UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEPATOLOGIA

Carlos Eugênio Santiago Escovar

AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE REPARO POR EXCISÃO DE BASES NA METÁSTASE HEPÁTICA DO CÂNCER COLORRETAL

Porto Alegre

2021

Catalogação na Publicação

Santiago Escovar, Carlos Eugênio
Avaliação do sistema de reparo por excisão de bases na metástase hepática do câncer colorretal / Carlos Eugênio Santiago Escovar. -- 2021.
124 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia, 2021.

Orientador(a): Antonio Nocchi Kalil ; coorientador(a): Natalia Motta Leguisamo, Angélica Maria Lucchese.

1. Metástases hepáticas de câncer colorretal. 2. reparo por excisão de bases. 3. prognóstico. 4. PD-1. I. Título.

Carlos Eugênio Santiago Escovar

AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE REPARO POR EXCISÃO DE BASES NA METÁSTASE HEPÁTICA DO CÂNCER COLORRETAL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Hepatologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do Grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Antonio Nocchi Kalil
Co-orientadoras: Dra. Natalia Motta Leguisamo Meirelles e Dra. Angélica Maria Lucchese

Porto Alegre
2021

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela educação, amor e confiança.

À Cyntia, minha esposa, por estar ao meu lado nestes 24 anos, me iluminando pelo amor, dedicação e caráter

À Luiza, minha filha, por trazer o amor puro e sem interesse para minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Antonio Nocchi Kalil, pela orientação segura e amizade.

À Dr.ª Natalia Leguisamo, pelos ensinamentos, ajuda irrestrita e confiança.

À Dr.ª Angélica Lucchese, por guiar com gentileza.

A todos os pacientes e familiares que mesmo em seus momentos mais sofridos foram capazes de entender o propósito deste estudo.

A todo o grupo de professores da Hepatologia, pelos ensinamentos, pela recepção e pela gentileza

RESUMO

Introdução: As metástases hepáticas de câncer colorretal (MHCCR) continuam a ser a principal causa de morte de pacientes com câncer colorretal (CRC). O reparo inadequado dos danos ao DNA promove instabilidade genômica, aumento da carga mutacional e regulação positiva do eixo PD-1/PD-L1. A deficiência no reparo de malpareamento (dMMR) é um biomarcador baseado nos sistemas de reparo do DNA para predizer a resposta à imunoterapia em pacientes com CRC metastático. Uma vez que, apenas 5% dos pacientes com MHCCR apresentam dMMR, a identificação de deficiências em outras vias de reparo do DNA, como o reparo por excisão de base (BER), pode facilitar a identificação de pacientes que possivelmente se beneficiariam da imunoterapia independentemente da dMMR. **Métodos:** Cinquenta pacientes com MHCCR submetidos à hepatectomia foram incluídos prospectivamente. Metástases hepáticas e tecidos hepáticos adjacentes de 32 pacientes foram avaliados quanto à expressão gênica dos principais genes do BER (*OGG1*, *POLB*, *PARP1* e *XRCC1*) por qRT-PCR. Conteúdos de PARP1 e PD-1 foram avaliados por imunohistoquímica. Os dados moleculares e clínicopatológicos, incluindo as razões neutrófilos/linfócitos, linfócitos/monócitos e plaquetas/linfócitos - NLR, LMR e PLR, respectivamente), foram avaliados quanto à presença de associações e valor prognóstico. **Resultados:** A redução dos níveis de mRNA de *OGG1* e *POLB* em tecidos neoplásicos foi associada à margens cirúrgicas R1-R2 e doença sincrônica, respectivamente. A superexpressão de *PARP1* foi associada a presença menores lesões, margem de ressecção cirúrgica R0 e aumento de LMR; e a superexpressão de *XRCC1* foi associada a níveis mais baixos de CEA ao diagnóstico do CCR e aumento da PLR. Além disso, demonstramos que a menor imunorreatividade para PARP1 foi associada à presença de invasão perineural em tumores colorretais e aumento da NLR. Em contrapartida, a alta expressão de PARP1 foi associada à expressão positiva de PD-1. As análises de sobrevivência não confirmaram o papel prognóstico independente dos componentes de BER ou de PD-1. **Conclusões:** O BER apresentou-se desequilibrado nas MHCCR. A superexpressão de PARP1 foi associada à expressão positiva de PD-1 positiva e características clínicas de mau prognóstico em CRCLM, o que pode sugerir um novo papel para PARP1 na agressividade das MHCCR através da ativação do sistema imunológico e da modulação do desenvolvimento tumoral.

Palavras-chave: metástase hepática de câncer colorretal; reparo por excisão de base; PD-1; prognóstico.

ABSTRACT

Background: Colorectal liver metastases (CRCLM) remains the major cause of death of colorectal cancer (CRC) patients. Inappropriate repair of DNA damage promotes genomic instability, increase of mutational burden and upregulation of PD-1/PD-L1 axis. Mismatch repair deficiency (dMMR) is a validated DNA repair-based biomarker for predicting response to immunotherapy for metastatic CRC. Since only 5% of CRCLM patients present dMMR, identification of deficiencies in other DNA repair pathways, such as base excision repair (BER), might facilitate the identification of patients who would possible benefit from immunotherapy irrespective of dMMR. **Methods:** Fifty patients were prospectively included. CRCLM and adjacent noninvolved liver specimens from 32 patients who underwent hepatectomy were assessed for gene expression of the key BER genes (*OGG1, POLB, PARP1* and *XRCC1*) by qRT-PCR and PARP1 and PD-1 protein expression by immunohistochemistry. Molecular and clinicopathological data, including inflammatory-based scores (neutrophil/lymphocyte, lymphocyte/monocyte and platelet/lymphocyte ratios - NLR, LMR and PLR, respectively), were investigated for associations and prognostic value. **Results:** Reduction of *OGG1* and *POLB* mRNA levels in neoplastic tissues were associated with synchronous CRCLM and R1-R2 surgical margins, respectively. Overexpression of *PARP1* was associated with smaller liver metastasis, R0 surgical resection margin and increased LMR ratio, and *XRCC1* overexpression was associated with lower CEA levels at CRC diagnosis and increased PLR. Moreover, we demonstrated that CRCLM tissues exhibiting lower immunoreactivity of PARP1 were associated with presence of perineural invasion in colorectal tumors and increased NLR. In counterpart, high PARP1 expression was associated with positive PD-1 expression in CRCLM. Survival analyses did not confirm independent prognostic role of BER components. **Conclusions:** BER pathway is imbalanced in CRCLM. PARP1 upregulation was associated with positive PD-1 and clinical features of poor prognosis in CRCLM, which may suggest a novel role for PARP1 in CRCLM aggressiveness by immune system activation and modulation of tumor development.

Keywords: colorectal cancer liver metastasis; base excision repair; PD-1; prognosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU: 5-fluoracil
8-OH-dG: 8-hidroxidesoxiguanosina
8-oxo-dG: 8-oxo-7,8-diidro-desoxiguanosina
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
ALDH2: aldeído desidrogenase 2
ALT: alanina aminotransferase
AP: do inglês, *apurinic/apyrimidinic (AP) sites*
APC: do inglês: *Adenomatous Polyposis Coli*
APE1: do inglês, *apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease*
ATP: adenosina trifofosfato
BER: do inglês, *base excision repair*
BRAF: do inglês, *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*
BRCA: do inglês, *breast cancer gene*
CAPOX: capecitabine, oxaliplatina
CCR: câncer colorretal
CEA: do inglês, *carcinoembryonic antigen*
CIMP: do inglês, *CpG island methylator phenotype*
CIN: do inglês, *chromosomal instability*
CMS: do inglês, *Colorectal Molecular Subtypes*
CRS: do inglês, *Clinical Risk Factor*
CTLA4: do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*
dMMR: deficiente em *mismatch repair*
DNA: do inglês, *deoxyribonucleic acid*
dNMP: desoxinucleosídeo
DSB: do inglês, *double strand breaks*
EFGR: do inglês, *epidermal growth factor receptor*
EMT: do inglês, *epithelial-mesenchimal transition*
ERO: espécies reativas do oxigênio
EXO1: do inglês, *exonuclease 1*
FEN1: do inglês, *flap endonuclease 1*
FOLFIRI: leucovorin, 5-Fluorouracil, irinotecano

FOLFOX: leucovorin, 5-Fluorouracil, oxaplatina

HNPCC: do inglês, *Hereditary Non-Poliposis Colon Cancer*

INCA: Instituto Nacional do Câncer

KRAS: do inglês, *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

MAP: polipose associada ao *MUTYH*

MEK: do inglês, *MAP (mitogen-activated protein) kinase*

MGMT: do inglês, *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*

MHCCR: metástases hepáticas de câncer colorretal

MLH1: do inglês, *MutL homolog 1*

MLH3: do inglês, *MutL homolog 3*

MMEJ: do inglês, *microhomology-mediated end-joining*

MMR: do inglês, *mismatch repair*

MSH2: do inglês, *MutS homolog 2*

MSH3: do inglês, *MutS homolog 3*

MMEJ: do inglês, *microhomology-mediated end-joining*

MSH6: do inglês, *MutS homolog 6*

MSI: do inglês, *microsatellite instability*

MUTYH: do inglês, *mutY DNA glycosylase*

MMR: do inglês, *mismatch repair*

MPG: do inglês, *N-methylpurine DNA glycosylase*

MSI: do inglês, *microsatellite instability*

MSKCC-CRS: *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center–Clinical Risk Score*

MSS: do inglês, *microsatellite stable*

NAD: do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide*

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NER: do inglês, *nucleotide excision repair*

NHEJ: do inglês, *non-homologous end joining*

NK: do inglês, Natural Killers

OGG1: do inglês, *8-Oxoguanine DNA Glycosylase*

PAF: polipose adenomatosa familiar

PAR: do inglês, *poly (ADP-ribose)*

PARP1: do inglês, *Poly (ADP-ribose) Polymerase 1*

PARPi: do inglês, *PARP Inhibitor*

PCNA: do inglês, *proliferating cell nuclear antigen*

PCR: proteína C reativa

PD1: do inglês, *programmed death-1*

PD-L1: do inglês, *programmed death-ligand 1*

PI3K: do inglês, *phosphatidylinositol-3-kinase*

PMS1: do inglês, *post meiotic segregation increased 1*

PMS2: do ingles, *post meiotic segregation increased 2*

Polβ: do inglês, *DNA polymerase β*

PTEN: do inglês, *protein tyrosine phosphatase*

RAS: do ingles, *reticular activating system*

RFC: do inglês, replication factor C

SSB: do inglês, *single strand breaks*

TBS: do inglês, *tumor burden score*

TCGA: do inglês, *The Cancer Genome Atlas*

TGFβ: do inglês, *transforming growth factor*

TNM: do inglês, *tumor-node-metastasi*s

TP53: do inglês, *tumor protein p53*

UICC: do inglês, *International Union Against Cancer*

UNG: do inglês, *uracil-DNA-glicosilase*

VEGF: do inglês, *vascular endothelial growth fator*

XRCC1: do inglês, *X-ray repair cross-complementing protein 1*

γ-H2AX: do inglês, *H2A histone family member X*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

1.1. Câncer colorretal (CCR) 14

1.1.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos 14

1.2. Metástases hepáticas de câncer colorretal (MHCCR) 17

1.2.1. Aspectos clínicos 17

1.2.2. Fatores prognósticos 21

1.2.3. Etiologia molecular e biomarcadores 27

1.3. Sistemas de reparo do DNA 27

1.3.1. Reparo de Malpareamento 29

1.3.2. Reparo por excisão de bases 33

1.3.2.1. OGG1 37

1.3.2.2. DNA Polimerase β 39

1.3.2.3. PARP1 40

1.3.2.4. XRCC1 41

1.3.3. Reparo por excisão de bases e sistema imune tumoral 42

2. JUSTIFICATIVA 46

3. OBJETIVOS 48

3.1. Objetivo Geral 48

3.2. Objetivos Específicos 48

5. ARTIGO CIENTÍFICO 69

6. CONCLUSÕES 112

7. PERSPECTIVAS FUTURAS 113

8. ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 114

9. ANEXO II – FICHA DE COLETA DE DADOS 116

10. ANEXO II - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA 120

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer colorretal (CCR)

1.1.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres. Contudo, as taxas de incidência do CCR apresentam uma grande heterogeneidade global, sendo que cerca de 55% dos casos novos ocorrem nos países mais desenvolvidos (1). Em 2018, foram diagnosticados cerca de 1,8 milhão de casos novos e registrados mais de 880 mil óbitos em todo o mundo (2). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), ocorreram, durante o ano de 2015,8.163 óbitos por câncer de cólon e reto em homens e 8.533 em mulheres no Brasil, e estima-se que ocorreram 17.380 novos casos de câncer de cólon e reto em homens e 18.980 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Dentre as regiões do Brasil, as regiões Sul e Sudeste concentram 70% da ocorrência de novos casos. Ainda, em termos de incidência bruta entre homens e mulheres, a cidade de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, ocupa a terceira e quarta posições, respectivamente, de acordo com dados do DATASUS 2018.

Dentre todos os casos de CCR, cerca de 70% a 85% ocorrem de forma esporádica, ou seja, não estão associados à presença de histórico familiar ou de padrões genéticos hereditários (3). A ocorrência esporádica de tumores colorretais está associada à presença de diversos fatores de risco não modificáveis (idade avançada, diabetes mellitus, hipertensão arterial, etc.) e modificáveis (dietas ricas em carne vermelha e pobres em fibras, etilismo, sedentarismo, etc.) (4).

A etiologia familiar do CCR responde por 10-30% dos casos e refere-se à ocorrência de tumores de cólon e reto em indivíduos com histórico familiar, mas sem a presença de síndromes hereditárias (5). Finalmente, a herança de padrões genéticos é responsável pela ocorrência de tumores colorretais em cerca de 5-10%

de todos os casos de CCR. Nestes casos, pacientes com mutações germinativas desenvolvem tumores intestinais como parte da manifestação de doenças polipoides (polipose adenomatosa familiar - PAF, polipose associada ao *MUTYH* - MAP ou síndromes polipoides hamartomatosas) ou não-polipoides (HNPCC, do inglês: *Hereditary Non-Poliposis Colon Cancer*) (5).

O CCR é uma doença heterogênea que resulta de múltiplas mutações consecutivas e em diferentes fenótipos clínicos. A patogênese do CCR é muito complexa e pode ocorrer ao menos por três diferentes vias: a via de instabilidade cromossômica (CIN), a via de instabilidade de microssatélites (MSI) e a via de fenótipo metilador das ilhas CpG (CIMP) (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015). A principal via molecular que contribui para a carcinogênese colorretal - e é predominante em 65-70% dos casos - é a da instabilidade cromossômica, que se traduz morfologicamente na via adenoma-carcinoma, descrita em 1989 por Fearon e Vogelstein (6). Esta via compreende um desequilíbrio no número de cromossomos, aneuploidia e perda de heterozigosidade. Defeitos na segregação cromossômica, reparo dos danos ao DNA e mutações específicas em certos oncogenes e genes supressores tumorais são considerados os responsáveis por essa instabilidade. Classicamente, esta via inicia com a aquisição de mutações no gene supressor tumoral-chave desta sequência, o *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), cuja mutação é encontrada em 75% dos casos de câncer colorretal esporádico e leva à displasia ou resulta na formação de pólipos. Em seguida, dá-se a ativação mutacional do homólogo do oncogene *KRAS*, a inativação do gene supressor tumoral *TP53* (região cromossômica 17p13) e a perda de heterozigosidade ao longo do cromossomo 18 (18q LOH), levando o pólipo a crescer em maior velocidade e transformar-se em um tumor maior, conhecido como adenoma intermediário (7,8).

O fator prognóstico mais importante do comportamento e do desfecho do tumor é a extensão anatômica da sua disseminação, classificada de acordo com o sistema de estadiamento TNM (*tumor-node-metastasi*s). Da mesma forma, o prognóstico e o tratamento dos pacientes com CCR são decididos a partir do estadiamento cirúrgico e histológico, usando a classificação TNM da 8ª Edição do Estadiamento da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) e da UICC (*International Union Against Cancer*). Esta é composta de uma classificação clínica pré-operatória (cTNM),

patológica pós-operatória (pTNM) e após terapia neoadjuvante e cirurgia (ypTNM). Esta classificação leva em consideração a invasão mural do tumor (T), comprometimento de linfonodos (N) e presença de metástases a distância (M) (9). Outros fatores prognósticos são os níveis de antígeno carcinoembrionário (CEA), depósitos tumorais, invasão perineural, instabilidade de microssatélites, grau de regressão tumoral, invasão linfática e invasão perineural (10,11).

Todavia, apesar da utilização rotineira para o delineamento do tratamento de CCR, o estadiamento TNM possui um ponto frágil em sua abordagem, uma vez que não leva em conta a complexa etiologia molecular de CCR, proveniente de diversas alterações genéticas e epigenéticas, o que torna esta patologia um tipo heterogêneo de câncer. Esta deficiência limita a possibilidade de individualização do tratamento, já que utiliza critérios muito amplos (12). Um dos exemplos que mostra a limitação do uso desta escala é o fato de que cerca de 20-40% dos pacientes ainda que em estágio II, considerado não grave, irão apresentar piora do quadro clínico com desfechos letais (recidiva e metástase) em até 5 anos (13). Além disto, apesar dos significantes avanços no diagnóstico e no tratamento do CCR, a mortalidade permanece inalterada nos últimos 20 anos, mais uma vez refletindo a limitada vantagem concedida pelos avanços no tratamento adjuvante (14).

Neste contexto, os estudos sobre outros fatores com potencial prognóstico da doença vêm ganhando evidência. Um deles é a lateralidade, visto que, nas últimas décadas foi observado um aumento na incidência de câncer de cólon direito. Pacientes com tumores do lado direito são mais frequentemente do sexo feminino, de maior idade e apresentam tumores avançados (T3/T4) (15). Dados de uma metanálise demonstraram que aqueles com estes tumores apresentaram pior prognóstico significativamente em termos de sobrevida global do que aqueles com tumores do lado esquerdo do cólon (16). Pacientes com tumores do lado direito frequentemente apresentam sinais mais sutis, como anemia microcítica e perda de peso, enquanto aqueles com tumores do lado esquerdo tipicamente se apresentam com sangramento retal e alterações nos hábitos intestinais (16).

Mesmo com todas as evidências de heterogeneidade molecular dos tumores colorretais, o estadiamento TNM continua a ser o principal fator prognóstico e preditivo na seleção de pacientes com CCR para quimioterapia adjuvante B (17) e não há consenso que permita uma assinatura molecular definitiva. Pacientes com

CCR em estádio III são rotineiramente referenciados para quimioterapia adjuvante, pelo alto risco (50-60%) de metastatização, mesmo com uma ressecção oncológica ótima (18,19). Por outro lado, pacientes com CCR em estádio II não são referenciados para quimioterapia adjuvante, pelo fato de que vários estudos não demonstraram benefício desta abordagem (18–21). No entanto, fica evidente a limitação do estadiamento desta doença pelas ferramentas atuais quando estes pacientes com CCR no estádio II se mostram um grupo altamente heterogêneo e que desafia a estratificação de risco com base apenas em fatores clinicopatológicos, visto que apresentam um risco entre 20 e 30% de desenvolver recorrência e metástases (22,23).

Ainda considerando-se o estadiamento TNM para o CCR, em 2010, a sétima edição do sistema de estadiamento da AJCC introduziu uma subdivisão de M1 (EDGE; COMPTON, 2010), desta vez direcionada à presença de metástases hepáticas de câncer colorretal (MHCCR). Metástases restritas ao fígado foram classificadas como M1a (Estágio IVA) e metástases distantes de múltiplos locais incluindo aquelas no fígado como M1b (Estágio IVB). Em 2017, a oitava edição introduziu uma nova subdivisão de M1 na classificação TNM, desta vez objetivando diferenciar dentro do estadiamento o local da metástase à distância (M1a - apenas de fígado; M1b - fígado e outros órgãos sem metástase peritoneal e M1c fígado com metástase peritoneal) (WEISER, 2017).

1.2. Metástases hepáticas de câncer colorretal (MHCCR)

1.2.1. Aspectos clínicos

O fígado é o sítio metastático mais frequente para tumores gastrointestinais por diversos motivos, iniciando pelo fato de que a drenagem venosa dos órgãos gastrointestinais ocorre através do sistema portal hepático. Além disto, em razão da sua arquitetura específica, o tecido hepático consiste de vários tipos celulares que propiciam um microambiente particularmente “fértil” para receber as células tumorais (25). A incidência de metástases hepáticas varia entre 23-27% em estudos de base populacional (26–28). No momento do diagnóstico do CCR, entre 20 e 25% dos

pacientes já apresentam doença metastática, na qual metástases hepáticas estão presentes em 14-18% dos pacientes (26).

A incidência de detecção de metástases no momento do diagnóstico do tumor primário vem aumentando, provavelmente devido a melhores práticas de rastreamento e técnicas de imagem (1). Cerca de 85% das metástases hepáticas são diagnosticadas em um ano, 94% em dois anos e 97% nos primeiros três anos após o diagnóstico do CCR primário (26). Entre os pacientes sem recidiva cinco anos após o diagnóstico, apenas 2% desenvolvem metástases hepáticas entre cinco e 10 anos (29). A incidência de metástases hepáticas metacrônicas em relação ao TNM é de cerca de 4% para os tumores de estágio I, de 13% para o estádio II e de 30% para o estágio III (30).

Para pacientes com diagnóstico de CCR estágio I e estágio inicial II, a ressecção cirúrgica do tumor primário é considerada curativa, com baixo risco de progressão metastática à distância e sem necessidade de quimioterapia sistêmica (31). As consequências da metástase são significativas, pois as metástases são a principal causa de morbidade e morte relacionadas ao câncer. Embora as terapias sistêmicas citotóxicas e direcionadas sejam oferecidas com a esperança de eliminar a progressão da doença e a disseminação metastática, elas raramente curam a metástase devido à resistência intrínseca ou adquirida. No entanto, para um grupo muito seleto de pacientes com CCR metastático, a cirurgia oferece a única opção curativa, oferecendo taxas de sobrevida global em 5 anos de 50–60% (32,33).

Historicamente, o prognóstico de pacientes com MHCCR não tratados com quimioterapia ou cirurgia sempre foi excepcionalmente pobre, com uma sobrevida média de 5-10 meses. A ressecção cirúrgica das MHCCR é um tratamento potencialmente curativo, com taxas de sobrevida em 5 anos de 20-58% e sobrevida em 10 anos de 22-23% (29,34,35). Em estudos de base populacional, a sobrevida global em 10 anos varia de 5 a 15%, dependendo do número de metástases hepáticas e da ressecção cirúrgica (26). A taxa de recorrência após cirurgia curativa intencional é relatada como sendo de 56-63% em dois anos (36), sendo que 93% das recorrências ocorrem dentro dos primeiros 5 anos de seguimento (37).

Menos de 25% dos pacientes com MHCCR são considerados ressecáveis ao diagnóstico. Anteriormente, o padrão de tratamento baseava-se na quimioterapia

sistêmica. Contudo, em virtude dos avanços recentes nos esquemas antineoplásicos e nas técnicas cirúrgicas, a metastasectomia hepática é a opção padrão de tratamento para pacientes MHCCR ressecáveis. Atualmente, a terapia multimodal, que inclui ressecção cirúrgica com margem negativa (R0) é a única estratégia de tratamento associada a taxas de sobrevida em 5 anos de 50% (33). Infelizmente, 70% dos pacientes terão recidiva após a ressecção completa da metástase hepática no fígado e em locais extra-hepáticos (38). Para melhorar esse desfecho, o emprego da quimioterapia ocorre de diferentes formas: adjuvante, neoadjuvante, perioperatória, sistêmica e regionalmente por infusão arterial hepática.

A terapia sistêmica neoadjuvante pode incluir os agentes quimioterápicos 5-fluoracil (5-FU), oxaliplatina, irinotecano (39) e produtos biológicos, como os anticorpos monoclonais contra o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (bevacizumabe) e contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (cetuximabe e panitumumabe) (40). Esta abordagem apresenta diversas vantagens, especialmente a redução do estadiamento de grandes lesões hepáticas e o tratamento de micrometástases (41). Em comparação à hepatectomia isoladamente, a terapia sistêmica neoadjuvante (FOLFOX4- 5-FU, leucovorina e oxaliplatina) foi associada a uma taxa de sobrevida livre de progressão 7,3% maior em 3 anos (42). Este benefício mostrou-se mais evidente em pacientes com níveis de CEA acima de 5 ng/mL, os quais apresentaram 35% de sobrevida livre de progressão em 3 anos em comparação *versus* 20% nos pacientes submetidos à cirurgia isoladamente (43).

