UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Natalia Motta Leguisamo Meirelles

Influência do sistema de reparo do DNA sobre o prognóstico e a resposta à quimioterapia no câncer colorretal

Porto Alegre
2016

Natalia Motta Leguisamo Meirelles

Influência do sistema de reparo do DNA sobre o prognóstico e a resposta à quimioterapia no câncer colorretal

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Jenifer Saffi
Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Nocchi Kalil

Porto Alegre
2016

Catalogação na Publicação

Leguisamo Meirelles, Natalia Motta
Influência do sistema de reparo do DNA sobre o prognóstico e a resposta à quimioterapia no câncer colorretal / Natalia Motta Leguisamo Meirelles. -- 2016.
202 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Orientador(a): Jenifer Saffi ; coorientador(a): Antonio Nocchi Kalil.

1. Reparo do DNA. 2. Câncer colorretal. 3. Prognóstico. 4. Metabolismo energético. 5. Quimioterapia. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

"Agir, eis a inteligência verdadeira.

Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for.

O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.

Condições de palácio tem qualquer terra larga,

Mas onde estará o palácio se não o fizerem ali? "

Fernando Pessoa

Dedico este trabalho ao meu pai, Flavio; ao meu marido e grande amor da minha vida, Tiago; e à minha princesa, Teodora.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Dra. Jenifer Saffi,** que me recebeu de braços abertos diante da minha pouca experiência no seu laboratório. Agradeço, principalmente, por sempre ter acreditado nas minhas ideias e cultivado minha autonomia acadêmica. Este trabalho é fruto da tua confiança em mim. Muito obrigada.

Ao meu co-orientador, **Dr. Antonio Nocchi Kalil**, por ter feito parte da minha história pessoal e por ter aberto todas as portas na ISCMPA que possibilitaram a coleta dos dados deste trabalho. Agradeço por ter sido sempre um entusiasta das minhas ideias e por todo o otimismo depositado sobre nosso futuro acadêmico.

À minha orientadora na Universidade de Surrey, **Dra. Lisiane Meira**, que me acolheu com muito carinho, e se tornou um exemplo acadêmico e pessoal para mim.

À minha aluna de iniciação científica, **Helena de Castro e Gloria**, que esteve ao meu lado desde o início deste trabalho, desbravando todos os desafios que um trabalho pioneiro pode ter. Agradeço pela dedicação e comprometimento, mas, principalmente, pela lealdade e amizade que sempre teve comigo.

Aos meus colaboradores da ISCMPA, os cirurgiões **Daniel Azambuja**, **Talita Martins** e **Gustavo Laporte**, por estarem na linha de frente deste trabalho e garantirem a participação dos pacientes. Mais ainda, agradeço por toda a convivência, o aprendizado e a amizade que foi criada com cada um.

À minha amiga e técnica do Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA, **Grasiela Agnes**, por todo o apoio especializado, mas sobretudo pela amizade durante todo este período.

Às técnicas e amigas do Laboratório de Patologia da UFCSPA, **Dra. Keli Reiter**, **Rosalva Meurer** e **Teresinha Stein**, que através da sua experiência e do seu trabalho árduo, permitiram que este trabalho fosse realizado.

Aos colegas do **Laboratório de Genética Toxicológica da UFCSPA** pelos desafios e pela oportunidade de crescimento pessoal, especialmente à **Débora Espiña**, pela verdadeira amizade e por ter tornado esse caminho mais leve e divertido.

Ao meu marido, **Tiago Meirelles**, meu verdadeiro alicerce, meu grande amor e pai da minha amada **Teodora**. Agradeço por todo o amor durante todos os meus momentos difíceis nesta jornada. Eu nada seria se não te tivesse ao meu lado.

Ao meu pai, **Flavio Leguisamo**, que durante o meu doutorado perdeu a batalha para doença alvo de estudo desta tese, mas no meio do caminho me permitiu conhecer o Dr. Kalil. Dedico também à minha mãe, **Márcia Leguisamo**, que sofreu com ele todas as dificuldades. Agradeço por todas as oportunidades e apoio que ambos me proporcionaram para que eu trilhasse o caminho acadêmico.

Finalmente, agradeço aos meus poucos e valiosos **amigos** e à minha **família** por todos os momentos que tanto me fazem feliz e me fortalecem.

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

Esta tese foi desenvolvida nos laboratórios de Genética Toxicológica, Biologia Molecular e Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e na Universidade de Surrey (Guildford, UK). Todos os pacientes são oriundos dos serviços de Proctologia e Cirurgia Oncológica da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA). Este trabalho foi financiado pela FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, Projeto PPSUS – projeto número 1313-2551/13-8), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brasil – Doutorado Sanduíche, processo 99999.008109/2014-01) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil – Processo 308539/2014-1).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS 11

LISTA DE FIGURAS 14

LISTA DE TABELAS 15

RESUMO 16

ABSTRACT 17

APRESENTAÇÃO DA TESE 18

1. INTRODUÇÃO 20

1.1 CÂNCER COLORRETAL 20

1.1.1 CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA 20

1.1.2 ETIOLOGIA E CARCINOGÊNESE 24

1.1.3 DIAGNÓSTICO, ESTADIAMENTO E ASPECTOS PROGNÓSTICOS 28

1.1.4 TRATAMENTO 32

1.1.5 BIOMARCADORES 34

1.2 SISTEMAS DE REPARO DO DNA 40

1.2.1 REPARO DIRETO 44

1.2.2 REPARO DE MALPAREAMENTO (MMR) 45

1.2.3 REPARO POR EXCISÃO DE BASES (BER) 48

1.2.4 REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS (NER) 54

1.3 SISTEMA DE REPARO DO DNA E CÂNCER COLORRETAL 58

1.3.1 INFLUÊNCIA SOBRE O DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO 59

2. OBJETIVOS 69

2.1 OBJETIVO GERAL 69

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 69

3. CAPÍTULO I 69

4. CAPÍTULO II **112**

5. DISCUSSÃO GERAL **149**

6. CONCLUSÕES **164**

6.1 CONCLUSÃO GERAL **164**

6.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS **164**

7. PERSPECTIVAS **166**

8. REFERÊNCIAS **167**

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFCSPA **196**

ANEXO II – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA ISCMPA **198**

ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO **201**

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FdUrd – 5-fluorodeoxiridina

5-FU - 5-fluorouracil

5`-dRP- 5-deoxirribose fosfato

6,4-PPs – 6,4-fotoprodutos

AJCC – American Joint Comittee

AP – Apurínico ou apirimidínico

APC – Adenomatous Polyposis Coli

ATP - Adenosina trifosfato

BER - Reparo por excisão de bases (do inglês: *base excision repair*)

