente específicas ao tipo de TCF em questão, conferindo uma regulação diferencial.⁵

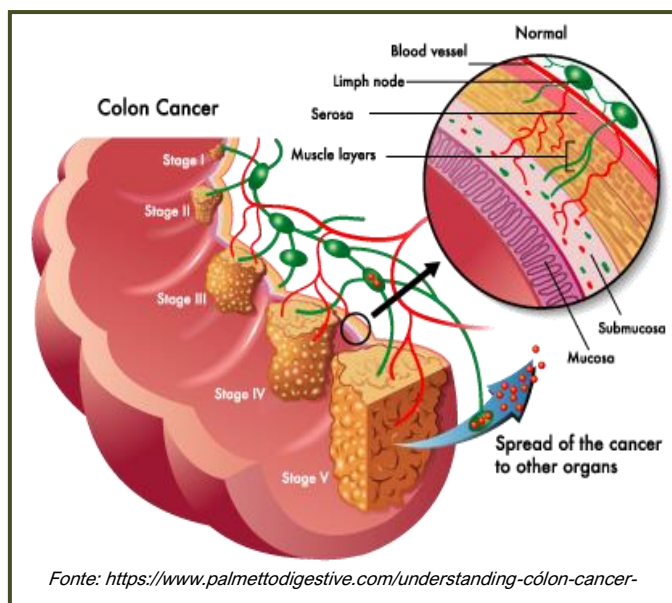
Cancro Colorretal (CCR)

A tarefa de processamento alimentar efetuada pelo intestino humano causa alguns danos de rotina no epitélio. A restituição das perdas celulares causadas por estas abrasões é apoiada pelas células estaminais do intestino (CEI). Estas células vão se proliferar e diferenciar e estes processos são regulados por diversas vias de sinalização, como a via Wnt, BMP, EGF e Notch. Entre estas, a Wnt é bastante importante na proliferação e manutenção das CEI. Para além do seu papel fundamental na homeostase dos tecidos intestinais, participando na preservação dos compartimentos das células estaminais, esta via encontra-se ativada de modo aberrante, devido a mutações em

situações de CCR, onde são formados complexos constitutivos de β -catenina e o TCF intestinal, o TCF7L2 ou TCF4.^{5,9}

O CCR resulta da acumulação de alterações genéticas em determinados oncogenes e genes supressores de tumores. O estágio da doença, está relacionado com o facto do tumor ter, ou não, invadido os tecidos vizinhos, e de se ter disseminado para outras partes do corpo. Na figura 2, está representado esquematicamente a progressão dos diferentes estádios do CCR.

Figura 2: Esquema ilustrativo dos estádios e metastização do CCR - O estágio da doença, está relacionado com o facto do tumor ter, ou não, invadido os tecidos vizinhos, e de se ter disseminado para outras partes do corpo: **estádio 0:** o tumor encontra-se, apenas, no revestimento interior do cólon e do reto; **estádio I:** o tumor desenvolveu-se para dentro da parede do cólon e do reto, no entanto, não atingiu a parede exterior do cólon, nem passou para o exterior do cólon; **estádio II:** o tumor desenvolveu-se mais profundamente para o interior da



parede do cólon ou através da parede do cólon ou do reto (pode ter invadido tecidos circundantes, mas as células cancerígenas não chegaram aos gânglios linfáticos); **estádio III:** o tumor já atingiu os gânglios linfáticos vizinhos, mas não chegou a outras partes do corpo; **estádio IV:** o tumor já metastizou para outras partes do corpo como, por exemplo, o fígado ou os pulmões.