O emprego da terapia biológica em neoadjuvância ainda é discutível. Uma metanálise de 11 estudos envolvendo 908 pacientes para determinar o impacto da adição de agentes biológicos à quimioterapia neoadjuvante, não se limitando àqueles com metástases ressecáveis, foi realizada. Os autores relataram uma elevada heterogeneidade dos regimes de tratamento entre os estudos (quatro à base de oxaliplatina, dois de irinotecano, cinco de ambos; sete de cetuximabe, quatro de bevacizumabe). A terapia biológica combinada à quimioterapia foi associada a uma taxa de resposta de 68% e a uma média de 14 meses de sobrevida livre de progressão (bevacizumabe 14 meses (intervalo 11-18), cetuximabe 13,6 meses (intervalo 9,8-16,5 meses) (44). O estudo BOXER, que avaliou CAPOX (capecitabine + oxaliplatina) com bevacizumabe no perioperatório como terapia de conversão,

reportou 78% de taxa de resposta e 40% de taxa de conversão para ressecabilidade (45). Todavia, a adição do bevacizumabe à quimioterapia neoadjuvante não demonstrou nenhum benefício significativo na sobrevida geral até o momento (46,47).

A maioria dos estudos compara a quimioterapia neoadjuvante à cirurgia isoladamente, dificultando a identificação da sequência ideal destas duas abordagens. Até o momento, três ensaios clínicos randomizados foram conduzidos investigando o sequenciamento do tratamento, os quais compararam 6 meses de quimioterapia adjuvante (regimes FOLFOX, FOLFIRI (5-FU, leucovorina e irinotecano) ou CAPOX) a 3 meses de tratamento pré e 3 meses pós-operatório, mas todos foram encerrados precocemente, sem completar o número amostral planejado.

No momento, as diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomendam 6 meses de terapia sistêmica perioperatória (FOLFOX ou CAPOX) para a maioria dos pacientes com MHCCR ressecáveis, com o objetivo de aumentar a probabilidade de que a doença microscópica residual seja erradicada. A recomendação é com base nos relatos positivos de melhora na sobrevida livre de progressão, mas não de sobrevida global (48–50). A terapia biológica não é recomendada no cenário neoadjuvante, exceto na terapia inicial de doença irressecável, que pode ser convertida em ressecabilidade.

O principal objetivo da quimioterapia adjuvante após a ressecção completa da MHCCR é erradicar a doença micrometastática. Enquanto a quimioterapia adjuvante fornece benefício de sobrevida geral no tratamento do CCR primário em estágio II de alto risco e estágio III (40), o benefício da quimioterapia adjuvante após a ressecção de metástases hepáticas ainda permanece obscuro. Um dos principais motivos para isto é a falta de estratificação dos pacientes através dos fatores prognósticos já estabelecidos. Em uma análise retrospectiva, Ayez e colaboradores (51) avaliaram pacientes MHCCR ressecáveis com pontuação de risco baixo *versus* alto em termos de benefício da quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante. O grupo de pacientes com baixo risco não apresentou diferenças em relação à sobrevida global entre aqueles que receberam e aqueles que não receberam quimioterapia (65 *vs.* 54 meses). Em contrapartida, no grupo de alto risco, o tempo de sobrevida global entre aqueles que receberam quimioterapia foi de 46 contra 33 meses entre os que não receberam.

Neste sentido, é possível que o potencial benefício da associação da quimioterapia adjuvante seja restrita à população de pior prognóstico.

1.2.2. Fatores prognósticos

A determinação da ressecabilidade oncológica prevê selecionar os pacientes que irão obter maior benefício após a hepatectomia e baseia-se em critérios clínicos, patológicos e da biologia tumoral. Com base em tais investigações, vários sistemas de estadiamento e classificação e nomogramas foram desenvolvidos. Além disso, alguns biomarcadores úteis e marcadores moleculares foram recentemente introduzidos.

Diversas variáveis prognósticas já foram identificadas até o momento, incluindo características demográficas, aspectos relacionados ao tumor primário e à apresentação da metástase hepática, aspectos peri e intraoperatórios e alguns biomarcadores. Didaticamente, é possível agrupar estas variáveis em (1) relativas aos pacientes, (2) relativas ao tumor primário e (3) relativas à metástase hepática, os quais estão sumarizados na **Tabela 1**. Idade acima de 65 anos, ocorrência de complicações intra e pós operatórias (estimadas pela classificação de Clavien-Dindo) e recebimento transfusão sanguínea são consideradas variáveis do paciente preditoras de piores desfechos (52–55).

Em relação ao tumor primário, lateralidade, invasividade tumoral (estágio T), presença de linfonodos regionais metastáticos, grau de diferenciação celular, níveis de CEA e características moleculares figuram entre as principais características associadas aos desfechos dos pacientes com MHCCR. Tumores localizados no cólon direito, com invasão da camada serosa (estágios T3 e T4), metástase linfonodal (estágios N2 ou N3) e elevado grau de diferenciação celular, e pacientes com níveis séricos CEA pré-operatório elevados apresentam pior prognóstico e maiores chances de recorrência da MHCCR após hepatectomia (CREASY *et al.*, 2018; MARGONIS *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2018; NICHOLSON *et al.*, 2014; VENOOK *et al.*, 2017) .Todavia, os relatos em relação a cada uma destas variáveis ainda apresentam contradições e discrepâncias. Por exemplo, níveis elevados de CEA pré-operatório,

embora frequentemente associados a piores desfechos, apresentam pontos de corte muito amplos (entre 5 e 200 ng/mL) e, portanto, seu emprego como marcador prognóstico ainda não foi estabelecido.

Mutações nos genes codificadores das moléculas-chave envolvidas na cascata do EGFR apresentam-se como importantes fatores prognósticos. Mutações nos genes *KRAS*, *BRAF*, *MEK*, *PI3K* e *PTEN* foram identificadas em frequências variáveis nesses tumores e divergem em termos de importância prognóstica. Em termos de biologia tumoral, as mutações nos genes *KRAS* e *BRAF* apresentam valor prognóstico independente para pacientes com MHCCR, elevando as chances de óbito em 1,86 e 3,90, respectivamente, em pacientes submetidos à hepatectomia em relação aos pacientes cujos tumores possuem a versão selvagem deste genes (59). Mutações em *KRAS* podem ocorrer em até 52% dos pacientes com MHCCR ressecáveis, e indicam pior prognóstico ao reduzir a sobrevida global para um período entre 19-50 meses comparativamente aos portadores de *KRAS* selvagem, os quais apresentam, em média, 70 meses de sobrevida global (60). Apesar das mutações no genes da família RAS serem mais frequentes em tumores no cólon direito, pacientes com estas mutações em tumores primariamente apresentados no cólon esquerdo apresentam menor tempo de sobrevida global (61) sendo o efeito negativo deste genótipo mais pronunciado entre aqueles que apresentaram recorrência após a ressecção de MHCCR (62). Pacientes com a mutação V^{600E} em *BRAF*, por sua vez, ocorre em até 9% dos pacientes, os quais apresentam maior risco de recorrência em comparação àqueles com *BRAF* selvagem ou com algum dos genes da família RAS mutado (63). Mutações de *TP53* e *PI3K,* embora identificadas frequentemente nestes pacientes, não apresentaram valor prognóstico independente até o momento.

Em relação à metástase hepática, aspectos histológicos como a presença de invasão linfovascular/perineural (64) e do ducto biliar e da cápsula fibrótica estão associados a menores tempos de sobrevida global (55). Outro fator largamente estudado neste sentido é o número de nódulos hepáticos. A presença de 4-5 lesões hepáticas (65) é um fator independente e com capacidade discriminatória do prognóstico superior a outros fatores clássicos, como margens cirúrgicas e ressecabilidade (56,66,67). Na mesma linha, o tamanho da maior lesão (> 5 cm), a presença de doença bilobar e o comprometimento de múltiplos segmentos hepáticos

também são fatores prognósticos negativos para sobrevida global e recorrência (54,56,67).

Embora controverso, o tempo entre o diagnóstico do CCR e a apresentação da doença hepática metastática é um fator prognóstico descrito na maioria dos estudos. Primeiramente, em virtude das discrepâncias conceituais sobre o intervalo que define a doença sincrônica ou metacrônica, sendo 6 e 12 meses os mais comumente utilizados. De qualquer forma, a doença sincrônica está associada a piores desfechos clínicos, incluindo menor sobrevida global e livre de progressão (53,55,56).

Outro fator relacionado às MHCCR é a ressecção cirúrgica completa (R0), a qual é considerada um fator decisivo na cura de pacientes submetidos à ressecção hepática. A obtenção de margens negativas está associada à melhor sobrevida livre de doença, cuja extensão do benefício aumenta com o passar do tempo (54,56). Contudo, diante de esquemas terapêuticos mais modernos (terapias-alvo), MHCCR com margens R0 e R1 (doença microscópica) possuem taxas similares de cura (68). Do mesmo modo, em subgrupos específicos, a margem cirúrgica parece perder importância prognóstica. Em pacientes com mutações em *KRAS*, a ressecção hepática R0 *vs.* R1 não oferece um melhor prognóstico, pois margens maiores que 1–4 mm não parecem beneficiar esses pacientes (69).

Na tentativa de compilar os fatores prognósticos em escores combinados e com maior capacidade de prever os desfechos, diversos sistemas de pontuação e nomogramas foram propostos para estratificar os pacientes em categorias de risco. O primeiro escore relatado com esta finalidade para pacientes com MHCCR submetidos à ressecção hepática foi o de Nordlinger em 1996, o qual incluiu: idade, número de metástases, tamanho da maior metástase, tempo entre o tumor primário e o aparecimento das metástases, invasão tecidual e linfática do tumor primário e margens cirúrgicas). Dando um ponto para cada fator, a população foi dividida em três grupos de risco com diferentes taxas de sobrevida de 2 anos: 79%, 60% e 43% em pacientes com 0–2, 3–4 e 5–7 pontos, respectivamente. Pouco tempo depois, Fong e seus colegas propuseram o Memorial Sloan-Kettering Cancer Center–Clinical Risk Score (MSKCC-CRS), que é o escore de risco clínico para predizer recidiva após ressecção hepática de MHCCR mais utilizado mundialmente. O MSKCC-CRS é baseado em cinco critérios clínicos: estado nodal do tumor primário, intervalo livre de doença do diagnóstico do tumor primário até a descoberta das metástases hepáticas

em menos de 12 meses, número de tumores maior do que 1, nível de CEA pré-operatório maior do que 200 ng/ml e tamanho do maior tumor maior do que 5 cm (70). Na prática clínica, os pacientes com MHCCR eram divididos em dois grupos: baixo risco, CRS ≤2; e alto risco, CRS> 2, com o intuito de prever o benefício da quimioterapia adjuvante (71). Com a associação entre a presença de mutações nos oncogenes da família RAS (presentes em 15–35% dos pacientes com MHCCR ressecável) menores sobrevida global e livre de recorrência após a ressecção hepática (59,72), o status da mutação RAS o substituiu o intervalo livre de doença, o número de metástases e o nível de CEA no escore MSKCC-CRS tradicional e o tornou superior em termos de predição do prognóstico destes pacientes.

Recentemente, um novo modelo prognóstico exclusivo denominado "*Tumor Burden Score*" (TBS) surgiu (73), ele foi originalmente criado com referência à ferramenta de prognóstico "Metro-ticket" para pacientes com carcinoma hepatocelular (74). O TBS também utiliza um *continuum* de tamanho e número de lesões, indicando uma mudança de paradigma de uma estratificação prognóstica dicotômica para contínua. O valor final é calculado através de um plano cartesiano contendo duas variáveis: tamanho máximo do tumor (eixo x) e número de lesões hepáticas (eixo y). Calcula-se, então, a distância de qualquer ponto da origem do plano (0, 0) em que [TBS2 (diâmetro máximo do tumor)^2 + (número de lesões)^2].

Tabela 1: Características prognósticas para pacientes com MHCCR submetidos à hepatectomia.

Variáveis	**Método de classificação /valor de *cut-off***
Fatores da MHCCR	
Número de lesões hepáticas	1-2, 3-4, 4-5, 6-7, 7-8
Diâmetro do maior tumor (cm)	> 5
Tempo de surgimento	Sincrônica/metacrônica, 6 ou 12 meses
Doença bilobar	Sim/Não
Invasão tecidual hepática	> 30%
Metástase linfonodal/hepatoduodenal	Sim/Não
Progressão da doença durante quimioterapia de primeira linha	Sim/Não
Fatores do paciente	
Idade (anos)	> 65
Intervalo livre de doença (meses)	12, 24, 30
CEA (ng/ml)	> 5 – 200
Nível de ALT	≥ 55 UL
Nível de fosfatase alcalina	>125 U/L
Nível de albumina	< 3,6 g/dL
Resposta inflamatória (PCR>10mg/L ou razão Neutrófilos/linfócitos > 5:1)	Sim/Não
Presença de metástase extra-hepática	Sim/Não, ressecável/não ressecável, outros sítios
Fatores Cirúrgicos	
Ressecção não-anatômica	Sim/Não
Lobectomia ou mais	Sim/Não
Ressecção bilateral	Sim/Não
Margem cirúrgica	Positivo/Negativo, 5mm, 10 mm
Perda de sangue na cirurgia	> 1000 ml
Tratamento cirúrgico	Sim/Não
Fatores do tumor primário	

Estadiamento de *Duke*	A ou B/C
Metástase linfonodal	Sim/Não, N1 (1-3)/N2 (≥4)
Localização	Cólon/reto, cólon direito/esquerdo
Diferenciação celular/histologia	Pouco, moderadamente, muito/ mucinoso
Invasão da serosa (estágio T)	Sim/Não
Invasão linfovascular/perineural	Sim/Não
Tumor budding	Sim/Não
Biomarcadores	
KRAS, NRAS, BRAF	Selvagem/Mutante
Escore	
MSKCC-CRS	CRS≤ 2/CRS> 2

Abreviações: CEA: antígeno carcinoembriogênico; ALT: Alanina aminotransferase; PCR; proteína C reativa, MSKCC-CRS Sloan-Kettering Cancer Center- Clinical Risk Score. Adaptado de: VOGL *et al.*, 2014.

Pacientes com MHCCR representam um desafio terapêutico para as diversas especialidades envolvidas em seu tratamento. Apesar do inegável progresso realizado em relação à identificação dos fatores prognósticos, sabe-se que esses pacientes apresentam um espectro molecular e genético bastante distinto. Adicionalmente, devido à modernização dos tratamentos antineoplásicos com a incorporação das terapias-alvo e da imunoterapia no CCR metastático e ao aprimoramento das técnicas cirúrgicas para ressecção hepática, nenhum dos sistemas propostos até o momento pode ser considerado definitivo. Ao contrário, ainda são necessários estudos que compreendam profundamente os aspectos da biologia tumoral e da heterogeneidade celular das MHCCR. Consequentemente, um sistema específico de estadiamento que inclua aspectos clínicos e moleculares e defina subtipos MHCCR pode ser necessário para refinar a prescrição terapêutica e alcançar melhores desfechos clínicos.

1.2.3. Etiologia molecular e biomarcadores

A metástase é considerada como a etapa terminal em um processo tumorigênico de várias etapas que devem ser executadas com sucesso. As células tumorais sofrem alterações genéticas e epigenéticas que resultam em seu crescimento e expansão, transição epitelial-mesenquimal (EMT, do inglês: *Epitelial-Mesenchimal Transition*), e invasão do tecido circundante, incluindo a vasculatura ou canais linfáticos (intravasamento). As células tumorais que abandonaram o seu ambiente nativo devem sobreviver às condições hostis do trânsito pelos sistemas vasculares, até que consigam se alojar nos microvasos de um órgão hospedeiro distante, migrar da corrente sanguínea para o parênquima desse órgão (extravasamento), e sobreviver dentro do novo microambiente estrangeiro (colonização) (25). Ao longo dessa trajetória, as células mantêm um diálogo dinâmico com o microambiente tumoral.

Apesar dos avanços significativos na compreensão da tumorigênese do CCR, os processos regulatórios da MHCCR ainda não foram determinados. Até o momento, não há evidências sugerindo que o processo metastático seja decorrente diretamente de alterações genéticas específicas no CCR (75).

1.3. Sistemas de reparo do DNA

Como mencionado previamente, o estadiamento TNM é amplamente usado para avaliação de risco no CCR, mas não é totalmente preciso para previsão do prognóstico (76). Este sistema depende fortemente do status linfonodal, uma medida que falha em determinar com precisão o risco de doença recorrente no estágio II (nódulo negativo) e que eventualmente metastatiza (77), explorar os subtipos moleculares do CCR e o seu impacto no comportamento clínico da doença tem o potencial de levar a uma melhor compreensão da biologia tumoral subjacente.

As deficiências nos sistemas de reparo do DNA tumoral têm sido um alvo terapêutico na oncologia por mais de um século, como evidenciado pelo amplo uso

de agentes locais (radioterapia) e sistêmicos (quimioterapia) sabidamente prejudiciais ao DNA. Apesar dos avanços na terapêutica do câncer, várias classes de agentes indutores de danos ao DNA (agentes à base de platina, alquilantes e intercalantes de DNA) continuam a compor a espinha dorsal de muitos esquemas antineoplásicos. Embora os fundamentos mecanísticos do aumento da sensibilidade das células tumorais aos danos no DNA continuem a ser elucidados em muitos contextos, a janela terapêutica para os agentes danificadores do DNA é mediada por uma relativa deficiência na função de reparo do DNA nas células tumorais em relação às células normais (78).

O sistema de reparo do DNA é um conjunto complexo que dividimos didaticamente em vias de reparo conforme o tipo de lesão no DNA que elas reparam. Estas vias são constituídas por diversas proteínas especializadas trabalhando em conjunto para reparar o dano ao DNA e permitir que a célula siga seu ciclo. Essas vias são: reparos direto, reparo por excisão de bases (BER, do inglês: *Base Excision Repair*), reparo por excisão de nucleotídeos (NER), que são responsáveis pelo reparo de danos a bases e nucleotídeos; reparo de mal pareamento (MMR), que corrige pequenos loops de inserções e deleções. Além destes, existem as vias de reparo de quebras duplas, compostos pela via de recombinação homóloga (HR, do inglês: *Homologous Recombination*), junção de exterminadas não homólogas (NHEJ, do inglês: *Non-Homologous End Joining*) e microhomologia (MMEJ, do inglês: Microhomology end joining). Possuímos ainda uma via conhecida por sua tolerância a danos, a Síntese Translesão (TLS, do inglês: *Translesion Synthesis*), que opera promovendo a tolerância a erros que bloqueiam a atividade das DNA polimerases possibilitando a replicação do DNA mesmo que com erros, e a especializada via de reparo de *crosslinks* (79,80).

Em alguns casos, a natureza da deficiência do reparo do DNA em certos tipos tumorais foi caracterizada, e já há aplicabilidade clínica para biomarcadores prognósticos e preditivos baseados nestes sistemas. Por exemplo, a associação entre a metilação do promotor de *MGMT* e a resposta à temozolomida no glioblastoma multiforme; a resposta aos inibidores de PARP baseados no princípio da letalidade sintética em tumores de mama, ovário e próstata com mutações em *BRCA1/2*; e a deficiência da via MMR em tumores colorretais e a resposta ao 5-FU e inibidores de

PD-1/PD-L1 (81–84). Além disto, o reparo disfuncional dos danos ao DNA está fortemente envolvido nos eventos de iniciação, invasão e metastatização do câncer. A deficiência em MMR em diversos tipos de tumores, por exemplo, se traduz clinicamente em características clinicopatológicas associadas à agressividade tumoral, recorrência e sobrevida do paciente (85).

1.3.1. Reparo de Malpareamento

Neste sentido, um consórcio internacional realizou o compartilhamento e a análise de dados em larga escala de seis diferentes sistemas de classificação de subtipos baseados no transcriptoma de tumores colorretais, o que gerou um modelo de consenso para a classificação molecular dos subtipos desta neoplasia. Esse consenso possibilitou a classificação da maioria dos tumores em um de quatro subtipos moleculares (CMS, do inglês: *Consensus Molecular Subtypes*) (86,87), dois deles relacionados à proficiência da via MMR.

O subtipo CMS1 (subtipo MSI-imune, 14%) compreende a maioria dos tumores com MSI, a qual resulta de inativações epigenéticas nos promotores de nos genes de MMR nas células somáticas do epitélio intestinal. A principal tarefa desta via é corrigir malpareamentos espontâneos do tipo base-base e pequenos *loops* de inserção-deleção (*indels*) que são gerados principalmente durante a replicação do DNA. Quando o MMR é deficiente, ele não corrige esses erros e, consequentemente, a taxa de mutação aumenta, assim como as alterações nas sequências e no comprimento dos microssatélites (88,89).

O sistema MMR consiste em um grupo de proteínas que interagem como heterodímeros capazes de perceber e reparar bases mal pareadas e pequenas alças formadas a partir de inserções ou deleções. O sistema MMR inclui 3 homólogos MutS (MSH2, MSH3 e MSH6) e 4 homólogos MutL (MLH1, MLH3, PMS1 e PMS2) que funcionam em pares para corrigir erros de pareamento durante a replicação do DNA. Especificamente, MSH2 forma heterodímeros com MSH3 (MutSβ) e MSH6 (MutSα). MLH1 funciona com PMS2, PMS1 e MLH3 formando MutLα, MutLβ e MutLγ,

respectivamente. A **Figura 1** apresenta os passos sequenciais de processamento destas lesões.

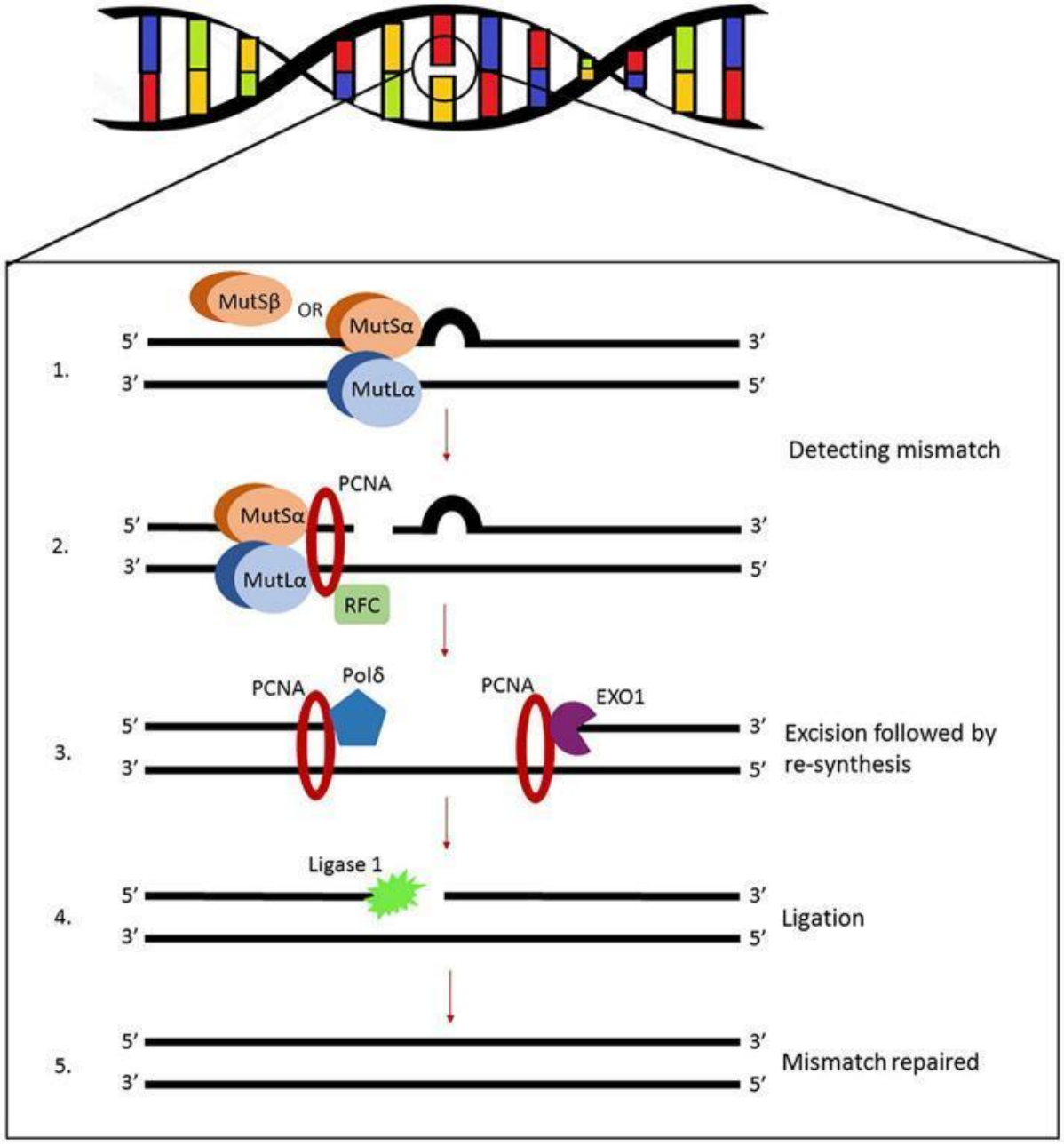

Figura* 1*: Esquema do sistema eucariótico de reparo de malpareamento (MMR). MutSα (MSH2-MSH6) ou MutSβ fazem o reconhecimento e ligam-se ao local da lesão. Em seguida, outras moléculas são recrutadas para o local, incluindo MutLα (MLH1-PMS2), o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o fator de replicação C (RFC). A presença destes três componentes forma um complexo que inicia a atividade endonuclease de PMS2, a qual promove quebras simples no DNA próximas à região da lesão, permitindo o acesso da exonuclease 1 (EXO1). Após

excisão da lesão e ressíntese do segmento com base no segmento homólogo, a Ligase 1 liga as duas extremidades da fita, restaurando a sua integridade (90).