CCR – Câncer colorretal

CEA – Antígeno carcinoembriônico (do inglês: *carcinoembryonic antigen*)

CIMP – Fenótipo metilador de ilhotas CpG (do inglês: *CpG insland methylator phenotype*)

CIN – Instabilidade cromossômica (do inglês: *chromosomal instability*)

CPD – Dímeros de ciclobutano (do inglês: *cyclobutane pyrimidine dimers*)

CSA – Cockayne Syndrome Complemetation Group A

CSB – Cockayne Syndrome Complemetation Group B

DDR - Resposta a danos ao DNA (do inglês: *DNA damage response*)

DSB - Quebra de cadeia dupla de DNA (do inglês: *double strand break*)

EGRF- Receptor de Fator crescimento endotelial epidermal (do inglês: *epidermal growth fator receptor*)

ERO - Espécies Reativas do Oxigênio

FEN1 – Flap Endonuclease 1

GG-NER - reparo por excisão de nucleotídeos do genoma global (do inglês: *Global Genome Nucleotide Excision Repair*).

HMGN1 – High Mobility Group Nuleosome Binding Domain 1

HNPCC – Câncer colorretal hereditário não-polipoide (do inglês: *hereditary non-polyposis colorectal cancer*)

HR - Reparo por recombinação homóloga (do inglês: *homologous recombination*)

IARC – International Agency for Research on Cancer

INCA - Instituto Nacional do Câncer

KRAS – V-Ki-Ras 2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

LP-BER – Via longa do BER (do inglês: *long-patch BER*)

MAP – Polipose adenomatosa associada ao MUTYH

MGMT - O^6-Metilguanina-DNA Metiltransferase.

MLH1 - MutL homolog 1

MLH3 - MutL homolog 3

MMR – Reparo de malpareamento (do inglês: *mismatch repair*)

MMS- Metilmetanossulfonato

MSH2 – MutS homolog 2

MSH3 – MutS homolog 3

MSH6 – MutS homolog 6

MSI – Instabilidade de microssatélites (do inglês: *microsatellite instability*)

NAD^+ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo.

NER – reparo por excisão de nucleotídeos (do inglês: nucleotide *excision repair)*

NHEJ - Junção de extremidades não homólogas (do inglês: *non-homologous end joining*).

NRAS – Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog

OGG1- 8-oxoguanina DNA glicosilase

PAF – Polipose adenomatosa familiar

PAR – poli (ADP-ribosil)

PARP-1 - Poli (ADP-ribose) polimerase-1

PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen

PMS1 – Post Meiotic Segregation Increased 1

PMS2 – Post Meiotic Segregation Increased 2

RFC – Replication Factor C

SAM – S- adenosilmetionina

SP-BER – Via curta do BER (do inglês: *short-patch BER*)

SSB - Quebra de cadeia simples de DNA (do inglês: *single strand break*).

TC-NER - Reparo por excisão de nucleotídeos acoplado à transcrição (do inglês: *Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair*).

TLS – Síntese translesão (do inglês: *translesion syntesis*)

TMZ – Temozolomida

TNM – tumor-linfonodo-metástase

UICC – International Union Against Cancer

UNG – Uracil-DNA-glicosilase

UV - Radiação ultravioleta.

VEGF - Fator vascular de crescimento endotelial (do inglês: *vascular endothelial growth factor*)

XAB2 - Xeroderma Pigmentosusm Complementetation Group A Binding Protein 2

XPA – Xeroderma Pigmentosusm Complementation Group A

XPC – Xeroderma Pigmentosusm Complementation Group C

XPD – Xeroderma Pigmentosusm Complementation Group D

XRCC1 – X-Ray Repair Cross- Complementing Protein 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo do intestino humano.

Figura 2: Incidência de câncer e mortalidade por idade, sexo e região a cada 100 mil habitantes.

Figura 3: Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasias de cólon e reto por 100 mil homens e mulheres, respectivamente, estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade da Federação.

Figura 4: Esquema ilustrativo dos principais agentes endógenos e exógenos com potencial de danificar o DNA, exemplos das lesões causadas e vias diretamente envolvidas com o seu reparo.

Figura 5: Representação esquemática das proteínas envolvidas em cada fase do processamento de um malpareamento, desde o seu reconhecimento até a religação do fragmento recém-sintetizado à fita original.

Figura 6: Representação esquemática do reparo por excisão de bases, seus principais efetores e suas subvias, longa e curta.

Figura 7: Representação esquemática da via de reparo por excisão de nucleotídeos. A etapa de reconhecimento da lesão é feita por uma das duas vias, GGR-NER ou TCR-NER. Em seguida, estas vias unem-se através de componentes em comum, convergindo para uma única via até o processo final de ressíntese e religação do fragmento processado.

Figura 8: Modelo hipotético da influência das vias de reparo por excisão sobre a agressividade tumoral colorretal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação clínica dos carcinomas colorretais de acordo com a escala TNM.

Tabela 2: Classificação histopatológica do CCR.

Tabela 3: Fatores prognósticos e sua significância clínica no câncer colorretal.

RESUMO

O reparo do DNA inadequado causado pela ineficiência de uma das suas vias - como o reparo por excisão de bases (BER), reparo de malpareamento (MMR) e reparo por excisão de nucleotídeos (NER) - é conhecido por ter influência nos resultados clínicos e patológicos de vários tipos de câncer e contribuir para a resistência à quimioterapia. O desequilíbrio em diferentes passos destas vias, como consequência da expressão demasiado alta ou baixa de algum dos seus componentes, pode influenciar no destino de células neoplásicas de diferentes maneiras, tais como através da perturbação do metabolismo, o acúmulo de intermediários tóxicos e a evasão da morte celular, o que, ao final, pode configurar-se em um papel determinante na sobrevida dos pacientes. Este estudo caracterizou os perfis de expressão das principais vias do sistema de reparo do DNA em tumores colorretais e sua associação com características clínicas e patológicas. Além disso, avaliou, *in vitro*, os possíveis mecanismos que podem estar associados à agressividade do tumor e com a resposta à quimioterapia. O desenho do estudo incluiu dois braços: (1) clínico: Setenta pares de tumores colorretais esporádicos e mucosas intestinais saudáveis adjacentes pareados foram avaliados em relação à expressão gênica e proteica das vias de reparo direto, MMR, BER e NER e sua associação com características clínicas e patológicas. (2) *in vitro*: células colorretais deficientes em MMR e que superexpressavam as enzimas MPG ou XRCC1 da via BER foram tratados com os quimioterápicos 5-fluoracil e temozolomida e avaliadas quanto à sua viabilidade e metabolismo energético. Nossos dados clínicos mostraram que a superexpressão dos componentes das vias BER e NER foram associados com características tumorais e desfechos patológicos mais agressivos em pacientes com câncer colorretal (presença de invasão linfática e perineural; tumores pouco diferenciados; escores TNM mais elevados). *In vitro*, a superexpressão de MPG, mas não de XRCC1, nas células MMR deficientes provocou um aumento da sensibilidade tanto a 5-fluoracil, como a temozolomida através da depleção de ATP e acúmulo de lactato. Este trabalho demonstra, portanto, que as vias de reparo de DNA apresentam um padrão de expressão heterogêneo e, frequentemente o aumento da sua expressão associa-se com diversos desfechos clínicos e patológicos negativos. No entanto, as alterações nas expressões de genes e proteínas do BER parecem conduzir a um desequilíbrio desta via, que pode ser explorado como uma ferramenta para um *design* terapêutico mais preciso. Finalmente, propõe-se mais investigações sobre a eficácia da temozolomida no tratamento do câncer colorretal, através da exploração do *crosstalk* entre MMR e BER e a disfunção do metabolismo.