Um dos principais mecanismos que resultam na progressão deste tipo de tumor é a instabilidade cromossômica, resultante de uma série de alterações genéticas que envolvem a ativação de oncogenes como K-ras e a inativação de genes supressores de tumores como p53, DCC/Smad4 e APC. Outro dos mecanismos com impacto significativo é a instabilidade de microssatélites, que resulta da inativação dos genes MLH1 e/ou MSH2 do sistema de reparação de *DNA Mismatch (MMR)* através da hipermetilação do seu promotor e mutação nos genes que codificam para os microssatélites, tais como *transforming growth factor receptor II (TGF-RII)* e BAX. No caso de síndromes hereditárias, estas apresentam mutações na linha germinativa em genes específicos, como o gene supressor tumoral APC.¹⁰

Desregulação dos Componentes da Via

Mudanças Moleculares

Os CCR humanos podem se desenvolver através de diversos mecanismos genéticos e epigenéticos e podem ser agrupadas através das suas características moleculares. Estes câncros podem apresentar um fenótipo de instabilidade cromossomal, fenótipo de microsatélite instável hipermutados ou um fenótipo de hipermetilação do genoma.¹¹ Microsatélites, também conhecidos com *Short Tandem Repeats*, são pequenas repetições de DNA espalhadas pelo genoma e devido à sua estrutura de repetições são propensos a mutações.¹²

A maioria dos CCR apresentam instabilidade cromossomal, onde o evento inicial é a perda de APC, levando à formação de adenoma. A partir daqui, a progressão do cancro requer a acumulação de outras mutações, como nos genes KRAS, PI3K, TFG- β , p53 e SMAD4. Cerca de 10-15% dos CCR apresentam um fenótipo de hipermutação e são causados por defeitos na maquinaria de MMR, resultando na deleção e inserção de nucleótidos. Este tipo de CCR apresenta mutações em diversos oncogenes e supressores tumorais, incluindo componentes da via Wnt, como o APC, a β -Catenina e a axin. Adicionalmente, já foi reportada a silenciamento epigenética de reguladores negativos da via Wnt, como inibidores extracelulares ou proteínas do complexo de destruição.⁵

Mutações nos componentes da via

Mutações nos componentes do complexo de destruição da β -catenina e inclusivo na própria proteína levam a uma estabilização aberrante desta proteína, o que se traduz numa ativação constitutiva e independente das proteínas Wnt da sinalização TCF/ β -catenina.

APC

A alteração da via de sinalização Wnt está presente em mais de 90% dos casos de tumores colorretais sendo que a presença de uma mutação inativadora do gene supressor de tumor APC, localizado no cromossoma 5q21-q22, está presente em cerca de 80% destes.¹³

As mutações na linha germinal do gene supressor tumoral APC originam um síndrome de polipose adenomatosa familiar que se manifesta na presença de vários pólipos no cólon e estes indivíduos têm uma predisposição para o desenvolvimento de CCR. Estas mutações no APC também se encontram em casos esporádicos deste tipo

de cancro, e são das lesões genéticas mais precoces do CCR, o que faz com que se considere o APC um *gatekeeper* na tumorigénese. A maioria são mutações sem sentido ou *frameshifts*, originando formas truncadas da APC que têm em falta o domínio de ligação à β -Catenina e domínios de interação com a Axin. Esta mudança na arquitetura do complexo de destruição aparenta ser responsável pela estabilização da β -Catenina. Adicionalmente, a APC truncada também tem em falta sequências de exporte nuclear, que é revelante no exporte, mediado pela APC, de β -Catenina no núcleo. Estas mutações no APC levam à acumulação de β -Catenina e à transcrição constitutiva dos genes alvo de Wnt, sem a presença de proteínas Wnt exógenas. A observação de um fenótipo menos severo na presença de APC mais pequenas indica que esta proteína, mesmo truncada, ainda retém alguma função, possivelmente necessária para a tumorigénese.¹⁴

Experimentalmente, a restauração do APC reverteu as lesões tumorais nos CCR através da restabilização da normal homeostase da cripta intestinal, até mesmo em ratinhos como gene supressor de tumor p53 mutado e com a presença de o gene oncogénico Kras. Este resultado, para além de reforçar a função supressora do APC na iniciação do CCR, revela também a importância crítica da sinalização Wnt, regulada pelo APC, na progressão do CCR.¹⁵

β -catenina

Cerca de 10% dos cancros do cólon esporádicos apresentam mutações na β -Catenina. Mais especificamente, em serinas e treoninas que são normalmente fosforiladas pela GSK-3. Sem isto, a β -Catenina é estabilizada e a via é ativada. As mutações no APC e β -Catenina aparentam ser mutuamente exclusivas.¹⁴