A forma clássica pela qual a deficiência em MMR (dMMR) é identificadaatravés de imunohistoquímica, pela qual é possível detectar a ausência de expressão de uma ou mais proteínas no tecido tumoral (91). Através desta técnica, avalia-se a expressão das proteínas MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6. A perda da expressão de MLH1 é acompanhada pela perda de PMS2 (pois formam o heterodímero MutLα) e resulta em inativação da via. Da mesma forma, a perda de PMS2 mesmo com expressão de MLH1 intacta (ausência de mutações ou silenciamento epigenético do promotor de *hMLH1*) ou a perda de expressão de MSH2 ou MSH6 (que forma o heterodímero MutSα) também resultam em inativação da via (92).

Variações na deficiência de genes de reparo de DNA são importantes para a suscetibilidade tumoral específica. A perda do funcionamento adequado das proteínas de reparo de danos ao DNA, seja por meio de mutações ou pela perda de tradução, introduz instabilidade genômica crítica para a evolução do tumor (93). A disfunção do MMR em humanos foi identificada em 1993, em tumores de cólon, endométrio e outros órgãos alvo da HPNCC. Desde aquele momento, a MSI, a principal marca resultante da deficiência do MMR, foi também detectada em cerca de 15-20% de tumores colorretais esporádicos (94). Entre outras razões, o sistema de MMR também parece estar envolvido na sinalização de danos pós-replicativos do DNA, fato que pode ajudar a explicar por que o processo de transformação relacionada com defeitos de MMR preferencialmente afeta as células de proliferação rápida, tais como os tecidos do epitélio do cólon (95).

Tumores colorretais com MSI são hipermutados, frequentemente apresentam a mutação *BRAF*^{V600E} e um baixo número de alterações no número de cópias genômicas. Este subtipo é caracterizado por possuir uma forte ativação imune, incluindo ativação do receptor de morte programada- 1 (PD-1, do inglês: *Programmed Death 1*) e infiltração de células *Natural Killers* (NK), células T *helper* tipo 1, células T citotóxicas e linfócitos T citotóxicos CD8+ no tumor (96). Os tumores com MSI são frequentemente encontrados no cólon proximal e caracterizam-se por histologia mucinosa, pouca diferenciação celular e infiltração linfática e melhor prognóstico (97). Em termos de resposta terapêutica, a presença de MSI é um indicativo de resistência

ao 5-FU. Por isto, tumores colorretais em estágio II são testados para MSI para discernir entre aqueles que se beneficiarão ou não da terapia adjuvante com 5-FU, considerando que neste estágio a doença apresenta um bom prognóstico. Pacientes sem MSI e submetidos à tratamento com 5-FU apresentam sobrevida mais longa do que os pacientes sem MSI que não foram tratados (98). Em relação a pacientes com doença avançada, a deficiência em MMR/MSI, em virtude de elevar a carga mutacional e estimular a produção de neoantígenos, é o marcador preditivo de resposta à imunoterapia (99).

Em contrapartida, tumores colorretais que se enquadram no subtipo CMS4 apresentam estabilidade de microssatélites (ou proficiência da via MMR) e nível baixo de hipermetilação gênica (86). Este subtipo abrange tumores caracterizados pela ativação de vias relacionadas EMT, como integrinas e TGFβ, e têm superexpressão de proteínas ligadas ao remodelamento da matriz extracelular, bem como seu desenvolvimento apresenta influência pró-angiogênica e estromática, o que se traduz clinicamente em maior risco de metástases a distância e menor sobrevida (86). Tumores colorretais CMS4 são frequentemente diagnosticados em estágios mais avançados e possuem um pior prognóstico com a pior sobrevida após 5 anos (62%) dentre os subtipos moleculares. Embora a terapia adjuvante FOLFOX seja indicada para estadio III, tumores CMS4 não demonstram nenhum benefício com o sistema de terapia adjuvante (100).

Contudo, a prevalência de MSI em tumores colorretais metastáticos é de apenas 4% (101). Nestes tumores, a deficiência de MMR/MSI foi previamente associada a um pior prognóstico, o que poderia ser impulsionado, em parte, pelo fato de que 20-34% dos CCR em estágio IV e deficientes em MMR apresentariam maior frequência de mutações $BRAF^{V600E}$ (102). Historicamente, o tempo médio de sobrevida para estes tumores é de 10,2 meses *versus* 17,9 meses dos pacientes com CCR metastático e MMR proficiente (101).

Um estudo investigou as alterações moleculares associadas à agressividade do estágio II/III e as MHCCR correspondentes. Os autores identificaram que a presença de duas formas a deficiência de MMR foi associada à perda de heterozigosidade e a um curso de doença menos agressivo do que as MHCCR com MMR proficiente. Estes achados são particularmente relevantes para pacientes com

diagnóstico de CCR estágios II/III com MHCCR recorrente, pois significa que a doença metastática seria biologicamente mais branda e elegível à ressecção, favorecendo o prognóstico desta população (103).

Todavia, nas MHCCR, a incidência de dMMR é baixa (104), portanto, pode-se esperar que as MHCCR respondam mal aos inibidores de *checkpoint* imunológico. No entanto, esses tumores contêm infiltrados linfocitários, e um número maior de células T CD8+ infiltrantes nas metástases está positivamente associado à sobrevida global e à resposta à quimioterapia (105,106), indicando que a imunidade de células T intratumoral é um importante determinante da progressão das MHCCR. Além disso, as MHCCR proficientes em MMR são imunologicamente distintas do CCR primário em termos de infiltração imunológica (105). Outro aspecto importante é que o ambiente imunológico exclusivo no fígado favorece a tolerância imunológica (107), e é um dos mecanismos usados por este órgão para resistir às respostas imunes, incluindo a indução da expressão de receptores inibitórios nas células T hepáticas e seus ligantes nos hepatócitos e outras células do tecido hepático (108). Já foi relatado que as células T citotóxicas CD8+ e as células T *helper* CD4+ intratumorais são funcionalmente comprometidas nas MHCCR (109) e que a supressão mediada por células T reguladoras intratumorais pode ser aliviada bloqueando o receptor inibitório CTLA-4 (110). Entretanto, a expressão e os papéis funcionais dos perfis funcionais das vias de reparo do DNA para além do status da via MMR na regulação das respostas de células T efetoras e reguladoras que se infiltram no tumor ainda não foram estudados nas MHCCR.

1.3.2. Reparo por excisão de bases

No âmbito dos sistemas de reparo do DNA no CCR emerge a importância de outra via, inicialmente relacionada à etiologia da doença. Apesar de a causa da maior parte dos CCR serem fatores ambientais, os estudos mostram que as predisposições individuais para desenvolver este tipo de neoplasia podem depender de mudanças genéticas, incluindo modificações nos genes envolvidos no processo de reparo do DNA. A principal fonte de danos ao DNA colônico vem do metabolismo oxidativo e da

respiração celular, os quais geram produtos que podem atuar tanto na modificação de bases quanto induzindo quebras simples e duplas na cadeia do DNA (111). Portanto, a superprodução de espécies reativas do oxigênio combinada com a insuficiência de mecanismos de defesa aos danos oxidativo é um dos maiores contribuintes para a carcinogênese colorretal (112). Considerando ainda que os principais fatores etiológicos do CCR são sabidos por estimular não apenas os processos oxidativo como a lipoperoxidação, vê-se o quanto uma via que remova os danos oxidativos é essencial para a estabilidade da integridade genômica destas células (113).

O BER atua como um dos processos mais ativos de reparo do DNA tão exposto aos danos endógenos das células intestinais, permitindo o reconhecimento específico da lesão e a excisão de uma até doze bases danificadas. Além disto, esta via é também responsável pela remoção de bases danificadas por desaminação espontânea e enzimática, depurinação e pela exposição a agentes exógenos, como alguns quimioterápicos (114). Normalmente, o BER é iniciado pelo reconhecimento e remoção de bases danificadas por DNA glicosilases (UNG, OGG1, MPG), resultando na formação de sítios apurínicos/apirimidínicos (AP). Os sítios AP são altamente mutagênicos e requerem processamento subsequente por uma AP-endonuclease (APE1) ou pela atividade liase das glicosilases bifuncionais, que removem a estrutura fosfodiéster do sítio AP e produzem uma extremidade 3’ -OH e outra 5’ dRP. Deste processo, resultam quebras simples (SSB, do inglês: *Single Strand Breaks*), que podem ser processadas pelas vias longa ou curta do BER. Neste ponto, na formação de uma SSB, a poli (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1) é envolvida, sinalizando a presença deste intermediário, protegendo contra a formação de quebras duplas (DSB, do inglês: *Double Strand Breaks*) e desempenhando um papel no recrutamento de proteínas através de sua atividade de poli (ADP-ribosil) (115). Uma DNA polimerase (como a Polβ) limpa o grupamento 5’ dRP e preenche o sítio AP, utilizando como molde a fita complementar. Finalmente, uma DNA ligase III associada à XRCC1 (*X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 1*), selam a ligação e estabilizam a fita de DNA reparada. Quando a extremidade 5' não é frágil e não é passível de processamento pela Polβ, a via longa é recrutada. Uma mudança de polimerase para Polδ/ε estimula o deslocamento da fita e cria um *flap* 5′ de 2–8 nucleotídeos, clivado pela FEN1 (*Flap Endonuclease 1*) e subsequentemente ligado pela DNA ligase I

(**Figura 2**). Não se sabem precisamente os mecanismos exatos pelos quais as subvias são escolhidas, mas essa escolha provavelmente depende do tipo específico de dano à base, bem como da disponibilidade de enzimas e fatores específicos do BER (116).

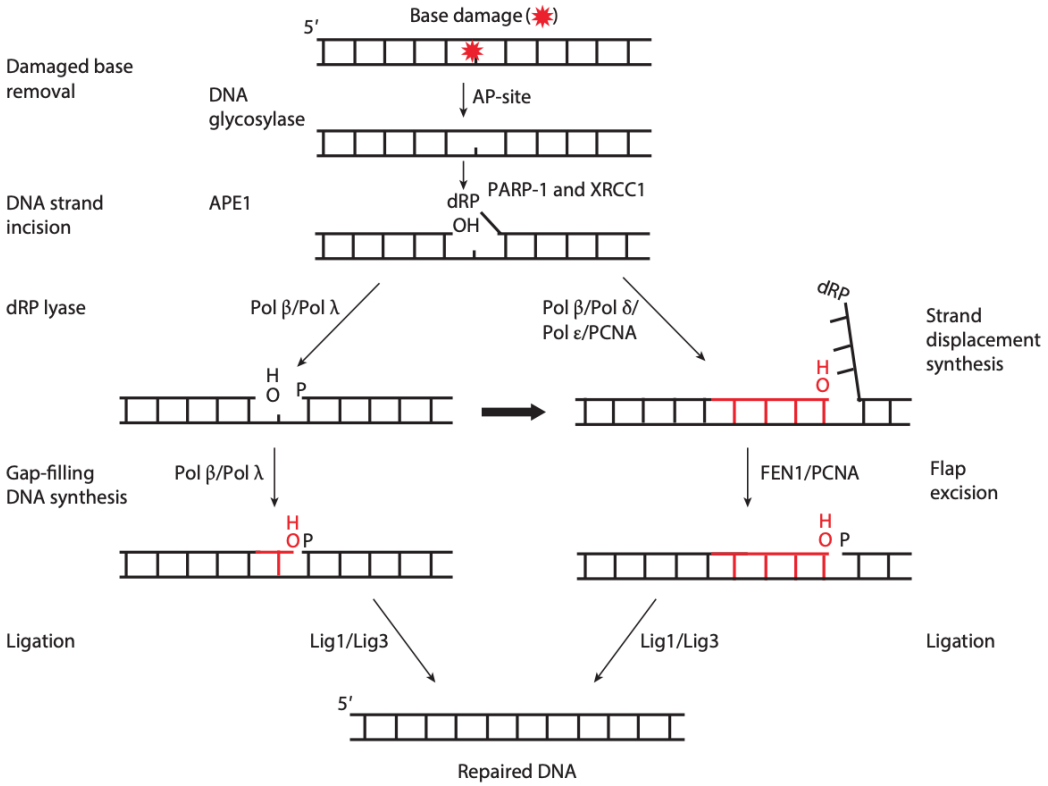

Figura 2: Visão geral esquemática do BER. O BER é iniciada pelo reconhecimento e remoção de uma base danificada (estrela vermelha) por uma DNA glicosilase. Após a formação de um sítio AP, APE1 remove a estrutura fosfodiéster do sítio AP e produz uma extremidade 3' -OH e outra 5' dRP. O BER pode então seguir por uma via curta (*short-patch*) ou longa (*long-patch*). Abreviaturas: AP: sítio apurínico/ apirimidínico; APE1: AP-endonuclease 1; FEN1: flap endonuclease 1; Lig: ligase; PARP1: poli (ADP-ribose) polimerase 1; PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular; Pol: DNA polimerase; XRCC1: X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 1 (116).

A relevância clássica do BER no CCR está relacionada à mutação germinativa no gene *MUTYH*, responsável pela polipose associada ao *MUTYH* (MAP), a qual

responde por 0,3-1% de todos os casos de CCR (117). Pacientes portadores de mutações em *MUTYH* (Tyr165Cys ou Gly382Asp) tendem a desenvolver múltiplos pólipos adenomatosos no cólon durante sua vida e apresentam um risco até 93 vezes maior de desenvolver CCR (118). MUTYH é uma DNA glicosilase de DNA envolvida no reparo de danos oxidativos e de erros pós-replicativos (119). No entanto, outros componentes do BER têm chamado a atenção no contexto da carcinogênese esporádica do CCR, seu prognóstico e resposta à quimioterapia.

Diferentemente do MMR, a perda ou inativação de um dos componentes do BER não resulta em deficiência completa da via, mas em desequilíbrio. Este desequilíbrio pode ser causado por superexpressão, perda ou inibição de um ou mais de seus componentes, e garante uma imensa versatilidade de desfechos ainda desconhecidos para as células. Por exemplo, enquanto a ausência de uma DNA glicosilase previne a iniciação do BER, a inibição de PARP1 permite a iniciação da via, mas com um grande acúmulo de intermediários tóxicos (120). De acordo com o conceito de “desequilíbrio do BER” (121), qualquer desequilíbrio na disponibilidade ou no funcionamento de uma determinada enzima pode levar ao acúmulo de intermediários tóxicos (como sítios abásicos não processados e quebras simples), mas também de mutações e formação de produtos proteicos incompletos ou avariados, dependendo da região do DNA em que ocorrem. Dependendo do nível deste acúmulo, eles podem oferecer a célula uma toxicidade ainda maior do que aquela gerada por uma lesão em uma base em especial.

Curiosamente, o MMR atua nas mesmas lesões de base que o BER. Esta compreensão é particularmente importante na resposta à terapia, incluindo análogos de nucleosídeos que se incorporam ao DNA (5-FU), antifolatos que inibem a síntese de trifosfato de desoxitimidina e, portanto, aumentam a incorporação de uracila, como o pemetrexedo; agentes desmetilantes, que causam danos ao DNA por aprisionamento de DNA metiltransferase, como a decitabina; agentes platinados, como a cisplatina e a oxaliplatina; e agentes alquilantes que produzem adutos de DNA, como a temozolomida) (122–124). Assim, vários agentes quimioterápicos produzem modificações no DNA que dependem do BER para remoção e modulação da citotoxicidade destes agentes em células tumorais. As abordagens atuais de radioterapia, além de quebras duplas, também geram uma grande proporção de

danos ao DNA, uma vez que a radiação ionizante induz danos diretos às bases, danos oxidativos e quebras simples no DNA, todas reconhecidas pelo BER. Portanto, a quantidade de danos induzidos ao DNA pela quimioterapia e/ou radioterapia devem sobrecarregar a capacidade da célula tumoral em repará-los para que a eficácia terapêutica seja alcançada (125).

1.3.2.1. OGG1

O dano oxidativo ao DNA é um grande fardo para as células que sofrem respiração aeróbia. Por este motivo, as células desenvolveram um elaborado sistema de reparo para remover lesões oxidativas no DNA. Níveis elevados de espécies reativas do oxigênio (ERO) ou baixas defesas antioxidantes levam ao desequilíbrio na formação de danos ao DNA. As ERO, ao interagirem diretamente com o DNA, resultam em danos às bases, induzindo à formação de sítios apurínicos ou apirimidínicos, ligações cruzadas entre DNA e proteínas e quebras nas fitas do DNA, todos estes eventos contribuem para a instabilidade genômica (126). Dentre as bases nitrogenadas, a guanina é o principal da oxidação, dando origem a 8-oxo-7,8-diidro-desoxiguanosina (8-oxo-dG). A 8-oxo-dG é a consequência mais pró-mutagênica das ERO, causando a transversão G:C > T:A. A 8-oxoG-DNA glicosilase (OGG1) é uma DNA glicosilase bifuncional, que atua em conjunto com a MUTYH, e a responsável pelo reconhecimento e remoção de lesões do tipo 8-oxoG (127).

No CCR esporádico, adutos de 8-oxo-dG não reparados induzem mutações em proto-oncogenes (como *KRAS),* genes supressores tumorais e também associam-se à *downregulation* de outros genes da via do BER (*MUTYH* e *hOGG1*) no tumor em relação aos tecidos adjacentes (128). Através de danos ao DNA mediados por 8-OHdG e a ativação de genes da família RAS, já se demonstrou que a deficiência de OGG1 em mamíferos resulta em mutagênese transcricional (129). Portanto, a presença de lesões oxidativas no DNA não-processadas induzem redução da capacidade funcional do BER e elevam a suscetibilidade a novos danos, promovendo fenótipos mais agressivos (130). De fato, já foi demonstrado que a capacidade de reparo do BER no tecido tumoral e na mucosa adjacente correlacionam-se

positivamente ao estágio avançado do tumor (130). Além disto, em pacientes com CCR tratados com 5-FU, a sobrevida global daqueles com menores índices de capacidade de reparo do BER no tecido tumoral foi superior em relação àqueles com capacidade de reparo mais elevada, provavelmente porque as lesões induzidas pelo 5-FU não são reparadas e as células são inevitavelmente conduzidas à apoptose (130).

Alterações nos níveis de expressão do gene *OGG1* foram relatadas em tecidos epiteliais intestinais saudáveis, adenocarcinomas colorretais e células mononucleares do sangue de pacientes com CCR. A redução na expressão de *OGG1* em adenocarcinomas colorretais (em comparação com tecidos circunvizinhos saudáveis) foi associada a tumores distais e em estágios mais avançados (131). Contrariamente, níveis mais elevados de *OGG1* em leucócitos de pacientes com neoplasias e em tumores colorretais foram associados a características de pior prognóstico, como maior invasividade tecidual e elevado grau de diferenciação celular (132,133).

Alguns estudos já relataram que as concentrações urinárias nos tecidos tumorais do metabólito 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OH-dG) são maiores em pacientes com câncer de fígado ou de vias biliares (134,135). Um estudo avaliando paciente com doenças hepatobiliares demonstrou que os níveis concentração urinária de 8-oxo-dG são maiores nos pacientes com doenças malignas. Entre os pacientes com colangiocarcinoma intra-hepático e carcinoma da vesícula biliar, os níveis de 8-OH-dG urinário tenderam a ser mais elevados em pacientes com metástases para linfonodos positivos do que naqueles com doença negativa para linfonodos (136).

Durante a cirurgia de ressecção hepática, a ocorrência de manobras envolvendo isquemia/reperfusão foram associadas à disfunção de hepatócitos, aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias, aumento da atividade aumentada de metaloproteinases metastáticas, que por sua vez podem estimular a progressão de micrometástases do carcinoma colorretal metastático (137,138). Além disto, o trauma cirúrgico cria condições favoráveis para o aumento descontrolado das concentrações de radicais superóxido ($O2^{-}$), os quais causam a oxidação do DNA, levando à oxidação de várias bases e nucleotídeos no DNA (139). Esta situação cria um estado redox no órgão tratado com cirurgia e no organismo em geral, o que é um

fator chave na recidiva local e de metástases distantes após a realização da ressecção tumoral.

Mais recentemente, demonstrou-se que o aumento nos níveis urinários de 8-OH-dG entre pacientes submetidos à ressecção R0 de MHCCR foram associados ao tempo de isquemia térmica (≥ 40 min), duração da cirurgia (≥ 300 min), volume da maior lesão (≥ 12 cm3) e grau de diferenciação tumoral. Além disto, os níveis de 8-OH-dG na urina são significativamente mais elevados em pacientes com metástases de longo prazo, em comparação aos pacientes sem metástases (140). Em colangiocarcinomas, a redução da expressão de OGG1, avaliada por imunoistoquímica, foi associada à maior grau de invasividade tecidual (T4), presença de invasão linfovascular e perineural, e um prognóstico significativamente pior (sobrevida global e sobrevida livre de recorrência) (141). Todavia, nenhum estudo até o momento avaliou a expressão gênica ou proteica de OGG1 diretamente em amostras de MHCCR.

1.3.2.2. DNA Polimerase β

As células eucarióticas expressam diversas DNA polimerases, e muitas delas estão envolvidas no reparo do DNA. Genes humanos que codificam pelo menos 17 polimerases de DNA já foram caracterizados até o momento, e pelo menos 11 destas têm propriedades consistentes com papéis no reparo do DNA. A Polβ contribui com duas reações enzimáticas que modificam os terminais 3’ e 5’ através das suas atividades polimerase e liase, que modificam o DNA a montante e a jusante da fita incisada, respectivamente. Como mencionado anteriormente, a Polβ catalisa a adição de um monofosfato de desoxinucleosídeo (dNMP) à extremidade 3’ (atividade da polimerase) enquanto remove a porção 5’-dRP (atividade da liase), gerando assim uma incisão no DNA (116).

Defeitos em Polβ têm sido associados a câncer, envelhecimento, neurodegeneração; sua expressão é crítica para a resposta celular a genotoxinas ambientais e quimioterápicas. A via curta do BER, dependente de Polβ, é um processo altamente complexo que envolve várias proteínas e requer múltiplas

interações proteína-proteína para o reparo (dependendo da lesão de base). Portanto, é possível que interferências sobre a função desta proteína inibam substancialmente o reparo do DNA mediado por esta via (142).

Foi sugerido que tumores colorretais ou linhagens celulares que apresentam mutações no gene *APC* (considerado o primeiro evento genético da sequência adenoma-carcinoma) produzem uma proteína truncada sem o domínio inibidor de reparo de DNA. Por meio de uma interação entre a APC truncada e Polβ, é possível que a eficiência do BER seja comprometida nestas células, e este processo esteja envolvido com a indução de apoptose das células tumorais (143). Em tumores avançados de mama, agressividade tumoral e pior prognóstico foram associado à presença de baixa expressão de POLB e de Polβ (144). Em contrapartida, níveis mais elevados de expressão do gene *POLB* do seu produto proteico, Polβ, foram associados à presença de linfonodos metastáticos, tumores mais avançados, tumores localizados no cólon direito e à menor sobrevida global (132,145,146). Resultados semelhantes foram encontrados em pacientes com câncer gástrico superexpressando *POLB*, os quais apresentaram metástases linfonodais e alto grau de diferenciação celular. Além disso, estes pacientes apresentaram menor tempo de sobrevida global após a quimioterapia pós-operatória (147). Apesar destes resultados, os níveis de *POLB*/Polβ ainda não foram avaliados em MHCCR.

1.3.2.3. PARP1

PARP1 é uma enzima abundante, considerada como uma das primeiras respondedoras a danos e um sensor molecular de lesões no DNA, particularmente aquelas contendo sítios AP e SSB, os intermediários iniciais de BER. Após a ligação ao local da lesão no DNA, PARP1 é ativada e inicia a síntese de poli (ADP-ribose) (PAR). PARP1 sofre auto-PARilação e PARila outras proteínas envolvidas no reparo do DNA para promover o recrutamento de outras proteínas de BER, incluindo XRCC1 e Polβ. Desta forma, PARP1 tem um impacto positivo no sistema BER. No entanto, diante do excesso de dano ao DNA, PARP1 também pode ter um impacto negativo na sobrevivência celular de duas formas: (1) ao formar um *crosslink* com o sítio AP,

sinalizando a falha do BER; e (2) ao desencadear a PARilação em excesso, levando ao esgotamento dos níveis celulares de adenosina trifofosfato (ATP) e de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD, do inglês: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide)*, resultando na morte celular (116).