PALAVRAS-CHAVE: câncer colorretal, reparo do DNA, prognóstico, 5-fluoracil, temozolomida, metabolismo energético.

ABSTRACT

Inappropriate DNA repair caused by inefficiency of one of its pathways - such as base excision repair (BER), mismatch repair (MMR) and nucleotide excision repair (NER) - is known to have influence in several cancer clinical and pathological outcomes and to contribute to chemotherapy resistance. Imbalances in different steps of these pathways, as consequence of high and/or low expression of its components simultaneously, may influence cancer cells' fate in different ways, such as through metabolic intermediates disruption, toxic intermediates accumulation and cell death evasion, which, in the end, may have a determinant role in patients' survival. Our study characterized the main DNA repair pathways expression profiles in colorectal tumors and its association with clinical and pathological features. In addition, we also exploited, in vitro, the possible mechanisms behind tumor aggressiveness and response to chemotherapy. Study design included two arms: (1) clinical: Seventy pairs of sporadic colorectal tumors and matched adjacent mucosal specimens were assessed for direct repair, MMR, BER and NER gene and protein expression and its association with pathological and clinical features commonly used for patient staging and treatment approaches. (2) In vitro: MMR-deficient colon cancer cells overexpressing MPG and XRCC1 and treated with 5-fluoruracil and temozolomide were evaluated for viability and energy metabolism. Our clinical data showed that overexpression of BER and NER components were associated with more aggressive tumor features and poor pathological outcomes in colorectal cancer patients (presence of lymphatic and perineural invasion; poorly-differentiated tumors; advanced TNM staging. In vitro, the overexpression of MPG, but not XRCC1, in MMR-deficient colon cancer cells increased sensitivity to 5-fluoruracil and temozolomide through ATP depletion and lactate accumulation. We concluded that the DNA repair pathways have a heterogeneous expression. pattern and plenty of associations with poor clinical and pathological outcomes. However, BER gene and protein changes in expression levels seem to lead to a pathway imbalance, which may be exploited as a tool for a more accurate therapy design. Moreover, we propose more investigations on temozolomide efficacy in colorectal cancer treatment, by exploiting the crosstalk between MMR and BER and the metabolism disruption.

KEYWORDS: colorectal cancer, DNA repair, prognosis, 5-fluoracil, temozolomide, energy metabolism.

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese de doutorado é composta de: uma **Introdução,** a qual traz uma revisão da literatura contendo os principais tópicos conceituais envolvidos neste trabalho. Nesta seção, são abordados aspectos epidemiológicos e clínicos do câncer colorretal, bem como são explorados os mecanismos de reparo de lesões no DNA até então elucidados. Em relação a este tópico, são abordadas com maior profundidade as vias de reparo direto, de malpareamento e por excisão de bases e nucleotídeos, visto que são os objetos de estudo desta tese. A finalização desta seção conta com uma breve revisão sobre a influência da modulação do sistema de reparo DNA sobre o diagnóstico, o prognóstico e o delineamento do tratamento do câncer colorretal. Subsequentemente, são apresentados os seguintes capítulos:

CAPÍTULO I: **Artigo Original (submetido ao periódico *Oncotarget*) - *Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy.*** Neste trabalho original, abordamos a expressão gênica e proteica das vias de reparo do DNA por via direta, malpareamento e excisão de bases em tumores colorretais e seus tecidos saudáveis pareados, correlacionando os dados moleculares com os aspetos patológicos de estadiamento da doença. Ao mesmo tempo, em um modelo *in vitro*, apresentamos a influência da superexpressão de duas proteínas-chave na via de reparo por excisão de base na resposta a dois agentes quimioterápicos: um clássico (5-fluoracil) e um não utilizado na rotina (temozolomida), bem como exploramos o metabolismo energético envolvidos com morte e resistência celular conferido pela modulação da expressão gênica. Finalmente, neste trabalho é proposto o uso de marcadores moleculares para determinação do uso destas drogas em um perfil específico de pacientes portadores de câncer colorretal.

CAPÍTULO II: Artigo Original (a ser submetido) - ***Prognostic impact of changes in nucleotide excision repair machinery in sporadic colorectal cancer.*** Neste trabalho analisamos a expressão gênica e proteica de componentes da via do reparo do DNA por excisão de nucleotídeos em tumores colorretais e tecidos saudáveis e sua associação com aspectos prognósticos conferidos pelas ferramentas atuais de estadiamento da doença, bem como com os diferentes perfis da via de reparo de mal pareamento.

Ao final, é apresentada uma **Discussão Integrada** dos dados obtidos nos capítulos desta tese, bem como as **Conclusões** e **Perspectivas** geradas por este trabalho.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

1.1.1 Conceito e epidemiologia

O câncer do cólon (que compreende todas as suas porções, cólon ascendente, transverso, descendente e sigmoide) e do reto (Figura 1) é apresentado na literatura, no conjunto abrangente denominado câncer colorretal (CCR) no que concerne à epidemiologia, etiologia, fatores de risco e patologia. As diferenças entre os tumores de cólon e reto se dão em relação às características da região anatômica de cada um, o que proporciona variações quanto às modalidades de tratamentos. Apesar de alguns autores acharem que possam ter fatores etiológicos distintos, os cânceres do cólon e do reto permanecem unidos, sendo separados apenas para facilitar a abordagem terapêutica (VASQUES et al, 2010). Desta forma, o CCR refere-se às neoplasias que acometem o cólon, a junção retossigmóide, o reto, o ânus e o canal anal (BELOV et al, 2011). Destas diferentes localizações, o câncer de reto é o mais incidente (INCA, 2014).