Axin

O gene AXIN2 codifica para a proteína Axin-2, também conhecida por *axin-like protein* (Axil) ou *axis inhibition protein 2* (AXIN2) que desempenha um papel importante na regulação da β -catenina na via de sinalização Wnt. Mutações nesta proteína, devido a MMR defeituosos, estabilizam a β -catenina e ativam a sinalização β -catenina/TCF, assinalando o seu papel no desenvolvimento de CCR.¹⁶

A AXIN1 e AXIN2 são reguladores negativos da via Wnt e genes supressores tumorais que se encontram mutados em formas esporádias e familiares de CCR. Já foram encontradas várias mutações e silenciamento epigenético em CCR com o fenótipo de microsatélite instável. Visto que a proteína resultante do gene AXIN1 funciona como scaffold do complexo de destruição e a AXIN2 participa num mecanismo de feedback negativo da via Wnt, pensa-se que mutações nestes genes levam à ativação da via.^{5,16}

Genes Alvo Propiciadores do CCR

Os genes CCND1 (codifica para a Ciclina D1) e MYC (codifica para a c-Myc), cuja transcrição é ativada pela via Wnt, são potenciadores da formação de CCR devido à sua capacidade de regulação do crescimento celular, apoptose, migração, invasão e manutenção das células estaminais.¹⁵

Células que expressem β -catenina mutante produzem elevados níveis de RNA mensageiros que codificam para a proteína ciclina D1. No entanto, a expressão da forma negativa do TCF7L2 (TCF4-E) em células CCR inibe fortemente a expressão da ciclina D1. Isto faz com que as células parem o seu ciclo celular na fase G1. Este fenótipo pode ser recuperado pela expressão da ciclina D1 através do promotor *cytomegalovirus*. Níveis anormais da β -catenina podem então contribuir para a transformação neoplásica, causada pela acumulação da ciclina D1.¹⁵

Por outro lado, o gene MYC é um alvo da via Wnt na formação de CCR. A sua expressão é inibida pela expressão de APC e ativada pela β -Catenina, cujos efeitos são mediados pela ligação do TCF4 aos promotores de c-MYC. Para além disso, vários carcinomas do cólon mostram níveis elevados de expressão de MYC. Dow, L.E *et al* sugerem que em células do epitélio colorretais o APC wild-type inibe a β -Catenina de se ligar ao TCF e, por sua vez, ativar o gene MYC. No entanto em tumores colorretais com mutações no APC ou mutações inativadoras da β -catenina, o aumento da atividade β -catenina/TCF leva à sobre-expressão de c-MYC, o qual por sua vez promove o crescimento neoplásico.¹⁷

Prespetivas de Tratamento

Desenvolvimento de Fármacos

Desde os anos 90 que o interesse no desenvolvimento de agentes terapêuticos que atuam na via de sinalização de Wnt tem aumentado. Porém só recentemente é que o desenvolvimento de inibidores de Wnt começou a ser promissor e ainda não há fármacos aprovados e disponíveis para tratamento.

Estes inibidores Wnt podem ter como alvo o complexo de destruição. Vão afetar a interação entre a proteína *Dishevelled* e o recetor *Frizzled* que resulta no bloqueio da cascata de sinalização ou podem estabilizar a Axin e inibir a sinalização da via Wnt. Adicionalmente, podem ter como alvo o complexo de transcrição β -catenina/TCF. Este tipo de inibidor é de grande interesse, visto que atua mais a *downstream* e assim é útil para uma gama mais variada de CCR, porém pode perder seletividade entre tecidos normais e tumorais. Por exemplo, compostos que têm como alvo a interação β -

catenina/TCF também afetam a interação β -catenina/APC, indicando que interfere, não seletivamente, em complexos de β -catenina. Também existem antagonistas da transcrição β -catenina/TCF, que se vão associar ao coativador transcricional CBP, normalmente recrutado pela β -catenina, e vão afetar a transcrição de genes alvo. Geralmente corresponde-se o inibidor à mutação encontrada, de modo a atuar no mesmo alvo.