O nível de expressão de PARP1 em amostras tumorais de CCR em relação ao epitélio colônico normal pode ser uma forma de ditar a especificidade dos tecidos neoplásicos ao potencial emprego de inibidores de PARP (PARPi). Neste sentido, já foram descritos níveis mais elevados de PARP1 em amostras de pólipos adenomatosos e de tumores colorretais em relação aos tecidos adjacentes, sugerindo uma influência na progressão de CCR (148). A elevação dos níveis de PARP1 em tumores colorretais (em relação aos tecidos adjacentes) foi também associada à maior chance de recorrência da doença e à presença de dMMR/MSI. Ainda, comparativamente ao tumor primário, relatou-se níveis de PARP1 ainda maiores nas metástases (149).

Em contrapartida, outros estudos relataram que a superexpressão de PARP1 em tecidos tumorais colorretais associa-se a características clínicas de menor agressividade tumoral, como localização proximal e ausência de invasões linfática e perineural (131,132). Em relação ao prognóstico da doença, foi sugerido que a superexpressão de PARP1 é um preditor de piores sobrevida global e sobrevida livre de progressão nestes pacientes (150).

1.3.2.4. XRCC1

XRCC1 é uma proteína *scaffold* acessória do BER, que interage com POLβ e DNA ligase III (116). Em tumores colorretais e em tumores gástricos localmente avançados ou metastáticos, a expressão de XRCC1 já foi investigada como marcador de ausência de resposta à quimioterapia (FOLFOX-4), mas sem sucesso em ambos os casos (151–153). No entanto, a superexpressão desta proteína em tumores colorretais foi associada a tumores com alto grau de diferenciação, presença de invasão linfática, metástases em linfonodos regionais e maior invasividade tecidual (132,145).

Recentemente, foi reportada a existência de uma associação entre os níveis de expressão da enzima desintoxicante de aldeído, a aldeído desidrogenase 2 (*ALDH2*), e *XRCC1*. Independentemente do tipo de neoplasia, viu-se que a expressão dos genes correspondentes era invariavelmente inversa. Contudo, tumores com baixos níveis de expressão gênica de *ALDH2* e altos níveis de *XRCC1* indicam pior sobrevida global, particularmente em pacientes com câncer de pulmão e fígado (154). Entretanto, não há estudos avaliando a expressão gênica ou proteica de XRCC1 em MHCCR.

1.3.3. Reparo por excisão de bases e sistema imune tumoral

Embora a atividade coordenada das vias de reparo do DNA corrija rapidamente a maioria das lesões de DNA, o reparo tardio ou inadequado pode levar a alterações no genoma do tumor que alterem o equilíbrio imunológico no microambiente tumoral. A interação entre o tumor e o sistema imune do hospedeiro tem sido apreciada por várias décadas, e tentativas terapêuticas para ativar o sistema imune do hospedeiro para eliminar células tumorais mostraram alguma eficácia clínica (78).

A terapia com bloqueadores de *checkpoint* imunológico surgiu recentemente como um tratamento de próxima geração promissor do câncer. Uma terapia em particular é a terapia com anticorpo monoclonal contra a proteína de morte celular programada (PD-1) e contra o ligante da proteína de morte programada 1 (PD-L1), as quais têm sido amplamente exploradas em vários tipos de tumores avançados e refratários às terapias de primeira linha (155). O anticorpo anti-PD-1/PD-L1 restaura as respostas imunes antitumorais interrompendo as interações entre PD-1 e seu ligante, PD-L1, proporcionando assim efeitos antitumorais eficazes, ao aumentar a atividade imunológica do corpo contra o tumor. No entanto, as respostas a esta abordagem são altamente variáveis (155). Enquanto os anticorpos anti-PD-1/PD-L1 por si só produzem taxas de resposta dramáticas para pacientes altamente respondedores (cerca de 5% dos pacientes), aproximadamente 40% dos pacientes apresentam progressão da doença (156,157).

Por este motivo, à medida que a evidência do uso dos inibidores de *checkpoint* imunológico continua a crescer, uma grande necessidade não completamente atendida é a identificação de biomarcadores confiáveis que prevejam a resposta a estes agentes. Alternativamente, combinações entre os anticorpos anti-PD-1/PD-L1 e radioterapia e/ou quimioterapia vêm sendo alvo de estudo para potencializar os resultados da imunoterapia.

O tratamento repetido com 5-FU tende a reprimir as funções imunológicas antitumorais e a elevar a expressão de PD-L1 nas células tumorais. A droga inicialmente promove a proliferação e citotoxicidade de células T CD8 + infiltrantes de tumor após um ciclo de tratamento, mas após ciclos repetidos as funções imunológicas antitumorais ficam prejudicadas, com a liberação de fatores imunossupressores, o que pode diminuir a eficácia antitumoral da quimioterapia (158). Como 5-FU regula positivamente a expressão de PD-L1, a indução precoce da expressão desta proteína é potencialmente benéfica, pois sensibilizaria o tumor ao anticorpo anti-PD-L1 (159).

Agentes alquilantes (platinados) também estimulam a imunidade antitumoral, através de diferentes mecanismos e vias, incluindo um aumento da infiltração tumoral de células T CD8 +. Esses efeitos tendem a sensibilizar o tumor em relação às terapias com anticorpos anti-PD-1/PD-L1. De fato, em estudos *in vivo* e *in vitro*, já demonstrou-se que a cisplatina regula positivamente a expressão de PD-L1 (160,161).

Estas informações também devem ser consideradas quando a quimioterapia citotóxica é realizada após a imunoterapia baseada em inibidores de PD-1/PD-L1, uma vez que a única opção de tratamento para pacientes refratários ou com resposta subótima à imunoterapia é a quimioterapia. Existem dados que sustentam o fato de que a resposta à quimioterapia após a terapia com anti- PD-1/PD-L1 é restabelecida. Em tumores gastrointestinais têm-se sugerido que as taxas de resposta à quimioterapia foram aumentadas nos casos em que os pacientes receberam imunoterapia anteriormente (162). Portanto, não apenas a imunoterapia pode reeducar as células imunossupressoras, mas também pode ressensibilizar as células tumorais à quimioterapia.

E é neste sentido que várias linhas de evidência vêm sugerindo que os diferentes perfis de comportamento dos sistemas de reparo do DNA desempenhem um papel importante na condução da sensibilidade e resposta *inibidores de checkpoint* imunológico. Atualmente, sabe-se que a diferença observada na responsividade ao bloqueio de PD-1/PD-L1 entre tumores colorretais deficientes e proficientes em MMR está relacionada ao maior número de mutações somáticas induzidas pela presença de microssatélites devido à capacidade reduzida de reparo e à formação de produtos proteicos que agem como neoantígenos. A elevada taxa de mutação pode resultar na presença de mais neoantígenos codificados, os quais desencadeiam respostas mais fortes de células T antitumorais (163). De fato, os tumores de CCR deficientes em MMR são caracterizados por infiltração de células T CD8+ mais densas e também têm níveis mais altos de expressão de moléculas de inibição do *checkpoint* imunológico, provavelmente resistindo à eliminação imunomediada do tumor, o que possivelmente explica a sua maior sensibilidade aos inibidores de PD-1/PD-L1 (164).

Recentemente, foi reportado que o dano oxidativo ao DNA e a indução de DSB regulam positivamente a expressão de PD-L1 em células tumorais. A depleção funcional do BER através do silenciamento de uma DNA glicosilase, aumenta a expressão de PD-L1 em resposta aos danos oxidativos, denotando que a sinalização de danos ao DNA é um dos mecanismos que regula a expressão de PD-L1. Além disto, análises de transcriptômica do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) revelaram que tumores com baixa expressão de genes do BER apresentam alta frequência de MSI e produção de neoantígenos e, portanto, maior expressão de PD-L1 (165). A expressão de PD-L1 também foi positivamente relacionada à expressão de γH2AX (que se refere à fosforilação da histona H2AX diante da presença de DSB) em alguns tipos de tumores, como o carcinoma de células escamosas do pulmão (166,167).

Além de dMMR/MSI, defeitos em outras vias principais dos sistemas de resposta a danos ao DNA vêm demonstrando promover a expressão de PD-L1, elevar linfócitos intratumorais e aumentar a carga de neoantígenos, os quais figuram como potenciais determinantes da resposta aos inibidores de *checkpoint* imune. Curiosamente, os pacientes com mutações em múltiplas vias dos sistemas de resposta a danos ao DNA exibem uma resposta clínica favorável aos inibidores de

PD-1/PD-L1. Portanto, é necessário compreender melhor como os componentes das várias vias relacionadas ao reparo do DNA podem melhorar a compreensão da biologia tumoral e servir como potenciais preditores da resposta dos inibidores de *checkpoint* imune.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar de décadas de avanços nos regimes de quimioterapia citotóxica, terapias biológicas, detecção radiológica e técnicas cirúrgicas, as MHCCR continuam a ser a principal causa de mortalidade em pacientes com CCR. Infelizmente, a ressecção cirúrgica de MHCCR, apesar de ser a principal abordagem com intenção curativa, tem benefícios que podem ser considerados ótimos em apenas 20-30% dos pacientes. A terapia sistêmica, por sua vez, proporciona benefício limitado de sobrevida. Pacientes com MHCCR irressecável têm um prognóstico ruim, com uma sobrevida média de apenas dois anos. Além disto, um número significativo de pacientes não se beneficiará da cirurgia de metástase hepática, porque a recorrência precoce ocorrerá. Como já observado, a taxa de recorrência de um ano após a cirurgia hepática para MHCCR pode ser tão alta quanto 50%. A identificação de pacientes com alto risco de recidiva da doença após a ressecção hepática é importante porque esses pacientes podem ser poupados de uma operação e podem receber quimioterapia para prevenir a extensão da doença disseminada.

Além de desempenhar um papel durante os primeiros eventos na tumorigênese, a perda da fidelidade do reparo do DNA tem implicações importantes para a evolução do tumor e a resposta à terapia. Características comuns de tumores, como altos níveis de estresse oxidativo, estresse replicativo e perda ou supressão de *checkpoints* de ciclo celular induzidos por danos no DNA, contribuem para um ambiente que é rico em fontes de danos no DNA. Exacerbando ainda mais os altos níveis de danos no DNA, a perda funcional de uma ou mais vias de reparo do DNA é comum em tumores. Embora apenas uma minoria dessas alterações possa ser responsável pela condução do fenótipo do tumor, o panorama geral das alterações do DNA fornece informações importantes sobre a exposição ao dano no DNA do tumor e capacidade de reparo, e pode conferir ao tumor e ao microambiente propriedades únicas que têm o potencial para ser explorado terapeuticamente.

Agentes que danificam o DNA são amplamente utilizados na oncologia clínica há décadas, e exploram deficiências no reparo do DNA tumoral. Dado o papel crescente do bloqueio do *checkpoint* imunológico como uma estratégia terapêutica, a

interação do dano no DNA do tumor com o sistema imunológico entrou recentemente em foco, e tornou-se claro que o cenário de reparo do DNA do tumor tem um papel importante na condução da resposta à imunoterapia.

É bastante plausível que a instabilidade genômica induzida pela disrupção da função normal das vias de reparo do DNA possa resultar em aumento da carga mutacional do tumor e na formação de neoantígenos, fatores que poderiam contribuir para o aumento da sensibilidade aos inibidores de *checkpoint* imune. Vários ensaios clínicos estão em andamento para testar a segurança e a eficácia de combinações de agentes direcionados para o reparo de DNA com inibidores de *checkpoint* imune diferentes cenários de proficiência do reparo de DNA. À medida que a experiência clínica com os agentes direcionados ao reparo de DNA e com os inibidores de *checkpoint* imune cresce, e à medida que as interações celulares multifacetadas entre o reparo do DNA e o sistema imunológico entram em foco, é provável que as abordagens de combinação continuem a surgir. Finalmente, apenas subconjuntos de pacientes respondem ao bloqueio do *checkpoint* imunológico, mais especificamente aqueles com deficiência na via de reparo de malpareamento, e biomarcadores de determinação de prognóstico e de resposta ao tratamento são necessários para orientar as decisões clínicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a associação da expressão de componentes-chave da via de reparo do DNA por excisão de bases (BER) com aspetos prognósticos de pacientes com metástases hepáticas de tumores colorretais submetidos à hepatectomia.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão gênica de *OGG1*, *POLB*, *PARP1* e *XRCC1* em metástases hepáticas de câncer colorretal e tecido hepático saudável adjacente;
- Avaliar a expressão proteica de PARP1 e PD-1 em metástases hepáticas de câncer colorretal;
- Correlacionar dados moleculares e dados clínicopatológicos;
- Avaliar o valor prognóstico expressão gênica de *OGG1*, *POLB*, *PARP1* e *XRCC1* e da expressão proteica de PARP1 e PD-1 em relação à sobrevida global e à sobrevida livre de progressão da doença.

4. REFERÊNCIAS

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut. 2017;66(4):683–91.

2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394–424.

3. Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. Oncoscience. 2014;1(6):400–6.

4. Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. Prz Gastroenterol. 2019;14(2):89–103.

5. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. Ecancermedicalscience. 2015;9:1–20.

6. Fearon EF, Vogelstein B. for Colorectal Tumorigenesis. Cell. 1989;61:759–67.

7. Ijspeert JEG, Rana SAQ, Atkinson NSS, Van Herwaarden YJ, Bastiaansen BAJ, Van Leerdam ME, et al. Clinical risk factors of colorectal cancer in patients with serrated polyposis syndrome: A multicentre cohort analysis. Gut. 2017;66(2):278–84.

8. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nat Med. 2004;10(8):789–99.

9. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist L, Chen YJ, Ciombor KK, et al. NCCN Guidelines ® Insights Colon Cancer, Version 2.2018 Featured Updates to the NCCN Guidelines. JNCCN J Natl Compr Cancer Netw. 2018;16(4):359–69.

10. Boland RC, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. Gastroenterology. 2010;138(6):2073–87.

11. Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: The 7th

edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol. 2010;17(6):1471–4.

12. O'Connell MJ, Campbell ME, Goldberg RM, Grothey A, Seitz JF, Benedetti JK, et al. Survival following recurrence in stage II and III colon cancer: Findings from the ACCENT data set. J Clin Oncol. 2008;26(14):2336–41.

13. Biagi JJ, Raphael MJ, Mackillop WJ, Kong W, King WD, Booth CM. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. Jama [Internet]. 2011;305(22):2335–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21642686

14. Aghili M, Izadi S, Madani H, Mortazavi H. Clinical and pathological evaluation of patients with early and late recurrence of colorectal cancer. Asia Pac J Clin Oncol. 2010;6(1):35–41.

15. Cheng L, Eng C, Nieman LZ, Kapadia AS, Du XL. Trends in colorectal cancer incidence by anatomic site and disease stage in the United States from 1976 to 2005. Am J Clin Oncol Cancer Clin Trials. 2011;34(6):573–80.

16. Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Kitagawa Y. The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis. J Gastrointest Surg. 2016;20(3):648–55.

17. Benson AB, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, et al. Metastatic colon cancer, version 3.2013: Featured updates to the NCCN guidelines. JNCCN J Natl Compr Cancer Netw. 2013;11(2):141–52.

18. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. J Clin Oncol. 2004;22(16):3408–19.

19. QUASAR Collaborative Group. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. Lancet. 2007;370(9604):2020–9.

20. Schrag D, Rifas-Shiman S, Saltz L, Bach PB, Begg CB. Adjuvant chemotherapy

use for medicare beneficiaries with stage II colon cancer. J Clin Oncol. 2002;20(19):3999–4005.

21. Figueredo A, Coombes ME, Mukherjee S. Adjuvant therapy for completely resected stage II colon cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2008;(3).

22. Benson AB, Hamilton SR. Path toward prognostication and prediction: An evolving matrix. J Clin Oncol. 2011;29(35):4599–601.

23. Dotan E, Cohen SJ. Challenges in the management of stage II colon cancer. Semin Oncol. 2011;38(4):511–20.

24. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. Ann Surg Oncol. 2018;25(6):1454–5. Available from: https://doi.org/10.1245/s10434-018-6462-1

25. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. Nature. 2016;529(7586):298–306.

26. Hackl C, Neumann P, Gerken M, Loss M, Klinkhammer-Schalke M, Schlitt HJ. Treatment of colorectal liver metastases in Germany: A ten-year population-based analysis of 5772 cases of primary colorectal adenocarcinoma. BMC Cancer. 2014;14(1):1–10.

27. Leporrier J, Maurel J, Chiche L, Bara S, Segol P, Launoy G. A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. Br J Surg. 2006;93(4):465–74.

28. Sjövall A, Järv V, Blomqvist L, Singnomklao T, Cedermark B, Glimelius B, et al. The potential for improved outcome in patients with hepatic metastases from colon cancer: A population-based study. Eur J Surg Oncol. 2004;30(8):834–41.

29. Landreau P, Drouillard A, Launoy G, Ortega-Deballon P, Jooste V, Lepage C, et al. Incidence and survival in late liver metastases of colorectal cancer. J Gastroenterol Hepatol. 2015;30(1):82–5.

30. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. Ann Surg. 2006;244(2):254–9.

31. Argiles G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised Colon Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-up. Ann Oncol. 2020; Available from: https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.022

32. Brouquet A, Mortenson MM, Vauthey JN, Rodriguez-Bigas MA, Overman MJ, Chang GJ, et al. Surgical Strategies for Synchronous Colorectal Liver Metastases in 156 Consecutive Patients: Classic, Combined or Reverse Strategy? J Am Coll Surg. 2010;210(6):934–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2010.02.039

33. Brouquet A, Abdalla EK, Kopetz S, Garrett CR, Overman MJ, Eng C, et al. High survival rate after two-stage resection of advanced colorectal liver metastases: Response-based selection and complete resection define outcome. J Clin Oncol. 2011;29(8):1083–90.

34. Rees M, Tekkis PP, Welsh FKS, O'Rourke T, John TG. Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: A multifactorial model of 929 patients. Ann Surg. 2008;247(1):125–35.

35. Tzeng CWD, Aloia TA. Colorectal Liver Metastases. J Gastrointest Surg. 2013;17(1):195–202.

36. Settmacher U, Dittmar Y, Knösel T, Schöne U, Heise M, Jandt K, et al. Predictors of long-term survival in patients with colorectal liver metastases: A single center study and review of the literature. Int J Colorectal Dis. 2011;26(8):967–81.

37. Pulitanò C, Bodingbauer M, Aldrighetti L, De Jong MC, Castillo F, Schulick RD, et al. Liver resection for colorectal metastases in presence of extrahepatic disease: Results from an international multi-institutional analysis. Ann Surg Oncol. 2011;18(5):1380–8.

38. De Jong MC, Pulitano C, Ribero D, Strub J, Mentha G, Schulick RD, et al. Rates and patterns of recurrence following curative intent surgery for colorectal liver metastasis: An international multi-institutional analysis of 1669 patients. Ann Surg. 2009;250(3):440–7.

39. Brandi G, De Lorenzo S, Nannini M, Curti S, Ottone M, Dall'Olio FG, et al. Adjuvant chemotherapy for resected colorectal cancer metastases: Literature review and meta-analysis. World J Gastroenterol. 2016;22(2):519–33.

40. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. Ann Oncol. 2016;27(8):1386–422.

41. Chua TC, Saxena A, Liauw W, Kokandi A, Morris DL. Systematic review of randomized and nonrandomized trials of the clinical response and outcomes of neoadjuvant systemic chemotherapy for resectable colorectal liver metastases. Ann Surg Oncol. 2010;17(2):492–501.

42. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): Long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2013;14(12):1208–15.

43. Sorbye H, Mauer M, Gruenberger T, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, et al. Predictive factors for the benefit of perioperative FOLFOX for resectable liver metastasis in colorectal cancer patients (EORTC Intergroup Trial 40983). Ann Surg. 2012;255(3):534–9.

44. Sabanathan D, Eslick GD, Shannon J. Use of Neoadjuvant Chemotherapy Plus Molecular Targeted Therapy in Colorectal Liver Metastases: A Systematic Review and Meta-analysis. Clin Colorectal Cancer [Internet]. 2016;15(4):e141–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2016.03.007

45. Wong R, Cunningham D, Barbachano Y, Saffery C, Valle J, Hickish T, et al. A multicentre study of capecitabine, oxaliplatin plus bevacizumab as perioperative treatment of patients with poor-risk colorectal liver-only metastases not selected for upfront resection. Ann Oncol. 2011;22(9):2042–8.

46. Cui CH, Huang SX, Qi J, Zhu HJ, Huang ZH, Yu JL. Neoadjuvant chemotherapy (NCT) plus targeted agents versus NCT alone in colorectal liver metastases patients: A systematic review and meta-analysis. Oncotarget.

2015;6(41):44005–18.

47. Kataoka M, Kanda M, Ishigure K, Matsuoka H, Sato Y, Takahashi T, et al. The COMET Open-label Phase II Study of Neoadjuvant FOLFOX or XELOX Treatment Combined with Molecular Targeting Monoclonal Antibodies in Patients with Resectable Liver Metastasis of Colorectal Cancer. Ann Surg Oncol. 2017;24(2):546–53.

48. Araujo RLC, Gönen M, Herman P. Chemotherapy for Patients with Colorectal Liver Metastases Who Underwent Curative Resection Improves Long-Term Outcomes: Systematic Review and Meta-analysis. Ann Surg Oncol. 2015;22(9):3070–8.

49. Khoo E, O'Neill S, Brown E, Wigmore SJ, Harrison EM. Systematic review of systemic adjuvant, neoadjuvant and perioperative chemotherapy for resectable colorectal-liver metastases. HPB. 2016;18(6):485–93. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.hpb.2016.03.001

50. Wang ZM, Chen YY, Chen FF, Wang SY, Xiong B. Peri-operative chemotherapy for patients with resectable colorectal hepatic metastasis: A meta-analysis. Eur J Surg Oncol. 2015;41(9):1197–203. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2015.05.020

51. Ayez N, van der Stok EP, de Wilt H, Radema SA, van Hillegersberg R, Roumen RM, et al. Neo-adjuvant chemotherapy followed by surgery versus surgery alone in high-risk patients with resectable colorectal liver metastases: The CHARISMA randomized multicenter clinical trial. BMC Cancer. 2015;15(1):1–7.

52. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: A new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. Ann Surg. 2004;240(2):205–13.

53. Zhao L, Bao F, Yan J, Liu H, Li T, Chen H, et al. Poor prognosis of young patients with colorectal cancer: a retrospective study. Int J Colorectal Dis. 2017;1–10.

54. Margonis GA, Buettner S, Andreatos N, Wagner D, Sasaki K, Barbon C, et al. Prognostic Factors Change Over Time After Hepatectomy for Colorectal Liver

Metastases: A Multi-institutional, International Analysis of 1099 Patients. Ann Surg. 2019;269(6):1129–37.

55. Ribeiro HSC, Costa WL, Diniz AL, Godoy AL, Herman P, Coudry RA, et al. Extended preoperative chemotherapy, extent of liver resection and blood transfusion are predictive factors of liver failure following resection of colorectal liver metastasis. Eur J Surg Oncol. 2013;39(4):380–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2012.12.020

56. Creasy JM, Sadot E, Koerkamp BG, Chou JF, Gonen M, Kemeny NE, et al. Actual 10-year survival after hepatic resection of colorectal liver metastases: what factors preclude cure? Surg (United States). 2018;163(6):1238–44. Available from: https://doi.org/10.1016/j.surg.2018.01.004

57. Marques MC, Héber HS, Costa WL, de Jesus VHF, de Macedo MP, Diniz AL, et al. Is primary sidedness a prognostic factor in patients with resected colon cancer liver metastases (CLM)? J Surg Oncol. 2018;117(5):858–63.

58. Nicholson BD, Shinkins B, Pathiraja I, Roberts NW, James TJ, Mallett S, et al. Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer. Cochrane Database Syst Rev. 2014;2014(6).

59. Passiglia F, Bronte G, Bazan V, Galvano A, Vincenzi B, Russo A. Can KRAS and BRAF mutations limit the benefit of liver resection in metastatic colorectal cancer patients? A systematic review and meta-analysis. Crit Rev Oncol Hematol. 2016;99(2015):150–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.12.015

60. Tsilimigras DI, Ntanasis-Stathopoulos I, Bagante F, Moris D, Cloyd J, Spartalis E, et al. Clinical significance and prognostic relevance of KRAS, BRAF, PI3K and TP53 genetic mutation analysis for resectable and unresectable colorectal liver metastases: A systematic review of the current evidence. Surg Oncol. 2018;27(2):280–8. Available from: https://doi.org/10.1016/j.suronc.2018.05.012

61. Wang K, Xu D, Yan XL, Poston G, Xing BC. The impact of primary tumour location in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastasis. Eur J Surg Oncol. 2018;44(6):771–7.