Nos países onde a incidência do câncer de cólon é alta, aproximadamente 60% dos casos de câncer colorretal surgem na parte distal do cólon (incluindo flexão do baço, cólon descendente, sigmoide e cólon sigmoide e reto), enquanto em países com baixa incidência, predominam os casos na região proximal (incluindo ceco, cólon ascendente, flexura hepática e transversal cólon) (INCA, 2014). Sua aparência macroscópica é influenciada pela fase evolutiva no momento da descoberta, podendo ser encontrados diversos aspectos morfológicos, como forma polipoide, ulcero-vegetante, ulcerativa e forma infiltrativa (GORDON e NIVATVONGS, 1999).

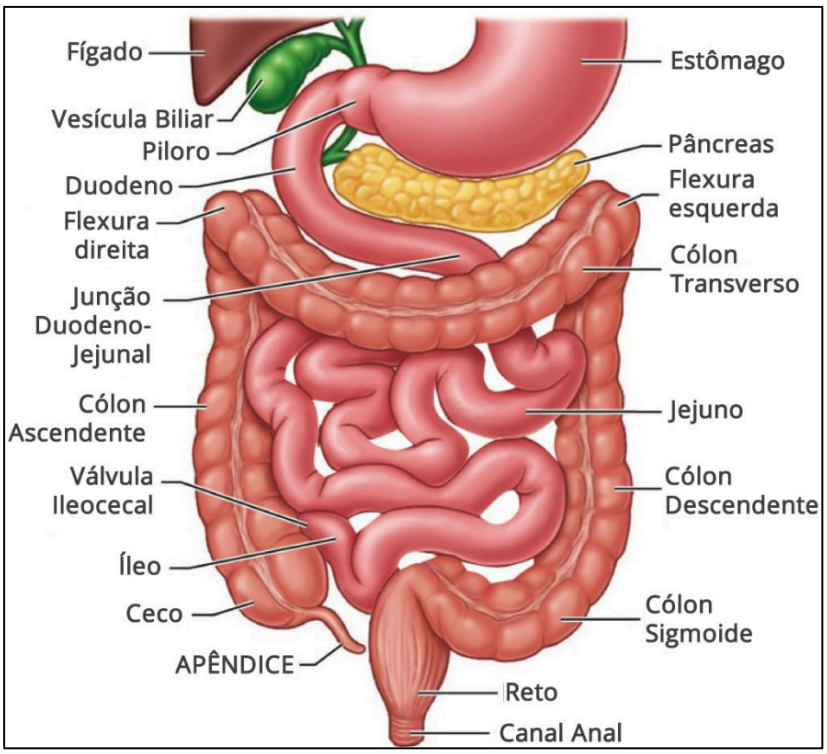


Figura 1: Esquema ilustrativo do intestino humano. Imagem adaptada de Imagem adaptada de Welters Kluwer Health – Lippincott Williams & Wilkins (2014)

Segundo dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), mundialmente o CCR é o terceiro tipo de câncer mais comum em homens (746 mil casos, 10% do total) e o segundo em mulheres (614 mil casos, 9,2% do total). Quase 55% dos casos ocorrem em regiões mais desenvolvidas do globo (Figura 2). Porém, existe uma grande variação geográfica da incidência em todo o mundo e os padrões geográficos são muito semelhantes em homens e mulheres: taxas de incidência variam dez vezes em ambos os sexos em todo o mundo, sendo que as taxas de incidência mais altas se encontram na Austrália/Nova Zelândia (44,8 e 32,2 por 100 mil habitantes em homens e mulheres, respectivamente) e a menor na África Ocidental (4,5 e 3,8 por 100 mil habitantes) (FERLAY et al, 2013).

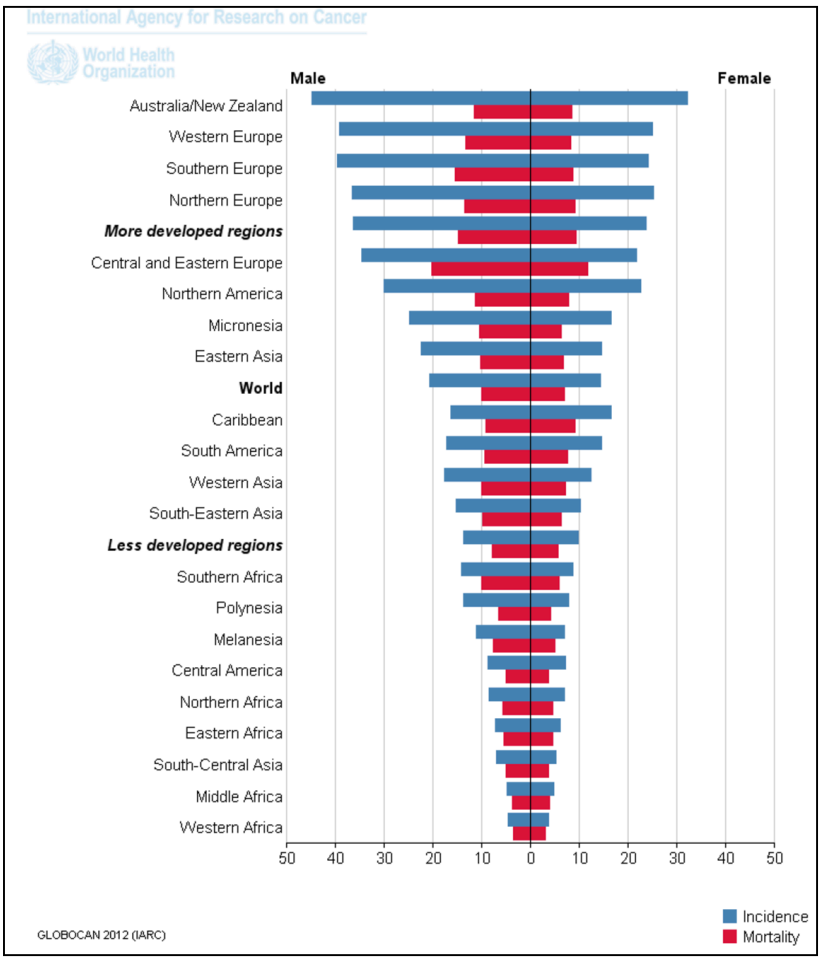


Figura 2: Incidência de câncer e mortalidade por idade, sexo e região a cada 100 mil habitantes. (Fonte: Estudo GLOBOCAN. IARC, 2013).