Um dos grandes desafios é o facto de a via ser crucial no desenvolvimento e na homeostase de tecidos. Interferir nesta via não vai afetar apenas células cancerígenas com a via β -catenina/TCF ativada constitutivamente, mas também células estaminais normais em tecidos dependentes da via como no epitélio intestinal, resultando em toxicidade significativa. Outro fator a ter em conta é a interação entre vias diferentes, ou seja, a capacidade da via Wnt de transativar outras vias. Isto pode ser bastante importante no design de uma estratégia terapêutica eficiente, possivelmente tendo como alvo várias vias.

É importante mencionar que a desregulação da via Wnt é crucial, mas não é suficiente para a tumorigénese do CCR. A acumulação de mutações noutras oncogenes e genes supressores tumorais é necessária para a progressão do tumor. Por isto ainda não é claro se apenas atuar na via Wnt em CCR avançados é suficiente para supressão tumoral.

Terapia genética

O enorme número de casos de CCR diagnosticados a cada ano e a falta de agentes altamente eficazes para todos os pacientes sublinham a necessidade de novas formas de combater a doença.

A terapia genética como uma forma de tratamento em desenvolvimento já está bem estabelecida, com uma série de ensaios sendo avaliados em experiências com recurso a culturas celulares e a modelos animais.

Este tipo de terapia não só envolve a substituição de genes que são conhecidos como mutados no CCR, mas também utiliza o conhecimento desses defeitos numa variedade de abordagens. Estas abordagens atualmente praticadas podem ser divididas em três principais categorias: (1) sistemas enzima/pró fármaco (*HSVtk/ganciclovir*; *CD/5-fluorocytosine*); (2) substituição do gene supressor de tumor pela forma *wild-type* da p53; e (3) terapia baseada na utilização de citocinas ou antígenos expressados pelo tumor de forma a induzir a imunidade a estes.¹⁸

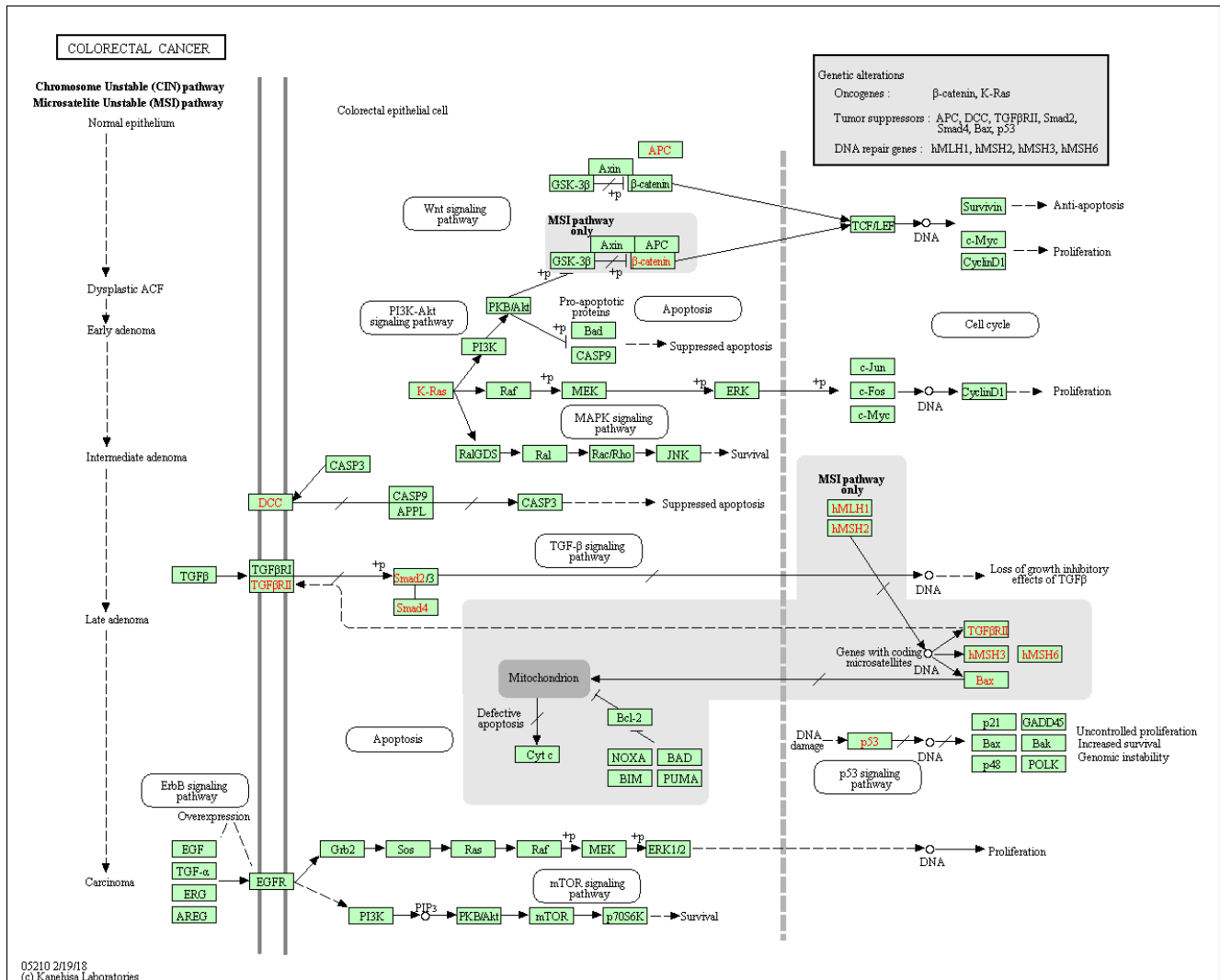
Uma conjugação entre as técnicas convencionais dos tratamentos contra o cancro (tais como a quimioterapia ou a radioterapia) e terapia genética é uma possível forma de combate a esta patologia. Já existe evidência da sinergia entre a substituição da p53 e a radioterapia e quimioterapia, sendo provável que no futuro serão desenvolvidas terapias que combinem estes elementos.