62. Margonis GA, Spolverato G, Kim Y, Karagkounis G, Choti MA, Pawlik TM. Effect of KRAS Mutation on Long-Term Outcomes of Patients Undergoing Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastases. Ann Surg Oncol. 2015;22(13):4158–65.

63. Schirripa M, Bergamo F, Cremolini C, Casagrande M, Lonardi S, Aprile G, et al. BRAF and RAS mutations as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection. Br J Cancer. 2015;112(12):1921–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.142

64. de Ridder JAM, Knijn N, Wiering B, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Lymphatic Invasion is an Independent Adverse Prognostic Factor in Patients with Colorectal Liver Metastasis. Ann Surg Oncol. 2015;22:638–45.

65. Liu Q, Hao L, Lou Z, Gao X, Gong H, Hong Y, et al. Survival time and prognostic factors of patients with initial noncurative colorectal liver metastases. Med (United States). 2017;96(51).

66. Acciuffi S, Meyer F, Bauschke A, Settmacher U, Lippert H, Croner R, et al. Analysis of prognostic factors after resection of solitary liver metastasis in colorectal cancer: a 22-year bicentre study. J Cancer Res Clin Oncol. 2018;144(3):593–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s00432-018-2583-y

67. Kuo IM, Huang SF, Chiang JM, Yeh CY, Chan KM, Chen JS, et al. Clinical features and prognosis in hepatectomy for colorectal cancer with centrally located liver metastasis. World J Surg Oncol. 2015;13(1):1–12.

68. Hosokawa I, Allard MA, Gelli M, Ciacio O, Vibert E, Cherqui D, et al. Long-Term Survival Benefit and Potential for Cure after R1 Resection for Colorectal Liver Metastases. Ann Surg Oncol. 2016;23(6):1897–905.

69. Margonis GA, Buettner S, Andreatos N, Sasaki K, Ijzermans JNM, Van Vugt JLA, et al. Anatomical Resections Improve Disease-free Survival in Patients with KRAS -mutated Colorectal Liver Metastases. Ann Surg. 2017;266(4):641–9.

70. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical Score for

Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer. Ann Surg. 1999;230(3):309. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1420876/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1420876/pdf/19990900s00004p309.pdf

71. Rahbari NN, Reissfelder C, Schulze-Bergkamen H, Jäger D, Büchler MW, Weitz J, et al. Adjuvant therapy after resection of colorectal liver metastases: The predictive value of the MSKCC clinical risk score in the era of modern chemotherapy. BMC Cancer. 2014;14(1).

72. Vauthey JN, Zimmitti G, Kopetz SE, Shindoh J, Chen SS, Andreou A, et al. RAS mutation status predicts survival and patterns of recurrence in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. Ann Surg. 2013;258(4):619–26.

73. Sasaki K, Morioka D, Conci S, Margonis GA, Sawada Y, Ruzzenente A, et al. The Tumor Burden Score: A New “metro-ticket” Prognostic Tool for Colorectal Liver Metastases Based on Tumor Size and Number of Tumors. Ann Surg. 2018;267(1):132–41.

74. Mazzaferro V, Llovet JM, Miceli R, Bhoori S, Schiavo M, Mariani L, et al. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the Milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. Lancet Oncol. 2009;10(1):35–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70284-5

75. Vignot S, Lefebvre C, Frampton GM, Meurice G, Yelensky R, Palmer G, et al. Comparative analysis of primary tumour and matched metastases in colorectal cancer patients: Evaluation of concordance between genomic and transcriptional profiles. Eur J Cancer. 2015;51(7):791–9.

76. Lea D, Haland S, Hagland HR, Soreide K. Accuracy of TNM staging in colorectal cancer: A review of current culprits, the modern role of morphology and stepping-stones for improvements in the molecular era. Scand J Gastroenterol. 2014;49(10):1153–63.

77. Veen T, Nedrebø BS, Stormark K, Søreide JA, Kørner H, Søreide K. Qualitative

and quantitative issues of lymph nodes as prognostic factor in colon cancer. Dig Surg. 2013;30(1):1–11.

78. Mouw KW, Goldberg MS, Konstantinopoulos PA, D'Andrea AD. DNA damage and repair biomarkers of immunotherapy response. Cancer Discov. 2017;7(7):675–93.

79. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. Environ Mol Mutagen. 2017;58(5):235–63.

80. Knijnenburg TA, Wang L, Zimmermann MT, Chambwe N, Gao GF, Cherniack AD, et al. Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. Cell Rep. 2018;23(1):239-254.e6.

81. Farmer H, McCabe H, Lord CJ, Tutt AHJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. Nature. 2005;434(7035):917–21.

82. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, De Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):997–1003.

83. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. Science (80-). 2003;302(5645):643–6.

84. Scott CL, Swisher EM, Kaufmann SH. Poly (ADP-Ribose) polymerase inhibitors: Recent advances and future development. J Clin Oncol. 2015;33(12):1397–406.

85. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. Nat Med. 2016;22(11):1342–50.

86. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. Vol. 17, Nature Reviews Cancer. 2017. p. 79–92.

87. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et

al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med [Internet]. 2015;21(11):1350–6. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.3967

88. Kunkel TA. Evolving Views of DNA Replication (In) Fidelity OVERLAPPING FUNCTIONS. cold Spring Harb Lab Press. 2009;LXXIV:1–11.

89. Schmidt MHM, Pearson CE. Disease-associated repeat instability and mismatch repair. DNA Repair (Amst). 2016;38:117–26.

90. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. Front Mol Biosci. 2020;7(June):1–12.

91. Lindor BNM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Testing in Phenotyping Colorectal Tumors. Society. 2002;20(4):1043–8.

92. Evrard C, Tachon G, Randrian V, Karayan-Tapon L, Tougeron D. Microsatellite instability: Diagnosis, heterogeneity, discordance, and clinical impact in colorectal cancer. Cancers (Basel). 2019;11(10):1–25.

93. Clark N, Wu X, Her C. MutS Homologues hMSH4 and hMSH5: Genetic Variations, Functions, and Implications in Human Diseases. Curr Genomics. 2013;14(2):81–90.

94. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. J Natl Cancer Inst. 2011;103(11):863–75.

95. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2011;6(1):479–507. Available from: http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pathol-011110-130235

96. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. Immunity. 2016;44(3):698–711.

97. Müller MF, Ibrahim AEKK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. Virchows Arch. 2016;469(2):125–34. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3

98. Webber EM, Kauffman TL, Connor EO, Goddard KAB. Systematic review of the predictive effect of MSI status in colorectal cancer patients undergoing 5FU-based chemotherapy. 2015;1–12.

99. Lee V, Murphy A, Le DT, Diaz LA. Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade. Oncologist. 2016;21(10):1200–11.

100. Thanki K, Nicholls ME, Gomez G, Gajjar A, Senagore J, Rashidi L, et al. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal cancer and their Clinical Implications. Int Biol Biomed J. 2017;3(3):105–11.

101. Koopman M, Kortman GAM, Mekenkamp L, Ligtenberg MJL, Hoogerbrugge N, Antonini NF, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. Br J Cancer. 2009;100(2):266–73.

102. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: A pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. Clin Cancer Res. 2014;20(20):5322–30.

103. Koi M, Garcia M, Choi C, Kim HR, Koike J, Hemmi H, et al. Microsatellite Alterations with Allelic Loss at 9p24.2 Signify Less-Aggressive Colorectal Cancer Metastasis. Gastroenterology [Internet]. 2016;150(4):944–55. Available from: http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.032

104. Alvarado-Bachmann R, Smith A, Gundara JS, Kuo SCL, Gill AJ, Samra JS, et al. The incidence of mismatch repair gene defects in colorectal liver metastases. Mol Med Rep. 2014;10(2):1003–6.

105. Halama N, Spille A, Lerchl T, Brand K, Herpe E, Welte E, et al. Hepatic metastases of colorectal cancer are rather homogeneous but differ from primary lesions in terms of immune cell infiltration. Oncoimmunology [Internet]. 2013;2(4):1–10. Available from:

http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L368861594%5Cnhttp://www.landesbioscience.com/journals/oncoimmunology/article/24116/2012ONCOIMM0236R.pdf?nocache=1844551288%5Cnhttp://dx.doi.org/10.4161/onci.24116%5Cnhttp://sfx.libr

106. Katz SC, Pillarisetty V, Bamboat ZM, Shia J, Hedvat C, Gonen M, et al. T cell infiltrate predicts long-term survival following resection of colorectal cancer liver metastases. Ann Surg Oncol. 2009;16(9):2524–30.

107. Crispe IN. Immune tolerance in liver disease. Hepatology. 2014;60(6):2109–17.

108. Kassel R, Cruise MW, Iezzoni JC, Taylor NA, Pruett TL, Hahn YS. Chronically inflamed livers up-regulate expression of inhibitory B7 family members. Hepatology. 2009;50(5):1625–37.

109. Pedroza-Gonzalez A, Verhoef C, Ijzermans JNM, Peppelenbosch MP, Kwekkeboom J, Verheij J, et al. Activated tumor-infiltrating CD4+ regulatory T cells restrain antitumor immunity in patients with primary or metastatic liver cancer. Hepatology. 2013;57(1):183–94.

110. Pedroza-Gonzalez A, Zhou G, Singh SP, Boor PPC, Pan Q, Grunhagen D, et al. GITR engagement in combination with CTLA-4 blockade completely abrogates immunosuppression mediated by human liver tumor-derived regulatory T cells ex vivo. Oncoimmunology. 2015;4(12).

111. Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen. 2003;531(1–2):231–51.

112. Tudek B, Speina E. Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis. Mutat Res. 2012;736(1–2):82–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561673%5Cnhttp://ac.els-cdn.com/S002751071200098X/1-s2.0-S002751071200098X-main.pdf?_tid=8b80b298-5310-11e4-8d04-00000aab0f6b&acdnat=1413229305_e10614d3c84ee0c03d8546dcb2a2845b

113. Simonelli V, Mazzei F, D'Errico M, Dogliotti E. Reprint of: Gene susceptibility to

oxidative damage: From single nucleotide polymorphisms to function. Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen. 2012;736(1–2):104–16. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2012.06.003

114. Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer [Internet]. 2008;8(3):193–204. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc2342%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/nrc2342

115. Woodhouse BC, Dianova II, Parsons JL, Dianov GL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. DNA Repair (Amst). 2008;7(6):932–40.

116. Beard WA, Horton JK, Prasad R, Wilson SH. Eukaryotic Base Excision Repair: New Approaches Shine Light on Mechanism. Annu Rev Biochem. 2019;88(1):137–62.

117. Nielsen M, de Miranda NFCC, van Puijenbroek M, Jordanova ES, Middeldorp A, van Wezel T, et al. Colorectal carcinomas in MUTYH-associated polyposis display histopathological similarities to microsatellite unstable carcinomas. BMC Cancer. 2009;9.

118. Lubbe SJ, Di Bernardo MC, Chandler IP, Houlston RS. Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with MUTYH mutation. J Clin Oncol. 2009;27(24):3975–80.

119. Mazzei F, Viel A, Bignami M. Role of MUTYH in human cancer. Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen. 2013;743–744:33–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.03.003

120. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. Oncogene. 2006;25(43):5864–74.

121. Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. Nat Rev Cancer Cancer [Internet].

2012;12(2):104–20. Available from: /pmc/articles/PMC3586545/?report=abstract

122. Kothandapani A, Dangeti VSMN, Brown AR, Banze LA, Wang XH, Sobol RW, et al. Novel role of base excision repair in mediating cisplatin cytotoxicity. J Biol Chem. 2011;286(16):14564–74.

123. Longley D, Harkin D, Johnston P. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. Nat Rev Cancer. 2003;3(5):330–8.

124. Weeks LD, Fu P, Gerson SL. Uracil-DNA glycosylase expression determines human lung cancer cell sensitivity to pemetrexed. Mol Cancer Ther. 2013;12(10):2248–60.

125. Stratigopoulou M, van Dam TP, Guikema JEJ. Base Excision Repair in the Immune System: Small DNA Lesions With Big Consequences. Front Immunol. 2020;11(May).

126. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. Mutat Res Mutat Res. 2014;763:212–45. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.11.002

127. Wang R, Hao W, Pan L, Boldogh I, Ba X. The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression. Cell Mol Life Sci [Internet]. 2018;75(20):3741–50. Available from: https://doi.org/10.1007/s00018-018-2887-8

128. Nascimento EFR, Ribeiro ML, Magro DO, Carvalho J, Kanno DT, Martinez CAR, et al. Tissue Expresion of the Genes Mutyh and Ogg1 in Patients With Sporadic Colorectal Cancer. Arq Bras Cir Dig. 2017;30(2):98–102.

129. Saxowsky TT, Meadows KL, Klungland A, Doetsch PW. 8-Oxoguanine-mediated transcriptional mutagenesis causes Ras activation in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(48):18877–82.

130. Vodenkova AS, Jiraskova K, Kroupa M, Slyskova J, Levy M, Buchler T, et al. Base excision repair capacity as a determinant of prognosis and therapy response in colon cancer patients. DNA Repair (Amst) [Internet]. 2018;(72):77–

85. Available from: https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.09.006

131. Santos JC, Funck A, Silva-Fernandes IJL, Rabenhorst SHB, Martinez CAR, Ribeiro ML. Effect of APE1 T2197G (Asp148Glu) Polymorphism on APE1, XRCC1, PARP1 and OGG1 Expression in Patients with Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2014;15(10):17333–43.

132. Leguisamo NM, Gloria HC, Kalil AN, Martins TV, Azambuja DB, Meira LB, et al. Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy. Oncotarget. 2017;8(33).

133. Obtułowicz T, Swoboda M, Speina E, Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, et al. Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. Mutagenesis. 2010;25(5):463–71.

134. Saichua P, Yakovleva A, Kamamia C, Jariwala AR, Sithithaworn J, Sripa B, et al. Levels of 8-oxodG predict hepatobiliary pathology in opisthorchis viverrini endemic settings in Thailand. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(7):1–19.

135. Thanan R, Murata M, Pinlaor S, Sithithaworn P, Khuntikeo N, Tangkanakul W, et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2′-deoxyguanosine in patients with parasite infection and effect of antiparasitic drug in relation to cholangiocarcinogenesis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17(3):518–24.

136. Nanashima A, Izumino H, Sumida Y, Tominaga T, Wakata K, Hidaka S, et al. Relationship between urinary 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG) levels and clinicopathological findings in hepatobiliary malignancies. Anticancer Res. 2016;36(8):3899–903.

137. Govaert KM, Emmink BL, Nijkamp MW, Cheung ZJ, Steller EJA, Fatrai S, et al. Hypoxia after liver surgery imposes an aggressive cancer stem cell phenotype on residual tumor cells. Ann Surg. 2014;259(4):750–9.

138. Peiris-Pagès M, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Metastasis and Oxidative Stress: Are Antioxidants a Metabolic Driver of Progression? Cell Metab. 2015;22(6):956–8.

139. Ortega ÁL, Mena S, Estrela JM. Oxidative and nitrosative stress in the

metastatic microenvironment. Cancers (Basel). 2010;2(2):274–304.

140. Burlaka A, Rudiuk T, Burlaka A, Kolesnik O. 8-Hydroxy-deoxyguanosine as an independent prognostic factor in patients with metastatic colorectal cancer. Arch Balk Med Union. 2019;54(3):445–54.

141. Sakata K, Yoshizumi T, Izumi T, Shimokawa M, Itoh S, Ikegami T, et al. The role of DNA repair glycosylase OGG1 in intrahepatic cholangiocarcinoma. Anticancer Res. 2019;39(6):3241–8.

142. Goellner EM, Svilar D, Almeida KH, Sobol RW. Targeting DNA polymerase B for therapeutic intervention. Curr Mol Pharmacol. 2012;5(1):68–87.

143. Narayan S, Jaiswal AS, Balusu R. Tumor suppressor APC blocks DNA polymerase ??-dependent strand displacement synthesis during long patch but not short patch base excision repair and increases sensitivity to methylmethane sulfonate. J Biol Chem. 2005;280(8):6942–9.

144. Abdel-Fatah T, Arora A, Gorguc I, Abbotts R, Beebeejaun S, Storr S, et al. Are DNA repair factors promising biomarkers for personalized therapy in gastric cancer? Antioxidants Redox Signal. 2013;18(18):2392–8.

145. Azambuja DB, Leguisamo NM, Gloria HC, Kalil AN, Rhoden E, Saffi J. Prognostic impact of changes in base excision repair machinery in sporadic colorectal cancer. Pathol Res Pract. 2018;214(1).

146. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Tanaka F, Tahara K, Inoue H, et al. A platinum agent resistance gene, POLB, is a prognostic indicator in colorectal cancer. J Surg Oncol. 2009;100(3):261–6.

147. Tan X, Wang H, Luo G, Ren S, Li W, Cui J, et al. Clinical significance of a point mutation in DNA polymerase beta (POLB) gene in gastric cancer. Int J Biol Sci. 2015;11(2):144–55.

148. Dziaman T, Ludwiczak H, Ciesla JM. PARP-1 Expression is Increased in Colon Adenoma and Carcinoma and Correlates with OGG1. PLoS One. 2014;

149. Jarrar A, Fiorenza L, DeVecchio J, Ferrandon S, Gannt G, Mace A, et al. PARP

inhibition sensitizes colorectal cancer- initiating cells to chemotherapy. Stem Cells. 2018;

150. Alhadheq AM, Purusottapatnam Shaik J, Alamri A, Aljebreen AM, Alharbi O, Almadi MA, et al. The Effect of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Gene 3′Untranslated Region Polymorphism in Colorectal Cancer Risk among Saudi Cohort. Dis Markers. 2016;2016.

151. Huang MY, Tsai HL, Lin CH, Huang CW, Ma CJ, Huang CM, et al. Predictive value of ERCC1, ERCC2, and XRCC1 overexpression for stage III colorectal cancer patients receiving FOLFOX-4 adjuvant chemotherapy. J Surg Oncol. 2013;108(7):457–64.

152. Huang MY, Huang JJ, Huang CM, Lin CH, Tsai HL, Huang CW, et al. Relationship Between Expression of Proteins ERCC1, ERCC2, and XRCC1 and Clinical Outcomes in Patients with Rectal Cancer Treated with FOLFOX-Based Preoperative Chemoradiotherapy. World J Surg. 2017;41(11):2884–97.

153. Yeh Y, Chen Y, Tsai H, Huang C, Ma C, Su W. Predictive Value of ERCC1 , ERCC2 , and XRCC Expression for Patients with Locally Advanced or Metastatic Gastric Cancer Treated with Neoadjuvant mFOLFOX-4 Chemotherapy. 2019;

154. Chen X, Legrand AJ, Cunniffe S, Hume S, Poletto M, Vaz B, et al. Interplay between base excision repair protein XRCC1 and ALDH2 predicts overall survival in lung and liver cancer patients. Cell Oncol. 2018;41(5):527–39.

155. Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. Int Immunopharmacol. 2018;62(June):29–39. Available from: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.001

156. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2015;373(2):123–35.

157. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al.

Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. Lancet. 2017;389(10066):255–65.

158. Wu Y, Deng Z, Wang H, Ma W, Zhou C, Zhang S. Repeated cycles of 5-fluorouracil chemotherapy impaired anti-tumor functions of cytotoxic T cells in a CT26 tumor-bearing mouse model. BMC Immunol. 2016;17(1):1–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s12865-016-0167-7

159. Van Der Kraak L, Goel G, Ramanan K, Kaltenmeier C, Zhang L, Normolle DP, et al. 5-Fluorouracil upregulates cell surface B7-H1 (PD-L1) expression in gastrointestinal cancers. J Immunother Cancer. 2016;4(1):1–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1186/s40425-016-0163-8

160. Grabosch S, Bulatovic M, Zeng F, Ma T, Zhang L, Ross M, et al. Cisplatin-induced immune modulation in ovarian cancer mouse models with distinct inflammation profiles. Oncogene. 2019;38(13):2380–93. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41388-018-0581-9

161. Wangpaichitr M, Kandemir H, Li Y, Wu C, Nguyen D, Feun L, et al. Relationship of Metabolic Alterations and PD-L1 Expression in Cisplatin Resistant Lung Cancer. Cell Dev Biol. 2017;06(02):1–5.

162. Abdul-Latif M, Townsend K, Dearman C, Shiu KK, Khan K. Immunotherapy in gastrointestinal cancer: The current scenario and future perspectives. Cancer Treat Rev. 2020;88(March):102030. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102030

163. Le DT, URAM JNJ, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. N Engl J Med. 2015;372(26):2509–20.

164. Le DT, Hubbard-lucey VM, Morse MA, Heery CR, Dwyer A, Marsilje TH, et al. A Blueprint to Advance Colorectal Cancer Immunotherapies. 2017;5(November):942–50.

165. Permata TBM, Hagiwara Y, Sato H, Yasuhara T, Oike T, Gondhowiardjo S, et

al. Base excision repair regulates PD-L1 expression in cancer cells. Oncogene. 2019;38(23):4452–66. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41388-019-0733-6

166. Osoegawa A, Hiraishi H, Hashimoto T, Takumi Y, Abe M, Takeuchi H, et al. The positive relationship between γH2AX and PD-L1 expression in lung squamous cell carcinoma. In Vivo (Brooklyn). 2018;32(1):171–7.

167. Sato H, Niimi A, Yasuhara T, Permata TBM, Hagiwara Y, Isono M, et al. DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. Nat Commun. 2017;8(1). Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01883-9

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Journal: Journal of Surgical Oncology

Impact factor: 3.244

Manuscript title: Prognostic value of base excision repair pathway in patients with resectable colorectal liver metastases

AUTHORS: Carlos Eugênio Santiago Escovar [1,2], Gabriel e Silva Montenegro[1], Victória Lau[1], Helena de Castro e Gloria, MSc[1], Angélica Maria Lucchese[2], MD, PhD[2], Natalia Motta Leguisamo, PhD[2], Antonio Nocchi Kalil, MD, PhD[1,2]

[1] Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), RS, Brazil.

[2] Hospital Santa Rita, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), RS, Brazil.

[#]**Correspondent author.** Address: Professor Annes Dias St., 295, Centro Histórico, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, Zip code: 90020-090.

Submission guidelines:

https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/10969098/homepage/forauthors.html

ABSTRACT

Background: Colorectal liver metastases (CRCLM) remains the major cause of death of colorectal cancer (CRC) patients. Inappropriate repair of DNA damage promotes genomic instability, increase of mutational burden and upregulation of PD-1/PD-L1 axis. Mismatch repair deficiency (dMMR) is a validated DNA repair-based biomarker for predicting response to immunotherapy for metastatic CRC. Since only 5% of CRCLM patients present dMMR, identification of deficiencies in other DNA repair pathways, such as base excision repair (BER), might facilitate the identification of patients who would possibly benefit from immunotherapy irrespective of dMMR. **Methods:** Fifty patients were prospectively included. CRCLM and adjacent non involved liver specimens from 32 patients who underwent hepatectomy were assessed for gene expression of the key BER genes (*OGG1, POLB, PARP1* and *XRCC1*) by qRT-PCR and PARP1 and PD-1 protein expression by immunohistochemistry. Molecular and clinicopathological data, including inflammatory-based scores (neutrophil/lymphocyte, lymphocyte/monocyte and platelet/lymphocyte ratios - NLR, LMR and PLR, respectively), were investigated for associations and prognostic value. **Results:** Reduction of *OGG1* and *POLB* mRNA levels in neoplastic tissues were associated with synchronous CRCLM and R1-R2 surgical margins, respectively. Overexpression of *PARP1* was associated with smaller liver metastasis and increased LMR ratio, and *XRCC1* overexpression was associated with lower CEA levels at CRC diagnosis and increased PLR. Moreover, we demonstrated that CRCLM tissues exhibiting lower immunoreactivity of PARP1 were associated with presence of perineural invasion in colorectal tumors and increased NLR. In counterpart, high PARP1 expression was associated with positive PD-1 expression in CRCLM. Survival analyses did not confirm the independent prognostic role of BER components. **Conclusions:** BER pathway is imbalanced in CRCLM. PARP1 upregulation was associated with positive PD-1 and clinical features of poor prognosis in CRCLM, which may suggest a novel role for PARP1 in CRCLM aggressiveness by immune system activation and modulation of tumor development.

Keywords: colorectal cancer liver metastasis; base excision repair; PD-1; prognosis.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide, and the second highest cancer-related mortality cause [1]. Upon initial diagnosis, 25% already have liver metastases, while 50% develop them during the course of the disease [2]. Although hepatic resection remains the optimal potentially curative and offers the best chance of long-term survival, only 25% of patients with CRLM are eligible for liver resection [3,4].

The biological mechanisms that control or modify the complex transition from primary cancer to metastatic disease remain incompletely understood [5]. Despite significant advances in our understanding of CRC tumorigenesis and clinical prognostic factors, TNM staging remains the preferred clinical tool for risk assessment. However, this system is considered suboptimal and contradictory as it fails to stratify patients adequately [6,7]. Additionally, identification of specific risk groups for recurrence after surgery for isolated CRCLM remains challenging due to the heterogeneity of the disease [8]. Historically, clinicopathologic parameters such as nodal status, preoperative CEA level, size of the largest liver lesion, presence of extrahepatic disease, disease-free interval, and the number of hepatic metastases are considered independent predictors of both poor outcomes and intrahepatic recurrence of disease in patients with resected CRCLM [9]. However, even the compilation of these factors in clinical risk scores provide an incomplete depiction of the disease.