Ainda, segundo o mesmo estudo, a mortalidade por CCR corresponde a 8,5% de todas as mortes por câncer no mundo, com 52% dos eventos ocorrendo nas regiões menos desenvolvidas do mundo. As taxas de mortalidade mais altas estimadas em ambos os sexos ocorrem na Europa Central e Oriental (20,3/100.000 habitantes para os homens, 11,7/100.000 habitantes mulheres), e a menor na África Ocidental (3,5 e 3,0/100 mil habitantes para homens e mulheres, respectivamente).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) foram registradas 15.415 mortes por CCR, sendo 7.387 destas em homens e 8.024 em mulheres (Figura 3). O INCA prevê, ainda 34.280 novos casos da doença em 2016, sendo 16.660 em homens e em

17.620 mulheres. As estimativas de 2016 são que as regiões Sul e Sudeste continuem apresentando as maiores incidências da doença tanto para homens quanto para mulheres (INCA, 2016). Entre as capitais, Porto Alegre ocupa a terceira e quarta posições em termos de incidência bruta respectivamente entre homens e mulheres (DATASUS, 2015).

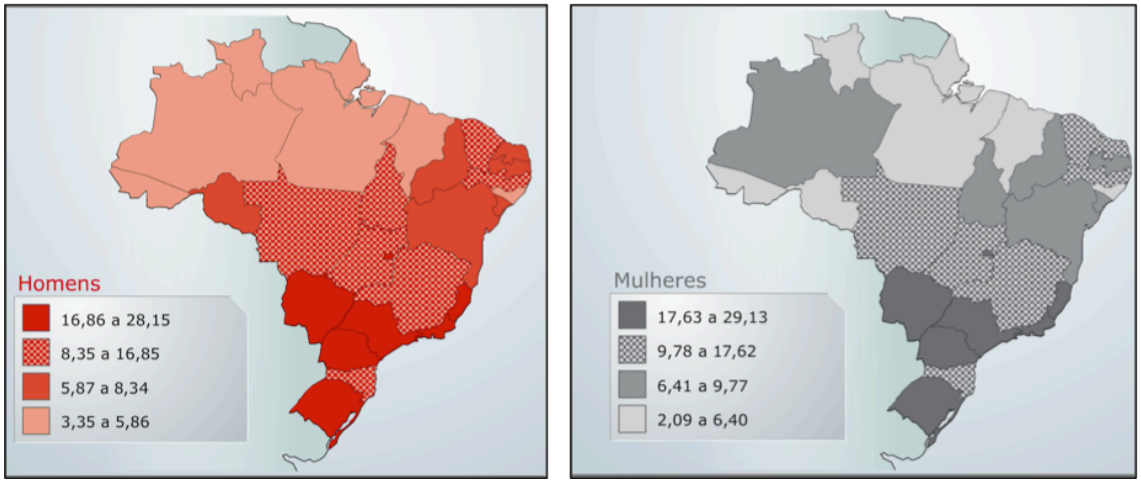


Figura 3: Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasias de cólon e reto por 100 mil homens e mulheres, respectivamente, estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade da Federação. (Fonte: Estimativa do Câncer no Brasil, INCA, 2016.)

Igualmente segundo o INCA (2016), à exceção dos tumores de pele não melanoma, o CCR em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste e o terceiro nas regiões Sul e Centro-Oeste. Na região Norte ocupa a quarta posição e, na região Nordeste a quinta. Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste e Sul. O terceiro nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, enquanto na região Norte, é o quarto mais frequente.

As diferenças regionais das taxas de mortalidade atribuídas ao CCR têm sido cada vez mais assinaladas, visto que atestam a contribuição de hábitos culturais e alimentares, bem como diferenças socioeconômicas e de estilo de vida para essa heterogeneidade. As regiões Sul e

Sudeste, em comparação com as demais, apresentam, provavelmente, hábitos de vida que poderiam levar a maior risco de desenvolvimento do CCR, como o baixo consumo de fibras e o alto teor de lipídios na dieta, ingestão elevada de álcool e prevalências mais altas de tabagismo (CAPELLANI et al, 2013; INCA, 2016).

1.1.2 Etiologia e carcinogênese

O CCR é considerado uma doença multifatorial, com diversos fatores de risco constantemente associados ao seu desenvolvimento, sendo, portanto, resultado de uma interação complexa e ainda não completamente elucidada da interação entre fatores genéticos e ambientais. Diferentemente de outros tipos de câncer, como por exemplo câncer de pulmão, não há um único fator de risco responsável pela maior parte dos casos de câncer colorretal (BRENNER et al, 2014).

De uma maneira geral, acredita-se que os fatores ambientais e o estilo de vida são os verdadeiros responsáveis pela maioria dos casos de CCR, em razão da grande variação geográfica nas taxas de incidência, como comprovam estudos com migrantes (PEPPONE et al, 2009). Dentre os fatores de risco epidemiologicamente estabelecidos estão o histórico familiar da doença, a presença de doença inflamatória crônica intestinal, o tabagismo, o etilismo, o elevado consumo de carne vermelha, o baixo consumo de fibras, o diabetes mellitus e a obesidade (ANDERSON et al, 2003; RENEHAN et al, 2008; ALEXANDER e CUSHING, 2011; FEDIRKO et al, 2011; JIANG et al, 2011; HANSEN et al, 2013).

A carcinogênese colorretal é provavelmente uma das mais estudadas e bem descritas em humanos, o que se deve ao fato de esta doença apresentar certa facilidade de detecção e remoção de lesões pré-cancerosas - ou pólipos -, permitindo a identificação e a visualização das fases sequenciais do seu desenvolvimento. Em linhas gerais, a carcinogênese colorretal é

um processo composto por diversos passos sequenciais, consistindo em modificações genéticas e epigenéticas que acarretam na malignização celular, levando o epitélio normal, em cerca de 10 anos, a se transformar em adenocarcinoma (VOGELSTEIN et al, 1988; BARDHAN e LIU, 2013).