Referências

1. Ip, W., Chiang, Y. ting A. & Jin, T. The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective. *Cell and Bioscience* **2**, 1 (2012).
2. Najdi, R., Holcombe, R. & Waterman, M. Wnt signaling and cólon carcinogenesis: Beyond APC. *J. Carcinog.* **10**, 5 (2011).
3. Klaus, A. & Birchmeier, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 387–398 (2008).
4. Komiya, Y. & Habas, R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**, 68–75 (2008).
5. Novellasdemunt, L., Antas, P. & Li, V. S. W. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer . A Review in the Theme : Cell Signaling : Proteins , Pathways and Mechanisms. (2015). doi:10.1152/ajpcell.00117.2015
6. Stamos, J. L. & Weis, W. I. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, 1–16 (2013).
7. MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev. Cell* **17**, 9–26 (2009).
8. Arce, L., Yokoyama, N. N. & Waterman, M. L. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **25**, 7492–7504 (2006).
9. Nusse, R. & Clevers, H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **169**, 985–999 (2017).
10. 8. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/83106>.
11. Mojarad, E. N., Kuppen, P. J. K., Aghdaei, H. A. & Zali, M. R. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* **6**, 120–128 (2013).
12. Nojadeh, J. N., Sharif, S. B. & Sakhinia, E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI Journal* **17**, 159–168 (2018).
13. Shen, P., Pichler, M., Chen, M., Calin, G. A. & Ling, H. To Wnt or Lose: The Missing Non-Coding Linc in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences* **18**, 2003 (2017).
14. Behrens, J. The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 672–675 (2005).
15. Tetsu, O. & McCormick, F. β -catenin regulates expression of cyclin D1 in cólon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422–426 (1999).
16. Krings, M. *et al.* Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair. *Nat. Genet.* **26**, 146–147 (2000).
17. Dow, L. E. *et al.* Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell* **161**, 1539–1552 (2015).
18. Zwacka, R. M. & Dunlop, M. G. Gene therapy for cólon cancer. **12**, 595–615 (1998).

Anexos

Figura 3: Mapa das vias envolvidas no cancro colorretal.



Fonte: <https://www.kegg.jp/pathway/hsa05210>.