As many of these variables have exhibited inconsistent associations with oncologic outcomes, there is a growing body of evidence investigating the prognostic role of CRCLM molecular features. Currently, the only validated and clinically used predictors of responses to anti-EGFR therapy are represented by *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* mutational status. These biomarkers influence the selection of systemic targeted therapies (anti-EGFR), the sequencing of treatments, or the strategic resection/ablation margin of CRCLM [10]. Although a concordance in mutational status of *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF* between primary CRC and liver metastases of almost 95% [11], intra- and inter-tumoral heterogeneity may limit the predictive value

of these biomarkers, as resistance or lower efficacy of anti-EGFR therapies have been reported in these patients [12]. In addition, according to recent findings, response to anti-EGFR therapies of right-sided *RAS* and *RAF* is suboptimal [13].

Inappropriate repair of DNA damage can also result in genomic instability, which has shown to be a key factor in carcinogenesis of different tumors, including CRC [14]. Defect in DNA damage response (DDR) is a well-documented feature of cancer cells, and deficiency in mismatch repair (MMR) pathway is a validated DDR defect biomarker for predicting response to immune checkpoint blockade (ICB) therapy in the setting of metastatic CRC [15,16]. However, MMR deficiency (dMMR) occurs in less than 5% of CRCLM patients undergoing hepatectomy [17] and there is still a lack of evidence regarding the employment of preoperative ICB therapy before CRCLM resection in those patients with MMR deficiency [10].

Programmed death -1 (PD-1, also known as CD279) is a coinhibitory receptor of lymphocytes and other immune system cells, which controls lymphocyte activation by providing negative signals in conjunction with signals from lymphocyte antigen receptors [18]. PD-1 has two ligands, PD-L1 and PD-L1, and the PD-1/PD-L1 axis plays the central role in controlling immune suppression by down-regulating T effector cell activities enabling tumor cells to escape from the host's anti-tumor immunosurveillance [19]. PD-1 checkpoint inhibitor nivolumab provides durable disease control only in treatment refractory MSI-high/dMMR metastatic colorectal cancer, however since MSI is the only biomarker for prediction of immune response in CRC [20]. Thus, development of novel immune-related biomarkers might facilitate the identification of patients who would possibly benefit from ICB therapy irrespective of MSI status.

MMR deficiencies paved out the pathway for investigating the role of other DDR defects in CRC and in response to ICB therapies. Indeed, the interplay between defective DNA repair and the anti-cancer immune response has been hypothesized as an important target associated with neoantigen production and sensitization of non-responsive tumors towards immunotherapy [21,22]. In this regard, recent studies have proposed that upregulation of programmed death-ligand 1 (PD-L1) might be induced in response to critical forms of genotoxic stress, such as stress oxidative-induced DNA

single and double-strand breaks (SSBs and DSBs, respectively), ultimately leading to a higher DNA mutational load [23,24].

While DSBs are mostly induced by ionizing radiation and platinum agents, SSBs results from base oxidative lesions due to persistent oxidative stress and chronic inflammation. Constant exposure to high levels of reactive oxygen species (ROS) in cancer cells promotes cancer growth, metastasis and genomic instability [25,26]. Also, as the levels of oxidative DNA damage have been reported to be higher in CRC liver metastases compared with their corresponding primary tumors, and to increase after chemo- and/or radiotherapy [27], it might have implications on response to therapy.

These oxidative DNA lesions are normally repaired by the base excision repair (BER) pathway, which is specialized in the repair of non-bulky base lesions. BER employs a specific DNA glycosylase for lesion recognition and elimination of the damaged base. The first step of BER uses a specific DNA glycosylase to recognize the damaged base in the DNA helix and cleave the N-glycosidic bond, creating an abasic site (apurinic/apyrimidinic site or AP site). This abasic site is processed by AP endonuclease 1 (APE1) to allow the DNA polymerase β (Pol β) to fill the gap utilizing the intact DNA strand as template for synthesis [28]. In this field, we have previously reported that BER is imbalanced in sporadic CRC, with an impairment in the initiation of this pathway, in particular by the downregulation of DNA glycosylases OGG1 and MPG, as well a reduction in signaling of SSBs repair by PARP1 [29–31]. Noteworthy, a recent TCGA analysis has revealed that tumors harboring BER-mutated genes contain high frequency of microsatellite instability (MSI) and high levels of neoantigen expression [24], which strengthens the rationale for the investigation of BER profile in tumors under oxidative stress microenvironment, such as colorectal cancer liver metastasis.

PATIENTS AND METHODS

Patients and tissue collection

Fifty patients who had undergone curative hepatectomy for colorectal cancer liver metastases in Hospital Santa Rita, Hospital Moinhos de Vento and Hospital Regina (Rio Grande do Sul, Brazil) were prospectively included between May 2018 and April 2020, with the last follow-up in June 2020. Clinical and pathological data were collected retrospectively (regarding CRC) and prospectively (regarding liver metastases). Of those, 32 patients were assessed for gene expression in fresh neoplastic and matched healthy liver specimens collected during surgical procedure and for protein expression in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples. The fresh specimens were obtained from a single lesion to avoid the inter-lesion biological variability, and immediately embedded in RNAlater™ stabilization solution (Invitrogen) for 24 hours and then frozen for subsequent analysis.

All patients were informed and signed a written consensus for clinicopathological data and samples collection. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations (Approval number: CAAE 72393917.8.0000.5335).

Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

We evaluated the differential gene expression in the liver metastasis and healthy paired tissues in duplicate by RT2 Profiler™ PCR Array (SABiosciences/Qiagen). The selected genes composing the arrays were: *OGG1*, *POLB*, *PARP1 and XRCC1* from the BER pathway. Regions of high tumor cellularity (minimum of 80%) were selected for RNA extraction. RNA was extracted and purified from 30 mg of both fresh tumors and adjacent normal tissues samples using RNeasy mini kit (SABiosciences/Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA

was synthesized from 1 µg of total RNA using the RT2 PCR Array First Strand Kit (SABiosciences/Qiagen) according to supplier's recommendations. Reaction was prepared using RT2 SYBR-Green/Rox PCR Master Mix (SABiosciences/Qiagen). Data analyses were based on the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [32] with normalization of the raw data of each gene of interest in relation to the geometric mean of CT values of two housekeeping genes (*PPIA* and *GAPDH*).

Immunohistochemistry

Protein expression of PARP1 and PD-1 were obtained from formalin-fixed paraffin-embedded samples by immunohistochemistry. Tissues were sectioned at 4-µm and mounted on silanized slides, which were stored at 4ºC. After deparaffinization and rehydration, the sections were quenched with 3% H_2O_2 in methanol to block endogenous peroxidase. Bovine serum albumin at 5% (BSA) was then applied to prevent non-specific binding. The sections were incubated with anti-PARP1 (dilution 1:100, Abcam, rabbit, [E102] ab32138) and anti-PD-1 (dilution 1:100, Abcam, rabbit, EPR4877(2), ab205921) and then incubated with appropriate secondary antibodies (DAKO). Diaminobenzidine (DAB) was used as a chromogen and the sections were counterstained with hematoxylin. Omission of the primary antibody was used as a negative control.

After immunostaining, two observers scored all samples independently. The few cases with discrepant scoring were re-evaluated jointly on a second occasion, and agreement was reached in all cases. Five hot spot fields containing at least 200 cells were captured and the positive cells were counted using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). PARP1 and PD-1 protein expression levels were estimated through a scoring system, which took into account the intensity of the color reaction and the percentage of positive cells within the five microscope fields at the magnification of 100x. According to the number of positive staining nuclei, the staining density was expressed semi-quantitatively as follows: 0, less than 5%; 1, 5 to 25%; 2, 25 to 50%; 3, 50% to 75%; or 4, more than 75%. We also evaluated the staining intensity as follows: 0-negative staining; 1-weak staining; 2-moderate staining and 3-

strong staining. Both values were multiplied together, and the staining score was stratified as weak (score range, 0–4) or strong (score range, 5–12) according to the proportion and intensity of positively stained cancer cells [33]

Inflammation-Related Peripheral Blood Measurements

Absolute count of circulating neutrophils, lymphocytes and platelets are associated with inflammatory responses, which are key factors in recognition of pathways for tumorigenesis and growth [34]. Thus, we calculated neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) from absolute counts of pretreatment peripheral blood tests. Subgroups were divided using the median expression value (expression ≤ median = low; expression > median = high).

Statistical Analyses

All analyses were performed using IBM SPSS statistics version 26 (IBM Corp., Armonk, NY) and Excel version 2017 (Microsoft Corp., Redmond, WA). GraphPad Prism version 8.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA) and Heatmapper [35] were used for graphical presentation of the data. Gene expression and inflammatory blood index subgroups were categorized using the median expression value (expression ≤ median = low; expression > median = high). Proportions were compared with Chi-squared test followed by Fisher's Exact test, and continuous variables with Student's T test. Correlation between continuous variables was assessed with Spearman Rank Order. Overall survival OS was calculated from the date of colorectal cancer resection surgery to date of death or last known follow-up. Disease-free survival (DFS) was measured from date of hepatectomy to date of local recurrence or metastasis. OS and DFS rates were estimated using the Kaplan-Meier method. The log-rank test was used to assess for significant differences between

subgroups by univariate analysis. To investigate independent prognostic factors for OS and DFS, factors with a P-value of less than 0.2 in univariate analyses were entered into a multivariate analysis. The Cox proportional hazards regression model was used to identify factors that were independently associated with OS and DFS. Pearson's chi-squared test and Fisher's exact test were used to evaluate distributions of categorical variables. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Availability of data and Materials

Any supplementary supporting data relating the details of the clinical and pathological analysis are available upon request from the corresponding author and can be found in the electronic medical record system of Irmandade of Santa Casa of Misericórdia of Porto Alegre, Hospital Moinhos de Vento and Hospital Regina.

RESULTS

Clinicopathological characteristics of CRCLM patients

The clinicopathological characteristics of the patients are shown in **Table 1**. A total of 50 patients were included in this study and 32 of those were assessed for gene expression of BER representative genes, and PARP1 and PD-1 protein expression. Median age at CRLM diagnosis was 64 years, and 31 (62%) were male. Colon was the location of the primary tumor in 12% of the patients, 52% it was in the left colon and 34% in the rectum. The majority of the included patients presented positive lymphnodes (40%), high grade tumors (58%) and perineural invasion (60%). Regarding systemic chemotherapy for CRC, 46% and 64% underwent neoadjuvant and adjuvant treatment, respectively.

The main prognostic factors of CRCLM are shown in **Table 2.** Metachronous disease occurred in 52% of the patients. Most cases presented CRCLM after 12 months of CRC diagnosis (58%). The majority presented less than 3 liver metastases (82%) and the largest metastasis was smaller than 50mm in 80%. Complete surgical resection margins (R0) were present in 58%, and 68% received systemic neoadjuvant chemotherapy prior to hepatectomy.

Table 1. Clinicopathological features of CRCLM patients.

Included patients, N (%)	**50 (100)**
Age at CRCLM diagnosis, median (min-max)	64 (42-89)
Female : Male	19:31 (38:62)
CRC location (sidedness)	
Colon (Right-sided)	6 (12)
Colon (Left-sided)	26 (52)
Rectum	17 (34)
Unknown	1 (2)
CRC TNM staging	
II	12 (24)
III	8 (16)
IV	23 (46)
Unknown	7 (14)
Nodal metastasis	
Yes	20 (40)
No	16 (32)
Unknown	14 (28)
CRC grade	
Low grade	5 (10)
High grade	29 (58)
Unknown	16 (32)
Lymphovascular invasion	
Yes	16 (32)

No	25 (50)
Unknown	9 (18)
Perineural Invasion	
Yes	30 (60)
No	12 (24)
Unknown	8 (16)

Table 2. Perioperative prognostic factors of CRCLM patients.

Included patients, n (%)	**50 (100)**
Synchronicity	
Synchronic	24 (48)
Metachronic	26 (52)
Time between CRC and liver metastasis	
<12 months	15 (30)
≥ 12 months	29 (58)
Number of liver metastases	
<3	41 (82)
≥ 3	8 (16)
Unknown	1 (2)
Size of the largest metastasis (mm)	
<50	40 (80)
≥ 50	8 (16)
Unknown	1 (2)
CRCLM grade	
Low grade	31 (62)
High grade	7 (14)
Unknown	12 (24)
Margins*	
R0	45 (58)
R1	18 (23)
R2	9 (12)

Unknown	5 (6)
Neoadjuvant chemotherapy	
Yes	34 (68)
No	8 (16)
Unknown	8 (16)
NLR, median (min-max)	2.60 (0.43 - 28.76)
LMR, median (min-max)	2.93 (0.68 - 6.28)
PLR, median (min-max)	123.76 (38.58 - 505.68)

*R0: complete surgical resection with negative histological margins; R1: microscopic margins compromised according to the pathologist report; R2: macroscopic tumor remaining intraoperatively.

Changes in BER gene expression in colorectal liver metastases and paired healthy liver specimens

The mRNA levels for *OGG1, POLB, PARP1* and *XRCC1* were obtained by RT-PCR of 32 pairs of CRCLM and adjacent healthy liver tissues (**Figure 1**). Higher levels of *POLB* (p=0.0179) and PARP1 (p=0.0018) mRNA were found in neoplastic tissues in comparison to normal tissues, while no difference was found for *OGG1* and *XRCC1.* However, only PARP1 presented significant fold-change induction (2.59, p=0.0337) (**Figure 1E**). Additionally, we investigated the gene expression patterns in both neoplastic and normal tissues by constructing a dendrogram and a heatmap of hierarchical clustering of mRNA levels of *OGG1, POLB, PARP1* and *XRCC1* (**Figure 2**). Next, we used Spearman's correlation to identify clusters and to assign P values to pairs of genes with similar temporal expression patterns and which presented significant changes in mRNA levels in tumor tissues **(Figure 2B).** We considered a Spearman's rho coefficient > 0.5 a strong correlation between expression of two genes in the same sample. Of all investigated BER genes, only *XRCC1* was positively correlated to the expression of *POLB* (Spearman's rho = .524, p=0.003) and PARP1 (Spearman's rho = .576, p=0.006).

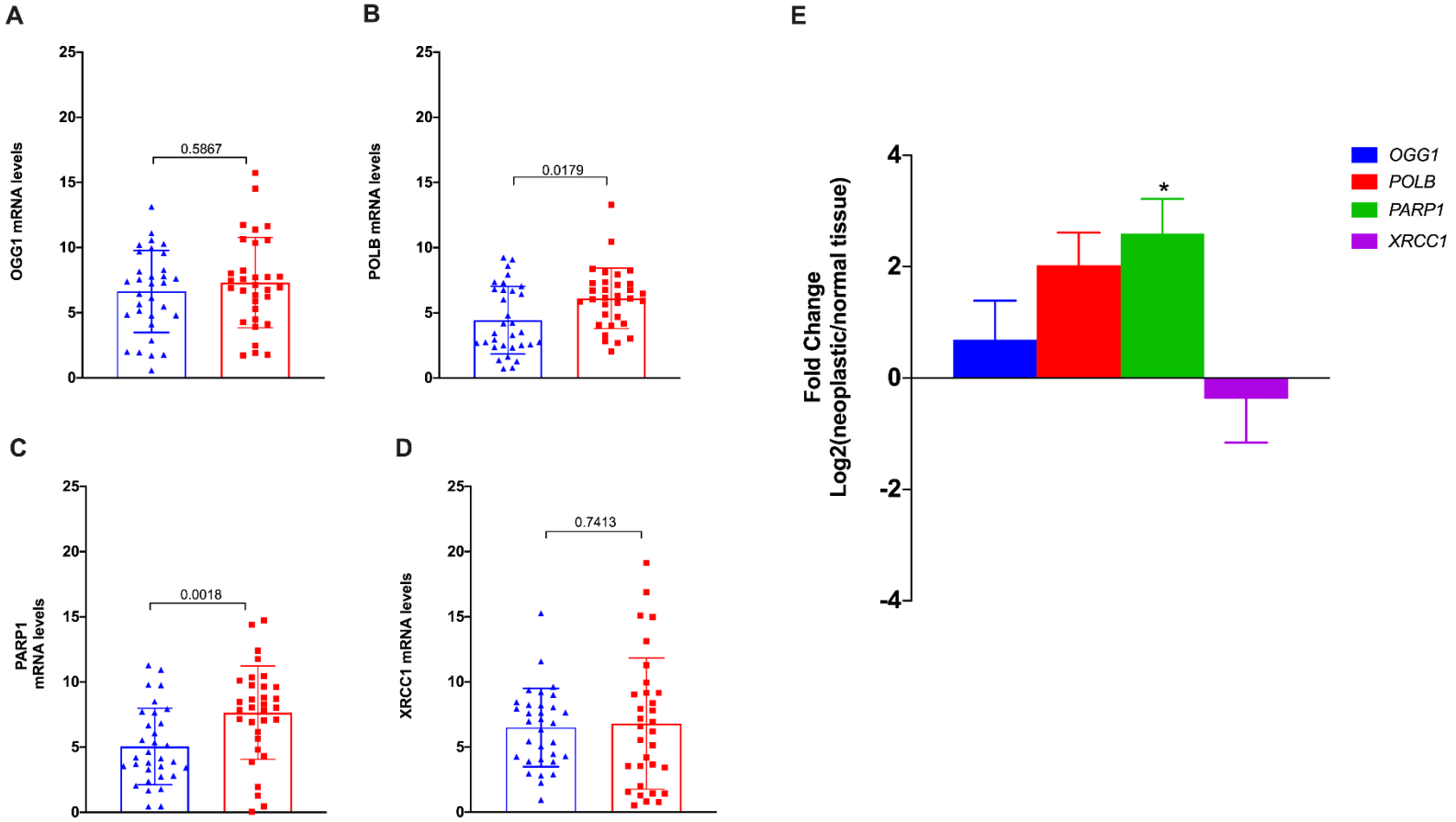

Figure 1. Changes in gene expression of representative BER components in colorectal liver metastasis and matched healthy tissues. A, B, C a induction between neoplastic and normal tissues. Gene expression means between normal and neoplastic tissue were compared using Students' used for differences in fold-change. *p<0.05.

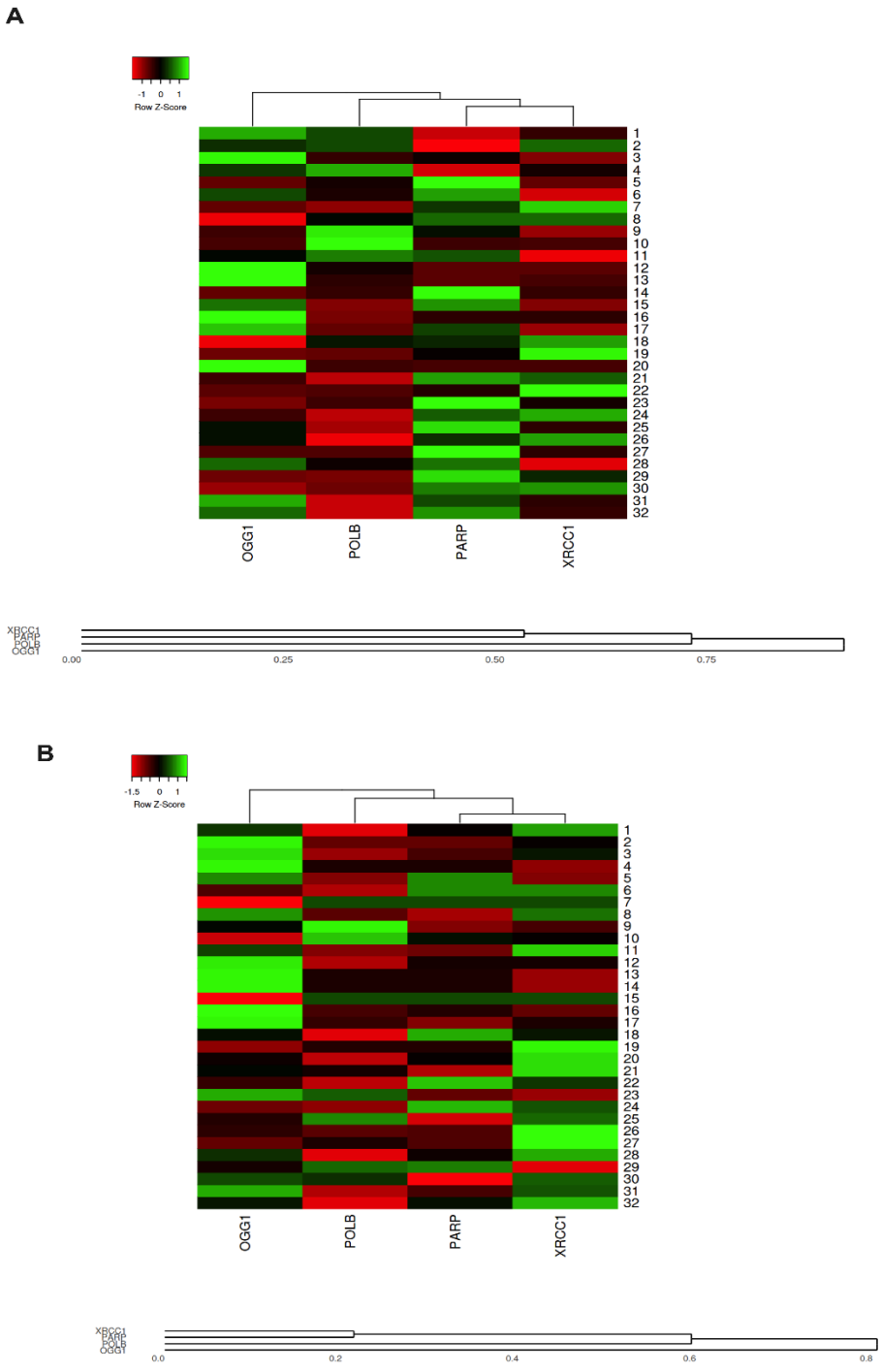

Figure 2. Heatmap and dendrogram of the mRNA levels neoplastic tissues.. Green represents low expression, red represents high expression, and black refers to absence of difference between neoplastic and normal tissue. Table presents Spearman matrix correlation of BER key components gene expression in colorectal cancer liver metastases. Bivariate Spearman's correlation between mRNA levels of BER genes in CRCLM. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed); **Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). Strong correlations (Spearman's rho coefficient > 0.5) between two genes are highlighted in bold.

Associations between changes in BER gene expression in colorectal liver metastases and clinicopathological features

Next, we investigated the possible associations between clinicopathological features of CRCLM patients and fold change or tumor mRNA levels of *OGG1, POLB, PARP1* and *XRCC1* **(Table 4).** *OGG1* low expression in CRCLM was correlated with synchronous tumors (p=0.031). The low expression of *POLB* was associated surgical resection with negative margins (R0) (p=0.047). The overexpression of PARP1 was also associated with negative margins (p=0.044), smaller liver metastasis, <50mm, (p=0.049) and increased LMR ratio (p=0.044). The overexpression of XRCC1 in CRCLM was associated with low CEA levels (< 5 ng/mL) at the diagnosis of CRC (p=0.046) and augmented PLR (>123) (p=0.032).

Table 3. Associations between fold-change of BER genes of and clinical features of CRCLM patients.

		OGG1	***POLB***	***PARP1***	***XRCC1***
Age at diagnosis	χ2	1.129	0.125	0.125	**6.149**
	P	0.479	1.000	1.000	**0.032**
CRC location	χ2	0.115	0.115	0.115	1.391
	P	1.000	1.000	1.000	0.433
CEA (at CRC diagnosis)	χ2	0.041	0.041	**4.889**	**4.074**
	P	1.000	1.000	**0.049**	**0.046**
CRC tumor Staging	χ2	0.011	0.678	1.060	0.011
	P	1.000	0.648	0.385	1.000
CRC tumor grade	χ2	0.003	1.098	0.491	3.163
	P	1.000	0.538	0.590	0.217
CRC neoadjuvant treatment	χ2	0.258	1.552	0.258	0.258
	P	0.705	0.433	0.705	0.705
CRC adjuvant treatment	χ2	1.167	0.077	0.077	1.167
	P	0.427	1.000	1.000	0.427
Metastatic lymph node	χ2	0.014	1.675	0.354	0.077

	P	1.000	0.383	0.680	1.000
Lymphovascular invasion	χ2	0.127	0.199	0.422	2.095
	P	1.000	0.706	0.695	0.236
Perineural invasion	χ2	1.688	0.258	0.080	2.489
	P	0.254	0.705	1.000	0.236
Number of metastatic lesions	χ2	0.237	2.133	2.133	0.237
	P	1.000	0.333	0.333	1.000
Size of largest liver metastasis	χ2	2.333	2.333	**5.233**	2.037
	P	0.311	0.311	**0.049**	0.361
Synchronicity	χ2	**4.571**	0.508	0.508	0.000
	P	**0.037**	0.702	0.702	1.000
CRCLM tumor grade	χ2	0.006	0.121	0.202	0.974
	P	1.000	1.000	1.000	0.393
Margins	χ2	0.000	**3.453**	**3.274**	1.158
	P	1.000	**0.047**	**0.044**	0.474
CRCLM neoadjuvant treatment	χ2	0.189	0.257	0.516	0.046
	P	1.000	1.000	0.672	1.000

NLR	χ2	0.508	2.032	2.002	0.000
	P	0.722	0.285	0.255	1.000
LMR	χ2	1.166	1.166	**3.239**	1.166
	P	0.473	0.473	**0.044**	0.473
PLR	χ2	0.027	0.027	0.027	**5.427**
	P	1.000	1.000	1.000	**0.032**

Chi-square (χ2) and Fisher's exact tests. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). CRCLM: colorectal cancer liver metastasis; LMR: Lymphocyte-to-monocyte-ratio; NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio.