A etiologia molecular do CCR é heterogênea e cada vez mais relevante na prática clínica e o seu conhecimento pode refletir diretamente no prognóstico e na resposta ao tratamento. Classicamente, duas principais vias são atribuídas à responsabilidade pela geração dos CCR: (1) a via supressora, assinalada por alteração sequencial de genes supressores tumorais e proto-oncogenes e (2) a via mutadora, caracterizada pela presença de mutações em genes de reparo do DNA (CAHILL et al, 1998). Neste modelo, cerca de 70% dos adenomas surgem a partir de mutações no gene APC (do inglês: *Adenomatous Polyposis Coli*) e/ou em oncogenes, como o KRAS (do inglês: *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), supressores tumorais, como o p53 e elementos da via de sinalização TGF-β, como TGFBR2 e SMAD4, levando à formação de um epitélio displásico. Este quadro é frequentemente acompanhado da presença de instabilidade cromossômica. Paulatinamente, as células que compõem esta lesão vão adquirindo novas mutações, levando a estrutura e evoluir para um pólipo adenomatoso clássico. Comumente, como pólipos aumentam de tamanho, o grau de displasia se agrava simultaneamente (VOGELSTEIN et al, 1988; GREYSTOKE e MULLAMITHA, 2012; VARELA-REY et al, 2013; BRENNER et al, 2014).

É possível categorizar a etiologia do câncer colorretal em três principais padrões: esporádico, hereditário e familiar. Os casos esporádicos, cujo desenvolvimento está associado a um fenômeno chamado instabilidade cromossomal, ocorrem aproximadamente 70-75% das vezes e atingem pacientes sem história familiar. Usualmente, o CCR esporádico ocorre em pacientes acima de 50 anos de idade, sendo os hábitos alimentares e de estilo de vida, assim como os fatores ambientais, os fatores epidemiologicamente relacionados com a sua etiologia

(BURT et al, 1995; PEPPONE et al, 2009). Nos demais casos, cerca de 10 a 30%, o CCR apresenta um padrão familiar, no qual a presença de história familiar de tumores colorretais é um critério obrigatório, assim como a ausência de síndromes hereditárias. Neste caso, a presença de um familiar de primeiro grau com CCR aumenta o risco em 1,7 vezes (em relação à população geral), risco este que pode ser ainda maior se dois familiares de primeiro grau apresentarem CCR ou ainda se a sua idade for menor que 55 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Finalmente, o CCR hereditário, que ocorre em cerca de 5-10% dos pacientes, é classificado conforme a presença de polipose, esta podendo ser causada por polipose adenomatosa familiar (PAF), polipose associada ao MUTYH (MAP) e síndromes polipoides hamartomatosas (HALF e BRESALIER, 2004). Em contrapartida, as doenças que possuem alto risco de geração de tumores colorretais, porém sem polipose são chamadas de HNPCC (do inglês: *Hereditary Non-Poliposis Colon Cancer*) (LYNCH et al, 1999; LYNCH et al, 2003).

São três os principais mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese colorretal:

(1) **Instabilidade de microssatélites** (MSI, do inglês: *microsatellite instability*): Por definição, os microssatélites são sequências de DNA compostas de dois ou três nucleotídeos que se repetem em *tandem* e que passam de uma geração para outra de forma permanente e estável. Todavia, na presença de mutações genéticas e epigenéticas em genes da via de reparo de malpareamento (MMR, do inglês: *mismatch repair*), o número de repetições dos microssatélites se torna instável e heterogêneo. Este acontecimento de aumento ou redução da sequência do DNA está presente em 15-20% dos tumores colorretais através do silenciamento epigenético de MLH1 (LIU et al, 1995; DIETMAIER et al, 1997; LANZA et al, 2002; SINICROPE e SARGENT, 2012). Sua presença associa-se a tumores proximais, estágios

iniciais, alto grau de diferenciação celular e presença de infiltração linfocitária (SAMOWITZ et al, 2001; ROVER et al, 2004).

(2) **Instabilidade cromossômica** (CIN, do inglês: *chromosomal instability*): É também chamada de via adenoma-carcinoma clássica, sendo prevalente em 80-85% dos tumores colorretais. É caracterizada por um desequilíbrio no número de cromossomos (aneuploidias) e uma alta frequência de perda de heterozigosidade, determinada através de uma série de mutações nas vias supressoras tumorais incluindo as vias WNT, APC/B-catenina, RAS, P53 e PI3KCA. A perda de heterozigosidade em 18q, onde os genes Smad2, Smad4 e DCC estão localizados e a perda de alelos em 8p e 5q também estão correlacionadas com a presença de CIN. Tumores colorretais com CIN são associados à localização distal, bem ou moderadamente diferenciados e com pior prognóstico (LIPKIN et al, 2001; LYNCH et al, 2003; WALTHER et al, 2008; COLUSSI et al, 2013; DOMINGO et al, 2013).

(3) **Fenótipo metilador de ilhotas CpG** (CIMP, do inglês: *CpG island methylator phenotype*): Trata-se de um padrão de metilação em regiões promotoras de genes supressores tumorais ou de reparo do DNA, prevalente em até 20% dos tumores colorretais. Há depleção global da metilação da citosina, mas aquisição considerável de metilação aberrante dentro de das "ilhas CpG" (regiões do DNA maior do que 200 pares de bases, contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG). Esta aberrante metilação pode induzir o silenciamento epigenético de genes de como hMLH1 (da via MMR, do inglês: *mismatch repair*) e BRAF. Correlaciona-se com tumores proximais, mais prevalentes em indivíduos do sexo feminino e com mutações em BRAF (OGINO et al, 2007; NAZEMALHOSSEINI et al, 2013).

1.1.3 Diagnóstico, estadiamento e aspectos prognósticos

O colón é composto de quatro seções: cólon ascendente, transverso, descendente e sigmoide. A separação entre cólon e reto é somente anatômica. Embora a abordagem terapêutica para tumores localizados no cólon ou no reto difiram, a detecção e a avaliação do grau de evolução do tumor são similares.

O CCR apresenta-se clinicamente de forma inespecífica, ou seja, não raramente o paciente é diagnosticado diretamente através do rastreamento e não pela presença de sintomas. Entretanto, nos casos em que a doença está mais avançada, é possível que ela se manifeste com quadros de abdome agudo, acompanhado por náuseas e vômitos (causado por obstrução ou perfuração). Dentre os principais sintomas destacam-se: mudança do hábito intestinal, perda de peso sem causa aparente, sangramento intestinal e dor abdominal (SMITH et al, 2005).

De acordo com a Portaria Nº 601, de 26 de junho de 2012, do Ministério da Saúde, o diagnóstico de câncer de cólon é estabelecido através do exame histopatológico de espécime tumoral obtido durante o exame de colonoscopia ou após a ressecção cirúrgica, através do exame de peça cirúrgica. Por outro lado, em se tratando de câncer de reto, é imprescindível a realização de um exame proctológico. Pelo risco de tumores sincrônicos do cólon, a colonoscopia deve ser realizada sempre que possível antes do tratamento destes doentes.