Associations between PD-1 and PARP1 protein expression in colorectal liver metastases and clinicopathological features

Next, we evaluated the protein expression of PARP1 and PD-1 by immunohistochemistry and analyzed the correlation with clinical features **(Table 5).** Low PARP1 protein expression was associated with CRC adjuvant treatment (p=0.007), presence of perineural invasion in colorectal tumors (p=0.042) and increased NLR ratio (p=0.009). Positive PD-1 protein expression was also associated with decreased LMR ratio (p=0.047), CRCLM neoadjuvant treatment (p=0.043) and high PARP1 expression in CRCLM (p= 0.038).

Survival analyses

Finally, we used Kaplan-Meier analysis to investigate the association of BER components mRNA levels and PARP1 and PD-1 protein expression levels with overall survival (OS) and disease-free survival (DSF) in subgroups of CRCLM patients, which were categorized according to clinicopathological parameters. Following univariate analysis for OS, CRC location/sidedness (p = 0.223), CRC and CRCLM tumor grade (p = 0.219 and p= 0.103,respectively) were included in multivariate analysis. However, none of these variables had independent prognostic role confirmed **(Table 6).** With regard to DFS **(Table 7),** following univariate analysis, age (p=0.179), CEA levels at CRC diagnosis (p= 0.092), CRC neoadjuvant treatment (p= 0.036), lymphovascular invasion (p= 0.166), size of the largest CRCLM (p= 0.092), *POLB* mRNA levels (p= 0.229), *XRCC1* mRNA levels (p= 0.144) and PARP1 protein levels by IHC (p= 0.218) were included in multivariate analysis.

However, we could not proceed with the Cox regression due to (1) small sample size, (2) lack of CRC clinical information, and (3) consequent constant or linearly dependent covariates behavior. Therefore, after we identified the constant or linearly dependent covariates by calculating the Spearman's rank correlation coefficient, we excluded the pairs of variables presenting a $\rho > 0.9$. Next, we evaluated the possible

models including clinical and molecular characteristics without collinearity, but we did not confirm independent prognostic roles for any variable.

Table 4. Associations between PARP1 and PD-1 protein expression in CRCLM and clinicopathological features.

		PARP1			PD-1		
		Low	**High**	**P**	**Negative**	**Positive**	**P**
Age at diagnosis (years)	= or <65	15	16	0.376	21	10	0.747
	>65	6	13		14	5	
CRC location	Colon	12	20	0.555	23	9	0.777
	Rectum	8	9		11	6	
CEA at CRC diagnosis (ng/mL)	= or <5	2	11	1.000	4	2	1.000
	>5	4	16		17	7	
CRC tumor Staging	II	5	7	1.000	9	3	1.000
	III-IV	14	17		22	9	
CRC tumor grade	Low	1	14	0.355	4	1	1.000
	High	4	15		21	8	
CRC neoadjuvant treatment	No	12	16	1.000	20	8	0.742
	Yes	6	9		10	5	

CRC adjuvant treatment	No	1	10	**0.007**	8	3	1.000
	Yes	18	14		26	9	
Metastatic lymph node	No	6	14	0.175	13	7	0.456
	Yes	9	7		13	6	
Lymphovascular invasion	No	9	16	0.518	8	7	1.000
	Yes	8	8		11	5	
Perineural invasion	No	2	10	**0.042**	9	3	1.000
	Yes	16	14		21	9	
Number of metastatic lesions	a = or <3	17	24	0.710	29	12	1.000
	>3	4	4		6	2	
Size of largest liver metastasis	<50mm	17	23	0.823	30	10	0.521
	= or >50	3	5		4	4	
Synchronicity	Metachronous	12	14	0.578	20	6	0.358
	Synchronous	9	15		15	9	
CRCLM tumor grade	Low	12	9	0.207	21	10	0.648

	High	5	2		6	1	
Margins	R0	11	16	1.000	18	9	0.514
	R1-R2	8	10		14	4	
CRCLM neoadjuvant treatment	No	3	5	1.000	8	0	**0.043**
	Yes	13	21		21	13	
NLR	= or < 2.59	6	20	**0.009**	15	11	**0.047**
	> 2.59	15	9		20	4	
LMR	= or < 2.96	12	14	0.578	19	7	0.760
	> 2.96	9	15		16	8	
PLR	= or < 123	11	11	0.260	16	6	0.750
	> 123	9	18		18	9	
PARP1	Low			1.000	18	3	**0.038**
	High				17	12	

Chi-square and Fisher's exact tests. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed) (highlighted in bold). CRCLM: colorectal cancer liver metastasis; LMR: Lymphocyte-to-monocyte-ratio; NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio.

Table 5. Univariate and multivariate analyses of overall survival of CRCLM patients.

Univariate Analysis		**Multivariate Analysis**		
Variable	**P**	**Variable**	**HR (95% CI)**	**p**
Gender	0.833			
Age	0.787			
CRC location	0.309			
CRC sidedness	0.223	**Right-sided**	1.000	
		Left-sided	2.735 (0.17 - 43.79)	0.477
		Rectum	2.541 (0.250 - 25.83)	0.431
CRC CEA	0.427			
CRC TNM	0.309			
CRC tumor grade	0.219	**High grade**	2.831 (0.138 - 58.16)	0.500
CRC neoadjuvant treatment	0.310			
CRC adjuvant treatment	0.882			
CRC nodal metastasis	0.942			

CRC lymphovascular invasion	0.279			
CRC perineural invasion	0.882			
Number of CRCLM	0.869			
Size of CRCLM	0.952			
Synchronicity	0.393			
Time to CRCLM	0.673			
CRCLM grade	0.103	**High grade**	4.257 (0.672 - 26.97)	0.124
Margins	0.649			
CRCLM neoadjuvant treatment	0.861			
NLR	0.535			
LMR	0.671			
PLR	0.742			
PARP1 mRNA	0.334			
XRCC1 mRNA	0.923			

PD1(IHC)	0.846			

Table 6. Univariate and multivariate analyses of disease free survival of CRCLM patients.

Univariate Analysis			**Multivariate Analysis**							
			Model 1: variables with p<0.25	**Model 2: CRC CEA + POLB**		**Model 3: Age + CRC neoadjuvant treatment + XRCC1**		**Model 4: Age + CRC neoadjuvant treatment + PARP1 (IHC**	
		p	**p**	**HR (95% CI)**	**p**	**HR (95% CI)**	**p**	**HR (95% CI)**	**p**
Gender		0.435							
Age (years)	**> 65**	**0.179**	0.597			5.609 (0.326 - 96.446)	0.235	1.240 (0.308 - 4.997)	0.792
CRC location		0.677							
CRC sidedness		0.658							
CRC CEA (ng/uL)	**> 5**	**0.092**	0.863	3.051 (0.139 - 67.153)	0.479	A			
CRC TNM		0.234							
CRC tumor grade		0.959							
CRC neoadjuvant treatment	**Yes**	**0.036**	0.733			1.643 (0.88 - 30.679)	0.198	0.60 (0.03 - 1.360)	0.077
CRC adjuvant treatment		0.535							
CRC nodal metastasis		0.612							
CRC lymphovascular invasion	**Yes**	0.166				A		4.593 (0.267 - 79.111)	0.294
CRC perineural invasion		0.535							
Number of CRCLM		0.691							
Size of CRCLM	**>50mm**	0.092	A			A		a	
Synchronicity		0.605							
CRCLM grade		1.000							

Margins		0.964							
CRCLM neoadjuvant treatment		0.958							
NLR		0.907							
LMR		0.438							
PLR		0.305							
OGG1		0.388							
POLB	**High**	**0.229**	A	1.311 (0.60 - 28.249)	0.874	A		a	
PARP1		0.553							
XRCC1	**High**	**0.144**	A			0.620 (0.39 - 9.829)	0.734	a	
PARP1 (IHC)	**High**	**0.218**	0.453			A		2.865 (0.343 - 23.944)	0.103
PD1 (IHC)	**Positive**	0.270							
a Degree of freedom reduced because of constant or linearly dependent covariates									

DISCUSSION

In the present study we demonstrated that BER is imbalanced in CRCLM due to *POLB* and *PARP1* upregulation in neoplastic tissues. Also, we provided novel information on BER modulation and its association with clinicopathological features. Reduction of *OGG1* and *POLB* mRNA levels in neoplastic tissues was associated with synchronous CRCLM and compromised margins remaining after surgical procedure, respectively. Additionally, overexpression of *PARP1* was associated with smaller liver metastasis (< 50mm), negative histological margins after surgical resection (R0) and increased lymphocyte-to-monocyte ratio (< 2.96), and *XRCC1* overexpression in liver metastasis was associated with lower CEA levels (< 5 ng/mL) at CRC diagnosis and increased platelet-to-lymphocyte ratio (> 123). Moreover, we demonstrated that CRCLM tissues exhibiting lower immunoreactivity of PARP1 were associated with CRC adjuvant treatment, presence of perineural invasion in colorectal tumors and increased neutrophil-to-lymphocyte ratio.

It has been postulated that oxidative stress is responsible for steadily increasing oxidative damage burden from early adenoma to CRC progression [36]. Indeed, several physiological and pathological processes, closely associated with increase of CRC risk (i.e., obesity, diabetes, inflammatory bowel diseases), are also well-documented promoters of reactive oxygen species (ROS) and inflammatory factors generation, which are major players in DNA damage induction [37]. In a distinct mechanism, ischemia-reperfusion effect in liver is usually recorded in case of large as well as advanced is liver resections. Since this technical maneuver reduces liver oxygenation, additional hepatocytes hypoxic-induced damage and death might occur [38]. Ischemia-reperfusion is considered a surgical trauma, which increases in ROS, inflammatory cytokines production and activity of metastatic metalloproteinases [39,40]. Consequently, it may have a role in the stimulation of micrometastases progression in the setting of metastatic CRC, favoring local and distant recurrence after surgical resection [41].

Most ROS-induced base damage is repaired by BER initiated by DNA glycosylases. 8-Oxoguanine (8-oxoG), one of the most common oxidative DNA lesions

can mispair with adenine during DNA replication to generate G:C > T:A transversion mutations [42]. In our cohort, reduction of *OGG1* mRNA levels in neoplastic tissues was associated with synchronous CRCLM. In sporadic CRC, unrepaired 8-oxo-dG adducts induce mutations in proto-oncogenes, such as *KRAS* and tumor suppressor genes; also, both *MUTYH* and *OGG1* were found to be downregulated in neoplastic human colon tissues compared to adjacent tissues [43]. Beyond that, it has been suggested that increased BER capacity in adjacent mucosa and decreased in colorectal tumor cells is associated with longer overall survival and with features of prognosis of CRC patients [44]. Recently, it was reported that CRC liver metastases are characterized by high levels of oxidative DNA damage, particularly in treatment-naïve CRC metastases compared to primary tumors. Moreover, the authors have identified increased expression of the DNA damage markers γH2AX and 8-oxo-dG in CRC liver metastases of patients who underwent chemo and radiotherapy neoadjuvant treatment [27]. Taken together, these results may indicate a role for oxidative DNA damage and OGG1-initiated BER in prognosis and resistance to therapy-induced oxidative damage in both CRC and liver metastasis.

To the best of our knowledge, this is the first time the gene and protein expression levels of PARP1 are investigated in CRCLM. Following SSB/DSB generated by genotoxic stress such as chemotherapy, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP1) catalyzes transfer of ADP-ribose polymers to downstream substrates that involve several DNA repair enzymes, enabling DNA repair and maintenance of genomic integrity [45]. The clinical relevance of PARP1 relies on the highly sensitive tumors with homologous recombination deficiencies, in particular due to germinative or somatic loss of BRCA1/2, to PARP inhibitors (PARPi). In these tumors, PARP inhibition induces cell death by a synthetic lethal mechanism [46]. However, clinical relevance of PARP gene and/or protein expression in tumor tissues has not been reached.

PARP1 expression has been previously reported to be associated with the poor prognosis of several tumor types, including early breast cancer, non-small cell lung cancer, gastric cancer and colorectal cancer [29,47–52]. In gastric cancer, PARP1 expression levels were demonstrated to be significantly higher in comparison to healthy tissues, and it was associated with lower histological differentiation, tumor

invasion and metastasis, advanced T stage and poor prognosis [51,52]. On the other hand, high nuclear PARP1 expression levels were also associated with improved OS in locally advanced breast cancer [53], while low nuclear expression levels of PARP were associated with a poor prognosis in pancreatic cancer [54]. Considering that our results demonstrated that reduction of *PARP1* mRNA and PARP1 protein levels were associated with clinical features of tumor aggressiveness, ours and these previous studies indicated that PARP1 expression had differing roles in between different tumor types, stages of the tumors and metastasis.

In the recent years, defects in other major DDR pathways have shown to promote PD-L1 expression, elevate tumor infiltrating lymphocytes, and increase neoantigen load, which are potential determinants of the response to immunotherapy [21]. For example, patients with co-mutations in multiple DDR pathways exhibit favorable clinical response to ICB [55]. Therefore, the combination of immunotherapy with DNA damaging therapeutics may enhance therapy response in this subset of patients.

In our cohort, positive PD-1 was associated with decreased neutrophil-to-lymphocyte ratio. Although only a small part of CRC cells express PD-L1, stromal PD-L1 expression in CRC has been associated with stromal PD-1 staining, CD8 expression and less aggressive tumor behavior, resulting in better disease-free survival [56]. Furthermore, many previous studies have investigated the prognostic value of pre-treatment NLR and robust associations have demonstrated that high NLR is a predictor of poor patient outcomes across many cancer types [57].

Interestingly, negative PD-1 expression was associated with high PARP1 expression in CRCLM. Paradoxically a DNA repair enzyme may also function as an inducer of inflammation in order to operate with an adjustable sensor that induces inflammation once ROS exceed a critical threshold, before the process of DNA repair resumes. Hence, since high PARP1 levels in tumors cells were associated with features of good prognosis, including the presence of T cells expressing PD-1, it is possible that tumor cells have accumulated DNA damage due to excess of toxic

intermediates generated by PARP1 activity, ultimately triggering an immune response to limit cancer development [58].

This study was designed to identify a gene and protein expression of BER key components based signature to predict OS and DFS in CRCLM patients who underwent hepatectomy. Unfortunately, we were unable to find a gene signature that could significantly predict the prognosis of these patients. However, to the best of our knowledge, this is the first time gene expression of BER components were assessed in both neoplastic and healthy adjacent liver tissues and the association between clinicopathological features has been explored. Also, this is the first study to investigate the possible association of BER modulation and PD-1 expression in CRCLM. Therefore, although we failed to prove a potential prognostic role for BER components and PD-1 expression, the associations with the well documented prognostic factors for CRCLM patients might reflect the tumor biology, and must be taken into consideration for future studies.

We do believe that the design of our study was of sufficient quality to be able to identify a gene/protein signature for predicting prognosis. However, we recognize the limiting factors that may have contributed to these results. First, the final sample size of patients with molecular data was small. In addition to the reduction of statistical power, presence of collinear variables and small number of events (death and disease recurrence), the sample size had also possibly limited the heterogeneous nature of CRCLM. Since liver metastases are by their nature biased towards a more aggressive subgroup of CRC, an increase in sample size could allow stratification of the patients according to clinical risk scores and reveal subtle changes in gene/protein expression patterns. Second, we prospectively followed the patients only after CRCLM diagnosis and hepatectomy, and clinical data of the colorectal primary tumor was obtained by a retrospective review of medical records. Thus, due to the lack of information, we were not able to retrieve full information of several patients. In sum, although we cannot exclude the existence of a prognostic gene signature based on BER components, the value of gene/protein expression signatures for CRCLM prognostication could not be established based on the results of this study.

In conclusion, the present study was a novel investigation into BER modulation expression patterns in CRCLM. Here, we demonstrated that *PARP1* is overexpressed

in liver metastasis in comparison to adjacent healthy surrounding tissues. Also, we provided new information on the associations between BER modulation and clinicopathological features of patients with resectable CRCLM, particularly regarding the associations between downregulation of *PARP1* and *XRCC1* mRNA and PARP1 protein expression with features of poor prognosis in CRCLM patients. Finally, as overexpression of PARP1 was associated with positive PD-1 and clinical features of poor prognosis in CRCLM, PARP1 may have a novel role in CRCLM aggressiveness mediated by immune system activation and modulation of tumor development.

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019;69:7–34.

2. De Greef K, Rolfo C, Russo A, Chapelle T, Bronte G, Passiglia F, et al. Multisciplinary management of patients with liver metastasis from colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2016;22:7215–25.

3. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, et al. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. J Clin Oncol. 2009;27:3677–83.

4. Dörr NM, Bartels M, Morgul MH. Current treatment of colorectal liver metastasis as a chronic disease. Anticancer Res. 2020;40:1–7.

5. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. Signal Transduct Target Ther [Internet]. Springer US; 2020;5. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x

6. Li J, Yi CH, Hu YT, Li JS, Yuan Y, Zhang SZ, et al. TNM Staging of Colorectal Cancer Should be Reconsidered According to Weighting of the T Stage. Med (United States). 2016;95:1–8.

7. Mo S, Dai W, Xiang W, Huang B, Li Y, Feng Y, et al. Survival contradiction between stage IIA and stage IIIA rectal cancer: A retrospective study. J Cancer. 2018;9:1466–75.

8. Zarour LR, Anand S, Billingsley KG, Bisson WH, Cercek A, Clarke MF, et al. Colorectal Cancer Liver Metastasis: Evolving Paradigms and Future Directions. Cmgh [Internet]. Elsevier Inc; 2017;3:163–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.01.006

9. Vogl TJ, Dommermuth A, Heinle B, Nour-Eldin N-EA, Lehnert T, Eichler K, et al. Colorectal Cancer Liver Metastases. Invest. Radiol. 2014.

10. Yamashita S, Chun YS, Kopetz SE, Vauthey JN. Biomarkers in colorectal liver metastases. Br J Surg. 2018;105:618–27.

11. Lang H, Baumgart J, Heinrich S, Tripke V, Passalaqua M, Maderer A, et al. Extended Molecular Profiling Improves Stratification and Prediction of Survival after Resection of Colorectal Liver Metastases. Ann Surg. 2019;270.

12. Jeantet M, Tougeron D, Tachon G, Cortes U, Archambaut C, Fromont G, et al. High intra-and inter-tumoral heterogeneity of RAS mutations in colorectal cancer. Int J Mol Sci. 2016;17.

13. Sasaki K, Margonis GA, Wilson A, Kim Y, Buettner S, Andreatos N, et al. Prognostic Implication of KRAS Status after Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases Varies According to Primary Colorectal Tumor Location. Ann Surg Oncol. 2016;23:3736–43.

14. Vargas-Rondón N, Villegas VE, Rondón-Lagos M. The role of chromosomal instability in cancer and therapeutic responses. Cancers (Basel). 2018;10:1–21.

15. Le DT, Hubbard-lucey VM, Morse MA, Heery CR, Dwyer A, Marsilje TH, et al. A Blueprint to Advance Colorectal Cancer Immunotherapies. 2017;5:942–50.

16. Lemery S, Keegan P, Padzur R. First FDA Approval Agnostic of Cancer Site - When a biomarker defines the indication. New Engl. 2017;377:1409-1412.

17. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: A pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. Clin Cancer Res. 2014;20:5322–30.

18. Masugi Y, Nishihara R, Yang J, Mima K, Da Silva A, Shi Y, et al. Tumour CD274 (PD-L1) expression and T cells in colorectal cancer. Gut. 2017;66:1463–73.

19. Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Watari H. Tumor-intrinsic PD-L1 signaling in cancer initiation, development and treatment: Beyond immune evasion. Front Oncol. 2018;8:1–8.

20. Jácome AA, Eng C. Role of immune checkpoint inhibitors in the treatment of colorectal cancer: focus on nivolumab. Expert Opin Biol Ther [Internet]. Taylor & Francis; 2019;19:1247–63. Available from: https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1680636

21. Zhang J, Shih DJH, Lin SY. Role of DNA repair defects in predicting immunotherapy response. Biomark Res. Biomarker Research; 2020;8:1–8.

22. Bailly C, Thuru X, Quesnel B. Combined cytotoxic chemotherapy and immunotherapy of cancer: modern times. NAR Cancer. Oxford University Press; 2020;2:1–20.

23. Sato H, Niimi A, Yasuhara T, Permata TBM, Hagiwara Y, Isono M, et al. DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. Nat Commun [Internet]. Springer US; 2017;8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01883-9

24. Permata TBM, Hagiwara Y, Sato H, Yasuhara T, Oike T, Gondhowiardjo S, et al. Base excision repair regulates PD-L1 expression in cancer cells. Oncogene [Internet]. Springer US; 2019;38:4452–66. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41388-019-0733-6

25. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: A diabolic liaison. Int J Cell Biol. 2012;2012.

26. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? Nat Rev Drug Discov [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;8:579–91. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrd2803

27. van der Waals LM, Jongen JMJ, Elias SG, Veremiyenko K, Trumpi K, Trinh A, et al. Increased Levels of Oxidative Damage in Liver Metastases Compared with Corresponding Primary Colorectal Tumors: Association with Molecular Subtype and Prior Treatment. Am J Pathol [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2018;188:2369–77. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.06.008

28. Maynard S, Schurman SH, Harboe C, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. Carcinogenesis. 2009;30:2–10.

29. Leguisamo NM, Gloria HC, Kalil AN, Martins T V, Azambuja DB, Meira LB, et al. Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy. 2017;

30. Azambuja DB, Leguisamo NM, Gloria HC, Kalil AN, Rhoden E, Saffi J. Prognostic impact of changes in base excision repair machinery in sporadic colorectal cancer. Pathol Res Pract. 2018;214:64–71.

31. Laporte GA, Leguisamo NM, Kalil AN, Saffi J. Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer. Crit Rev Oncol Hematol [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2018;126:168–85. Available from: https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.03.017

32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods. 2001;25:402–8.

33. Detre S, Saccani Jotti G, Dowsett M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: Validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. J Clin Pathol. 1995;48:876–8.

34. Sylman JL, Mitrugno A, Atallah M, Tormoen GW, Shatzel JJ, Yunga ST, et al. The predictive value of inflammation-related peripheral blood measurements in cancer staging and prognosis. Front Oncol. 2018;8:1–11.

35. Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. Nucleic Acids Res. 2016;44:W147–53.

36. Tudek B, Speina E. Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis. Mutat Res [Internet]. 2012;736:82–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561673%5Cnhttp://ac.els-cdn.com/S002751071200098X/1-s2.0-S002751071200098X-main.pdf?_tid=8b80b298-5310-11e4-8d04-00000aab0f6b&acdnat=1413229305_e10614d3c84ee0c03d8546dcb2a2845b

37. Murphy N, Moreno V, Hughes DJ, Vodicka L, Vodicka P, Aglago EK, et al. Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. Mol Aspects Med [Internet]. Elsevier; 2019;69:2–9. Available from: https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.005

38. Yamashita S, Venkatesan AM, Mizuno T, Aloia TA, Chun YS, Lee JE, et al. Remnant liver ischemia as a prognostic factor for cancer-specific Survival after resection of colorectal liver metastases. JAMA Surg. 2017;152:1–12.

39. Schwarz C, Fitschek F, Bar-Or D, Klaus DA, Tudor B, Fleischmann E, et al. Inflammatory response and oxidative stress during liver resection. PLoS One. 2017;12:1–14.

40. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: Insights from transgenic knockout models. World J Gastroenterol. 2013;19:1683–98.

41. Burlaka A, Vovk A, Burlaka A, Gafurov M, Iskhakova K, Ganusevich I, et al. Redox Status of a Metastatic Microenvironment in the Liver of Patients with Colorectal Cancer from EPR. Appl Magn Reson [Internet]. Springer Vienna; 2019;50:391–402. Available from: https://doi.org/10.1007/s00723-018-1093-z

42. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. Mutat Res Mutat Res [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;763:212–45. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.11.002

43. Nascimento EFR, Ribeiro ML, Magro DO, Carvalho J, Kanno DT, Martinez CAR, et al. Tissue Expresion of the Genes Mutyh and Ogg1 in Patients With Sporadic Colorectal Cancer. Arq Bras Cir Dig. 2017;30:98–102.

44. Vodenkova AS, Jiraskova K, Kroupa M, Slyskova J, Levy M, Buchler T, et al. Base excision repair capacity as a determinant of prognosis and therapy response in colon cancer patients. DNA Repair (Amst) [Internet]. Elsevier B.V.; 2018;77–85. Available from: https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.09.006

45. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature [Internet]. 2001;411:366–74. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357144

46. Ashworth A, Lord CJ. Synthetic lethal therapies for cancer : what ' s next after PARP inhibitors ? Nat Rev Clin Oncol [Internet]. Springer US; 2018;15. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41571-018-0055-6

47. Gonçalves A, Finetti P, Sabatier R, Gilabert M, Adelaide J, Borg JP, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mRNA expression in human breast cancer: A meta-analysis. Breast Cancer Res Treat. 2011;127:273–81.

48. Rojo F, García-Parra J, Zazo S, Tusquets I, Ferrer-Lozano J, Menendez S, et al. Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer. Ann Oncol. 2012;23:1156–64.

49. You S, Huang X, Wan Z. Expression of ERCC1, MSH2 and PARP1 in non-small cell lung cancer and their prognostic value for patients treated with platinum-based chemotherapy. Cancer Res Clin. 2016;28:538–42.

50. Donizy P, Pietrzyk G, Halon A, Kozyra C, Gansukh T, Lage H, et al. Nuclear-cytoplasmic PARP-1 expression as an unfavorable prognostic marker in lymph node-negative early breast cancer: 15-year follow-up. Oncol Rep. 2014;31:1777–87.

51. Liu Y, Zhang Y, Zhao Y, Gao D, Xing J, Liu H. High PARP-1 expression is associated with tumor invasion and poor prognosis in gastric cancer. Oncol Lett. 2016;12:3825–35.

52. Afzal H, Yousaf S, Rahman F, Ahmed MW, Akram Z, Akhtar Kayani M, et al. PARP1: A potential biomarker for gastric cancer. Pathol Res Pract [Internet]. Elsevier; 2019;215:152472. Available from: https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152472

53. Aiad HA, Kandil MAH, El-Tahmody MA, Abulkheir IL, Abulkasem FM, Elmansori AA, et al. The prognostic and predictive significance of PARP-1 in locally advanced breast cancer of Egyptian patients receiving neoadjuvant chemotherapy. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2015;23:571–9.

54. Klauschen F, von Winterfeld M, Stenzinger A, Sinn B V., Budczies J, Kamphues C, et al. High nuclear poly-(ADP-ribose)-polymerase expression is prognostic of improved survival in pancreatic cancer. Histopathology. 2012;61:409–16.

55. Wang Z, Zhao J, Wang G, Zhang F, Zhang Z, Zhang F, et al. Comutations in DNA damage response pathways serve as potential biomarkers for immune checkpoint blockade. Cancer Res. 2018;78:6486–96.

56. Wyss J, Dislich B, Koelzer VH, Galván JA, Dawson H, Hädrich M, et al. Stromal PD-1/PD-L1 Expression Predicts Outcome in Colon Cancer Patients. Clin Colorectal Cancer [Internet]. Elsevier Inc.; 2019;18:e20–38. Available from: https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.09.007

57. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. J Natl Cancer Inst. 2014;106:1–11.

58. Vlahopoulos S, Adamaki M, Khoury N, Zoumpourlis V, Boldogh I. Roles of DNA repair enzyme OGG1 in innate immunity and its significance for lung cancer. Pharmacol Ther [Internet]. Elsevier Inc; 2019;194:59–72. Available from: https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.09.004

6. CONCLUSÕES

- Os níveis de mRNA de *POLB* e *PARP1*, mas não de OGG1 e XRCC1, apresentaram-se elevados nos tecidos neoplásicos de metástases hepáticas de câncer colorretal em relação aos tecidos saudáveis adjacentes;
- A razão da expressão gênica entre o tecido neoplásico e o tecido normal, expressa através do índice *fold-change*, demonstrou superexpressão apenas de PARP1;
- A redução dos níveis de mRNA de *OGG1* e *POLB* em tecidos neoplásicos foi associada a CRCLM sincrônicas e presença de margens comprometidas remanescentes após o procedimento cirúrgico, respectivamente.
- A superexpressão de *PARP1* foi associada a presença de metástases hepáticas menores (<50mm), margens histológicas negativas após a ressecção cirúrgica (R0) e aumento da razão linfócitos/monócitos (<2,96);
- A superexpressão de *XRCC1* em metástases hepáticas foi associada a níveis mais baixos de CEA (<5 ng/mL) ao diagnóstico de CCR e aumento da razão plaquetas/linfócitos (> 123).
- Tecidos CRCLM exibindo menor imunorreatividade de PARP1 foram mais frequentemente presentes em pacientes que realizaram tratamento adjuvante para o tumor primário, presença de invasão perineural no tumor colorretal e aumento da razão neutrófilos/linfócitos.
- Os marcadores moleculares investigados não demonstram valor prognóstico independente nas análise de sobrevida e sobrevida livre de progressão.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Incrementar o tamanho amostral e o tempo de seguimento com intuito de aumentar o poder estatístico e validar os dados observados até o momento.
- Avaliar a expressão proteica de PD-L1 em metástases hepáticas de tumores colorretais.
- Avaliar a presença de mutações nos genes da via de reparo por excisão de bases.
- Validar a sensibilidade e especificidade dos componentes da via de reparo por excisão de bases em metástases hepáticas de tumores colorretais.

8. ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre
Rua Prof. Annes Dias, 295 • Telefone: (51) 3214.8080 • Fax: (51) 3214.8585
CEP: 90020-090 • Porto Alegre • Rio Grande do Sul • Brasil
Site: www.santacasa.org.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O câncer de fígado é dividido em duas categorias: o primário do fígado e o secundário, ou metastático, o qual é originado em outro órgão e que atinge também o fígado. Os motivos pelos quais ele acontece, embora muito estudados, ainda não estão totalmente claros. De uma forma geral, toda a mutação no DNA deveria ser corrigida por um sistema de reparo. Porém, nestas células tumorais, este sistema não funciona adequadamente. Entender como as células malignas se comportam e porque elas não conseguem reparar o seu DNA é importante para buscar tratamentos cada vez mais certeiros e que permitam a cura de cada vez mais pessoas.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada *"**Estudo da influência dos sistemas de reparo do DNA sobre o prognóstico de pacientes com metástases hepáticas**",* cujo objetivo é analisar a expressão de genes e proteínas envolvidos com o reparo do DNA em metástases hepáticas. Como muitas pessoas são acometidas por esta doença no nosso País, pesquisadores como nós, estudam as células defeituosas para melhor compreendê-las e buscar tratamentos cada vez melhores. Esta pesquisa consiste em fazer uma análise de genes e das proteínas que fazem o reparo do DNA quando há mutações nas células. Compreender estes mecanismos poderá ser uma forma de obter tratamentos mais precisos e mais eficazes aos portadores desta doença.

Para isto, será necessário ter acesso a uma pequena parte tumor que será removido durante a sua cirurgia e também a uma parte saudável do seu fígado, que é retirada juntamente com o tumor. Vamos comparar as células malignas com as saudáveis para ver como cada uma delas se comporta e quais modificações levaram à formação do tumor. Este material será utilizado em técnicas de laboratório (biologia molecular e histologia), e não trará consequências para o seu diagnóstico ou tratamento, uma vez que não muda as condutas que seu médico já estabeleceu anteriormente. Esta coleta não oferece nenhum tipo de risco adicional ao procedimento cirúrgico ou à sua recuperação.

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa como um voluntário do estudo. Caso aceite participar, pediremos a sua assinatura ao final deste termo, no qual solicitamos a sua autorização para a coleta de parte do material do tumor que será removido e da mucosa intestinal, bem como para termos acessos aos seus exames realizados neste hospital. Portanto, a assinatura deste termo assegurará que poderemos coletar seu material biológico (parte do tumor e da mucosa intestinal que serão retirados durante a cirurgia) e levá-lo ao Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre para realizarmos a pesquisa.

Você será esclarecido sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial, da pesquisa, etc., serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada por nós e outra será enviada a você.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

Eu,_____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. Os pesquisadores que entraram em contato comigo certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar os pesquisadores Dr. Antônio Kalil (51.999810098), Dr. Gustavo Laporte (51. 984013305) e Dra. Natalia Leguisamo Meirelles (51.992590793) ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170, telefone 51. 3303-9000.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome:_____
Assinatura do Participante:_____
Data:_____

Nome:_____
Assinatura do Pesquisador:_____
Data:_____

Nome:_____
Assinatura da Testemunha:_____
Data:_____

9. ANEXO II – FICHA DE COLETA DE DADOS

Identificação:

Número do paciente na pesquisa: _____

Nome do paciente:_____

Data Nascimento: ___/___/_____

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

Raça/etnia: ( ) Branco ( ) Pardo ( ) Negro ( ) Amarelo ( ) Indígena

Nome da Mãe: _____

Comorbidades: ( ) DM ( ) HAS ( ) Obesidade ( ) DPOC ( ) Cardiopatia isquêmica ( ) ICC ( ) Dislipidemia ( ) Doença Autoimune:_____ ( )DII[&] ( )Outras:_____

Peso (kg): ____ Altura (m): _____ IMC* (kg/m²): _____

( ) Desnutrição ( ) Normal ( ) Sobrepeso ( ) Obesidade

ECOG[a] ao diagnóstico: ( ) 0 ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4

TUMOR PRIMÁRIO

Data do diagnóstico**:**___**/**___**/**_____ **CEA ao diagnóstico:**_____

Colonoscopia
Data: ___/___/_____
Localização da lesão primária: ( ) Cólon Direito (incluindo transverso) ( ) Colón Esquerdo (e sigmoide)
( ) Reto
Biópsia: ( ) Adenocarcinoma bem diferenciado ( ) Adenocarcinoma Moderadamente diferenciado ( ) Adenocarcinoma pouco diferenciado

Estadiamento: T ____ N _____ M _____ EC: ____ EP _____
Metástases: ( ) Sim ( ) Não Se sim, ( ) Hepáticas ( ) Extra-Hepáticas**_____
Número de lesões Hepáticas:_____ Bilateral: ( ) Sim ( )Não
Segmentos: ( ) I ( )II ( )III ( )IV ( )V ( )VI ( )VII ( )VIII
Tamanho da maior lesão (mm): _____

Cirurgia do tumor primário
CEA pré-operatório: _____ Cirurgia Eletiva: ( ) Sim ( ) Não, motivo: ( ) Obstrução ( ) Perfuração

Quimioterapia *Neoadjuvante*: ( ) Sim ( ) Não
Se sim: N° Ciclos:_____ Esquema: _____
Radioterapia *Neoadjuvante*: ( ) Não ( ) Sim ; se Sim, Localização: ( ) Sitio primário
( ) Outro:_____
Quimioterapia *Adjuvante*: ( ) Sim ( ) Não,
Se sim: N° Ciclos:_____ Esquema: _____
Data da cirurgia: ___/___/_____
Cirurgia realizada:
( ) Colectomia Direita ( ) Colectomia Esquerda ( ) Colectomia Total ( ) Procto-colectomia
( ) Outra:_____
Hospital: ( )HSR ( ) Outro: _____

Anatomopatológico
Localização: ( ) Cólon Direito ( ) Cólon Esquerdo ( )Reto
Diferenciação: ( ) Pouco Diferenciado ( ) Moderadamente diferenciado ( ) Bem diferenciado
Mucina: ( ) Não ( )Sim
Margens cirúrgicas: ( )comprometidas ( )livres
Invasão perineural: ( )Não ( )Sim
Invasão linfovascular: ( ) Não ( )Sim
Número LFN ressecados: _____ Número LFN comprometidos: _____
Presença de MSI: ( ) Não ( ) Sim
RAS: ( ) Selvagem ( ) Mutado
BRAF: ( ) Selvagem ( ) Mutado

Segundo tumor colônico sincrônico: ( ) Não ( ) Sim

METÁSTASE HEPÁTICA

Data do diagnóstico**:**___**/**___**/**_____ CEA *ao diagnóstico*: _____

Imagem
Data: ___/___/_____
Número de lesões Hepáticas:_____ Bilateral: ( ) Sim ( )Não
Segmentos: ( ) I ( )II ( )III ( )IV ( )V ( )VI ( )VII ( )VIII
Tamanho da maior lesão (mm): _____

Quimioterapia Neoadjuvante: ( ) Sim ( ) Não
Se sim: N° Ciclos:_____ Esquema: _____
Quimioterapia Intra-arterial: ( ) Não ( ) Sim

Cirurgia: No mesmo momento do tumor primário: ( )Sim ( )Não
Data da cirurgia: ___/___/_____
CEA *pré-operatório (último antes da cirurgia)*: _____

Modalidade: ( )aberta ( )vlp

Número de lesões =hepáticas no transoperatório:_____ Bilateral: ( ) Sim ( )Não

Segmentos com lesão: ( ) I ( )II ( )III ( )IV ( )V ( )VI ( )VII ( )VIII
Segmentos ressecados: ( ) I ( )II ( )III ( )IV ( )V ( )VI ( )VII ( )VIII
Tempo de internação hospitalar: _____ dias
Complicações:_____
Clavien-Dindo[$]: ( )I ( )II ( )IIIA ( )IIIB ( )IVA ( )IVB ( )V

Data do óbito: ____/____/_____

Hemograma pré-operatório:
Data: ___/___/_____
Hemoglobina:_____
Hematócrito: _____
Leucócitos totais: _____
Neutrófilos***: _____ (absoluto) _____ % (relativo)
Linfócitos: _____ (absoluto) _____ % (relativo)
Monócitos: _____(absoluto) _____ % (relativo)
Plaquetas: _____

Anatomopatológico

Número de lesões: _____

Localização: Segmentos: ( ) I ( )II ( )III ( )IV ( )V ( )VI ( )VII ( )VIII

Diferenciação: ( ) Pouco ( ) Moderadamente ( ) Bem
Mucina: ( ) Não ( )Sim
Dimensão da Maior lesão: _____mm
Margens cirúrgicas: ( )livres, ____mm ( ) comprometidas, se sim: macroscópicas ( ) microscópicas ( )
Fez quimioterapia neoadjuvante: ( ) Não ( )Sim,
Se sim: Resposta completa a quimioterapia: ( ) Não ( ) Sim

SEGUIMENTO:

Data da Última Consulta: ___/___/_____.

Recidiva da doença: ( ) Não ( ) Sim

SE SIM: Hepática: ( ) Não ( ) Sim, Data: ___/___/_____

Operou: ( ) Não ( ) Sim, Data: ___/___/_____.

Extra-hepática: ( ) Não ( ) Sim, Data: ___/___/_____.

Quimioterapia paliativa: ( ) Não ( ) Sim, Se sim: N° Ciclos:_____

Esquemas: _____

Local:_____

ÓBITO: Data: __/__/__

LEGENDA:

[&]:DII = Doença Inflamatória Intestinal: Doença de Crohn, Retocolite Ulcerativa; **[*]IMC**= Índice de massa corporal (kg/m²); **DESNUTRIÇÃO:** < 18.5; **NORMAL:** 18.5 - 24.9; **SOBREPESO:** 25 - 29.9; **OBESIDADE:** ≥ 30; **[a]ECOG=** Escala de performance status. **0:** assintomático**; 1:** restrição para realizar atividades rigorosas, sintomas leves**; 2:** capaz de realizar o autocuidado, mais de 50% do tempo acordado fora do leito**; 3:** capaz de realizar autocuidado limitados, mais de 50% do tempo no leito**; 4:** incapaz de realizar autocuidado, restrito ao leito; **[$]:Clavien-Dindo: GRAU I**: Qualquer desvio do curso pós-operatório Ideal sem necessidade de tratamento farmacológico ou de intervenções cirúrgicas, endoscópicas e radiológicas. Regimes terapêuticos permitidos são: drogas antieméticas, antipiréticos, analgésicos, diuréticos, eletrólitos e fisioterapia. Esta categoria também inclui feridas operatórias drenadas à beira do leito; **GRAU 2:** Requer tratamento farmacológico com drogas diferentes daquelas permitidas para complicações grau I. Transfusão sanguínea e nutrição parenteral total também estão incluídas; **GRAU 3A**: Exige cirurgia, endoscópica ou intervenção radiológica SEM anestesia geral; **GRAU 3B**: Exige cirurgia, endoscópica ou intervenção radiológica COM anestesia geral; **GRAU 4A**: Complicação com Risco de vida (incluindo SNC) Necessidade de UTI - Disfunção de um só órgão (incluindo diálise); **GRAU 4B:** Complicação com Risco de vida (incluindo SNC) Necessidade de UTI - Disfunção de múltiplos órgãos; **GRAU 5:** Óbito do paciente. **[**]Metástases Extra Hepáticas:** Não considerar gânglios regionais como metástases**. [***]Neutrófilos:** Considerar segmentados, bastões, mielócitos e metamielócitos

10. ANEXO II - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do sistema de reparo do DNA por excisão e por recombinação sobre o prognóstico e resposta à quimioterapia em pacientes com metástases hepáticas

Pesquisador: ANTONIO NOCCHI KALIL

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 72393917.8.0000.5335

Instituição Proponente: ISCMPA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.261.736

Apresentação do Projeto:

Aproximadamente metade de todos os pacientes com câncer colorretal desenvolvem recorrência local ou metástase à distância durante a doença. O fígado é reconhecido como o sítio mais comum de metástase colorretal, visto que a maior parte da drenagem intestinal mesentérica entra no sistema venoso portal hepático. A terapia sistêmica destina-se principalmente a células tumorais que se separaram da lesão primária, hospedaram-se em outros lugares, são indetectáveis por imagens clínicas e são inacessíveis à excisão. Portanto, os marcadores específicos de metástase e de reposta à quimioterapia são necessários para delinear um perfil molecular específico destes tumores. Diversos estudos apontam a influência dos sistemas de reparo do DNA como reparo de malpareamento (MMR) e reparo por excisão de bases (BER) na carcinogênese colorretal, sendo atualmente propostos como marcadores preditivo e prognóstico desta doença. Entretanto, os estudos falham em não estender estas análises às metástases hepáticas, as quais também carecem de marcadores moleculares para melhor definir a abordagem terapêutica. O objetivo deste trabalho é avaliar a influência da expressão de componentes das vias de reparo do DNA por excisão e por recombinação sobre o prognóstico e a resposta à quimioterapia em pacientes com

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

metástases hepáticas de tumores colorretais. Trata-se de um estudo prospectivo, descritivo e exploratório, o qual
incluirá uma amostra por conveniência, de pacientes que tiverem indicação cirúrgica para hepatectomia cuja realização se der no Hospital Santa Rita e preencheram os critérios de inclusão pelo período de 1 ano. Serão coletadas amostras das metástases hepáticas de tumores colorretais e tecido hepático saudável pareado durante a cirurgia de hepatectomia. As amostras serão avaliadas quanto à expressão gênica (qRT-PCR) de genes das vias de reparo do DNA por excisão e por recombinação (OGG1, POLB, PARP1, XRCC1, XRCC2, XRCC3 e XRCC5); quanto à presença de mutações em KRAS, NRAS e BRAF (sequenciamento); quanto à expressão proteica de produtos gênicos aberrantes (imuno-histoquímica); quanto à presença de instabilidade de microssatélites (expressão imuno-histoquímica de MLH1 e MSH2); e quanto às características histopatológicas. Os dados moleculares serão correlacionados com os dados clínicos e de estadiamento. A resposta à quimioterapia será avaliada pelo sistema RECIST e também será correlacionada com os dados moleculares.
Serão coletadas as seguintes variáveis de cada paciente: gênero, idade, data da ressecção do tumor primário, estadiamento TNM da lesão primária, realização de quimioterapia sistêmica ou radioterapia local adjuvante ao tratamento da lesão primária, data do diagnóstico da metástase hepática, número de nódulos identificados, bilateralidade hepática das lesões, presença de doença extra-hepática, realização de quimioterapia pré e pós hepatectomia, tipo de hepatectomia (hepatectomias maiores foram definidas como qualquer ressecção de 3 ou mais segmentos hepáticos), utilização de método ablativo concomitante com a ressecção hepática, ressecção de doença extra-hepática, transfusão sanguínea durante ou 24 horas após a intervenção, tempo de internação hospitalar, tamanho do maior nódulo (maior ou menor que 5cm), quantidade de lesões na avaliação
anatomopatológica, status da margem cirúrgica, distância da margem, grau histológico
Serão analisados 60 casos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a influência da expressão de componentes das vias de reparo do DNA por excisão de bases e por recombinação sobre o prognóstico e a resposta à quimioterapia em pacientes com metástases hepáticas de tumores colorretais.
Objetivo Secundário:
• Avaliar o status da via MMR através da expressão proteica de MLH1 e MSH2 em metástases hepáticas secundárias ao câncer colorretal;•

Avaliar o status mutacional de KRAS, NRAS e BRAF metástases hepáticas secundárias ao câncer colorretal;

• Avaliar a expressão gênica de OGG1, POLB, PARP1, XRCC1, XRCC2, XRCC3 e XRCC5 em metástases hepáticas de câncer colorretal e tecido hepático saudável pareado;

• Associar as variáveis moleculares (status de MMR, status mutacional e expressão gênica) às características clínicas dos pacientes;

• Agrupar os indivíduos em cluster segundo a similaridade e associação destas características;

• Correlacionar os dados moleculares com os dados clínicos dos pacientes;

• Correlacionar os dados moleculares com a resposta terapêutica dos pacientes que realizaram neoadjuvância;

• Propor marcadores moleculares preditivos e prognósticos no estadiamento de metástases hepáticas de tumores colorretais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são mínimos, especialmente relacionados a confidencialidade.O espécime tumoral será coletado após ressecção da lesão hepática, não sendo qualificado como um procedimento adicional à cirurgia. Portanto, os riscos relacionados à obtenção da amostra são aqueles inerentes ao procedimento cirúrgico, o qual tem intenção curativa e correspondem a indicação assistencial.

Benefícios:

Não há benefícios diretos aos participantes. Entretanto o presente estudo fornecerá dados sobre o perfil molecular das metástases hepáticas de tumores colorretais em uma população do Estado do Rio Grande do Sul sob o ponto de vista do reparo do DNA. O estudo poderá nortear estudos posteriores para a detecção e o desenvolvimento de marcadores moleculares de metástases hepáticas que direcionem os tratamentos quimioterápicos com maior precisão, melhorando a resposta terapêutica, assim, aumentando a sobrevida de futuros pacientes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo tentara determinar alterações no sistema de reparo do DNA em metástase hepáticas de carcinoma colo-retal e correlacioná-las com o quadro clínico. O estudo é relevante e está adequado as normas existentes para pesquisa que envolvam seres humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

presenta cronograma e orçamento. Declarações de confidencialidade, uso de dados e prontuário;

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

uso e publicação de dados, bem como autorizações das chefias dos serviços participantes,

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto respeita as normas existentes para pesquisa envolvendo humanos, Apresenta relevância científica e riscos mínimos. Nosso parecer é favorável a sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após avaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 – Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_952764.pdf	28/07/2017 08:08:33		Aceito
Folha de Rosto	MtxHep_FolhadeRosto.pdf	28/07/2017 08:07:56	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	29/06/2017 15:10:43	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MxTHep.doc	29/06/2017 15:10:00	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Outros	MtxHep_UsoePublicacaodeDados.pdf	29/06/2017 14:59:10	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

Continuação do Parecer: 2.261.736

Outros	MtxHep_UsodeDadoseMateriaisBiolgicos.pdf	29/06/2017 14:57:47	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Outros	MtxHep_UsodeDadoseProntuarios.pdf	29/06/2017 14:57:13	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Outros	MtxHep_Confidencialidade.pdf	29/06/2017 14:56:43	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Outros	MtxHep_Isencaodeonus.pdf	29/06/2017 14:56:27	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Outros	MtxHep_labsufcspa.pdf	29/06/2017 14:55:51	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Outros	MtxHep_ChefiaCirOncologica.pdf	29/06/2017 14:54:52	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Outros	MtxHep_ChefiaPato.pdf	29/06/2017 14:54:30	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Outros	FormInscr.pdf	29/06/2017 14:53:55	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Orçamento	MtxHep_Orcamento.pdf	29/06/2017 14:52:53	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito
Cronograma	MxtHep_Cronograma_.pdf	29/06/2017 14:52:05	ANTONIO NOCCHI KALIL	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

PORTO ALEGRE, 06 de Setembro de 2017

Assinado por:
ELIZETE KEITEL
(Coordenador)

Endereço: R. Profº Annes Dias,295 Hosp.Dom Vicente Scherer
Bairro: 6° andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br