A partir da biópsia ou da peça cirúrgica, é possível aplicar o sistema de estadiamento, o qual consiste em uma escala que irá analisar de forma anatomopatológica a extensão anatômica do tumor. Sua finalidade é a de identificar não somente a extensão locorregional da lesão primária, mas também a sua extensão à distância para a escolha da melhor opção de tratamento. Para tanto, a classificação TNM (Tabela 1), tumor-linfonodo-metástase, é a mais indicada, tendo sido elaborada pela AJCC (do inglês: *American Joint Committee)* e pela UICC (do inglês: *International Union Against Cancer*). Ela é composta por uma classificação clínica

pré-operatória e patológica pós-operatória: cTNM (classificação clínica) e pTNM (classificação patológica) (Tabela 2), e leva em consideração o tamanho do tumor (T), o envolvimento dos linfonodos (N) e a presença de metástases à distância (M) (COMPTON, 2012; HARI et al, 2013). A partir da classificação do estadiamento, pode-se proceder com a terapêutica mais adequada, para cada categoria.

Os tumores invasivos podem limitar-se à parede intestinal, sendo enquadrados nos estágios I e II, os quais apresentam elevada taxa curativa. Quando invadem os linfonodos regionais, torna-se estágio III e quando, metastatizam em locais distantes são classificados com estágio IV. Enquanto tumores classificados dentro dos estágios I e II são tratados através da ressecção cirúrgica, aqueles em estágio III, irão requerer, além da cirurgia, a complementação do tratamento com quimioterapia adjuvante. O estágio IV é, na maioria dos casos, incurável (MARKOWITZ et al, 2009).

Tabela 1: Classificação clínica dos carcinomas colorretais de acordo com a escala TNM. Adaptado de Classificação de tumores malignos. INCA, 2014.

T **Tumor Primário**	**TX** O tumor primário não pode ser avaliado **T0** Não há evidência de tumor primário **Tis** Carcinoma *in situ*: intra-epitelial ou invasão da lâmina própria **T1** Tumor que invade a submucosa **T2** Tumor que invade a muscular própria **T3** Tumor que invade além da muscular própria, alcançando a subserosa ou os tecidos peri-cólicos ou peri-retais, não peritonizados **T4** Tumor que invade diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou que perfura o peritônio visceral
N **Linfonodos Regionais**	**NX** Os linfonodos regionais não podem ser avaliados **N0** Ausência de metástase em linfonodos regionais **N1** Metástase em 1 a 3 linfonodos regionais **N2** Metástase em 4 ou mais linfonodos regionais
M **Metástases à Distância**	**MX** A presença de metástase à distância não pode ser avaliada **M0** Ausência de metástase à distância **M1** Metástase à distância

Além do estadiamento, a avaliação histopatológica proverá informações sobre os graus de diferenciação celular e a presença de invasão linfática e/ou perineural, características que atualmente norteiam o prognóstico do CCR (LONGATTO-FILHO et al, 2007; ZLOBEC et al, 2008;). Da mesma forma, o grau de diferenciação celular também pode ser categorizado em graus para a determinação do prognóstico e delineamento do tratamento (NAMM et al, 2008).

Tabela 2: Classificação histopatológica do CCR. Adaptado de Classificação de tumores malignos. INCA, 2014

GX	O grau de diferenciação não pode ser avaliado
GI	Bem diferenciado
GII	Moderadamente diferenciado
GIII	Pouco diferenciado
GIV	Indiferenciado

Mesmo sendo utilizado rotineiramente para delineamento do tratamento do CCR, o estadiamento pode ser considerado um ponto frágil na sua abordagem, visto que a complexidade molecular resultante do amplo espectro de alterações genéticas e epigenéticas faz do CCR um tipo altamente heterogêneo de câncer. Um exemplo que demonstra a limitação do uso desta escala é o fato de que cerca de 20-40% dos pacientes ainda em estágio II, considerado não grave, irão apresentar piora do quadro clínico com desfechos letais (recidiva e metástase) em até 5 anos (BIAGI et al, 2011). Outra deficiência deste sistema é a limitação à personalização do tratamento, já que os critérios da escala TNM são muito amplos (O'CONNELL et al, 2008). Outro exemplo que demonstra a necessidade de biomarcadores específicos é, apesar dos significantes avanços no diagnóstico e no tratamento do CCR, a inalteração da mortalidade nos últimos 20 anos, refletindo a limitada vantagem concedida pelos avanços no tratamento adjuvante (AGHILI et al, 2010).

Um fator prognóstico é uma característica (clínica ou histológica) ou ainda um

marcador que pode racionalizar a predição sobre a evolução de doença. É, ainda, uma ferramenta que fornece informações sobre os desfechos de uma doença e pode ser usado para guiar decisões terapêuticas. A identificação de fatores com forte significado prognóstico é de grande benefício para orientar o uso de quimioterapia adjuvante, particularmente para a doença de fase precoce. Resultados clínicos como sobrevida global, sobrevida livre de doença e tempo para progressão da doença são os mais utilizados em estudos oncológicos, especialmente para determinação da efetividade ou superioridade de uma nova droga ou novas combinações (CLARK, 2008). O prognóstico do CCR atualmente é determinado por aspectos clínicos e patológicos, como tamanho do tumor, localização da lesão primária, invasividade, presença de linfonodos metastáticos e/ou metástases à distância, grau de diferenciação celular, presença de invasões linfática e perineural, entre outros. Apesar de numerosos, estes fatores ainda dividem opiniões (COMPTON, 2006) (Tabela 3).

Tabela 3: Fatores prognósticos e sua significância clínica no câncer colorretal.

Fator Prognóstico	Significância Prognóstica	Referências
Localização da lesão primária	O câncer de reto é considerado de pior prognóstico em relação ao de cólon, provavelmente porque os tumores de reto são cirurgicamente mais complexos tanto no acesso como na obtenção de margens mais amplas e confiáveis.	WEITZ et al, 2005; ANDEREGGEN et al, 2006; MEGUID et al, 2008; JAFARABADI et al, 2014
Tamanho do tumor	A maioria dos estudos não traz significância prognóstica. O tamanho do maior eixo do tumor geralmente é registrado para fins de documentação do caso e para comparação com os exames de imagem.	COMPTON, 2000; FARHOUD et al, 2002; LEE et al, 2007; MATSUDA et al, 2009
Grau de invasividade	O grau de penetração na parede intestinal é classicamente associado a ocorrência de metástases linfáticas e, portanto, pior prognóstico.	WEITZ et al, 2005; WONG et al, 2008
Linfonodos metastáticos	É um indicador de prognóstico desfavorável e um dos critérios para a seleção do tratamento dos carcinomas colorretais.	STACKER et al, 2000; LE VOYER et al, 2003; CHANG et al, 2007; FAN et al, 2011

Invasão linfática e perineural	São consideradas fatores adversos independentes no prognóstico, pois associam-se a maior profundidade de infiltração tumoral, presença de metástase linfonodal e desenvolvimento de metástase hepática. Diversos trabalhos mostraram através de análises multivariadas que tanto a invasão perineural como a linfática por si só já são um indicador de mau prognóstico.	COMPTON et al, 2000; ZLOBEC et al, 2008; LONGATTO-FILHO et al, 2008; YANG et al, 2015; KNIJIN et al, 2016
Invasão vascular	Pacientes que apresentaram maior profundidade na invasão vascular, especialmente venosa, também apresentaram prognósticos desfavoráveis, através da redução da sobrevida global e da presença de metástases hepáticas e recidivas.	ISHIBASHI et al, 2007; DERWING et al, 2008; SHEN et al, 2009; LEGOLVAN et al, 2010
Grau de diferenciação celular	Relaciona-se à presença de invasão linfática, à profundidade da invasão tumoral na parede intestinal, à fixação a estruturas adjacentes e à chance de metástase linfonodal.	DERWING et al, 2008; MAGUIRE e SHEAHAN et al, 2014
Mucina	Pode ser um fator prognóstico adverso, mas ainda apresenta muitas controvérsias. Associa-se com pior prognóstico somente se localizado no retossigmóide, ou se ocorrer em pacientes com menos de 45 anos. Aumenta em 2-8% o risco de morte, que persiste mesmo após a correção para o estágio.	PEREZ et al, 2008; VERHULST et al, 2012
Infiltrado linfocitário tumoral	Atua como um fator prognóstico favorável, pois relaciona-se à presença de instabilidade microssatélite do DNA.	KLOOR, 2009; FRIDMAN et al, 2011; MAGUIRE e SHEAHAN et al, 2014

1.1.4 Tratamento

O tratamento de pacientes com CCR inicia-se por avaliação de equipe multidisciplinar. A seleção do tratamento deverá ser adequada ao estadiamento clínico e patológico da doença, capacidade funcional e preferências do paciente. As abordagens terapêuticas irão diferir, principalmente, de acordo com a localização da lesão primária. Em linhas gerais, o tratamento consistirá na ressecção cirúrgica por via aberta do tumor primário e dos linfonodos regionais e quimioterapia/radioterapia – em regimes adjuvantes (realizada posteriormente ao tratamento

principal, que pode ser cirúrgico ou radioterápico) e neoadjuvante (administrada previamente ao tratamento principal) (JASS et al, 2007; BRASIL et al, 2011).

Aconselha-se o início do tratamento adjuvante entre 4-6 semanas após à cirurgia (BRASIL, 2011), visto que a cada 4 semanas de atraso, há uma redução da sobrevida global em 14% (BIAGI et al, 2011). Já a quimioterapia com ou sem radioterapia neoadjuvante é indicada sobretudo para pacientes com câncer de reto a partir do estágio II. Em casos de CCR recidivado e inoperável ou com doença em estágio IV, indica-se a quimioterapia paliativa com esquemas combinados complexos que podem incluir 5-fluoruracil (5-FU), oxaliplatina, irinotecano, mitomicina C, bevacizumabe, cetuximabe ou panitumumabe (BRASIL, 2011).

Os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de CRC induzem diferentes tipos de danos, tanto ao DNA como ao metabolismo celular. Os principais quimioterápicos utilizados são: 5-FU, capecitabina e oxaliplatina. O 5-FU é considerado, desde os anos 60, o pilar de todos os esquemas quimioterápicos combinados utilizados no tratamento do CCR. Trata-se de um análogo da pirimidina, cuja principal função consiste em inibir a atividade da enzima timidilato sintase, embora possa também ser incorporado ao DNA, levando à inibição da sua síntese e à formação de quebras simples e duplas na sua estrutura (MATUO et al, 2010). Regimes contendo 5-FU reduzem a taxa de recidiva em 17% e aumentam a sobrevida global em torno de 15% (GILL et al, 2004; TWELVES et al, 2012).

A oxaliplatina, por sua vez, utilizada juntamente com o 5-FU e a leucovorina no esquema denominado FOLFOX, é um agente platinado que forma ligações intra- e intercadeia com o DNA que, também irão induzir quebras simples e duplas (FAIVRE et al, 2003). A adição de oxaliplatina aumenta a sobrevida livre de doença em 5 anos de 6,2 a 7,5% e a sobrevida global de 2,7 a 4,2%, em pacientes com estágio III de câncer de colón. (ANDRÉ et al, 2009; CASSIDY et al, 2011). A oxaliplatina faz parte, ainda, do esquema denominado FOLFIRI – utilizado no CCR metastático-, juntamente com 5-FU, e irinotecano. Este, por sua vez é um

análogo sintético da camptotecina, o qual atua como inibidor topoisomerase I, impedindo a replicação e a transcrição do DNA (ZHUANG et al, 2010).

Mais recentemente, especialmente em se tratando da abordagem do CCR metastático, grandes avanços têm sido alcançados. Podemos apontar três classes principais de drogas que estão sendo adicionadas aos esquemas clássicos de tratamento do CCR: (1) inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (bevacizumabe e aflibercept); (2) anticorpos monoclonais, que inibem o receptor do fator de crescimento epidérmico (cetuximabe e panitumumabe), utilizados em pacientes que não possuem tumores com mutações no gene de RAS; (3) inibidores de quinases (regorafenib). Os dados mais robustos sobre sobrevida livre de doença tratam de pacientes com CCR metastático, os quais beneficiam-se com um aumento da sobrevida global em 5 anos em 30% (COIMBRA et al, 2011).

1.1.5 Biomarcadores

O marcador molecular ideal deve apresentar alta sensibilidade e especificidade; ser seguro e financeiramente acessível; fácil de medir; e consistentemente detectado independentemente do gênero ou do grupo étnico (KUMAR, 2009; TANAKA et al, 2010). Desde que Feron e Vogelstein (1990) formularam um modelo sequencial de eventos moleculares envolvendo oncogenes e supressores tumorais, tem havido avanços consideráveis no entendimento da carcinogênese colorretal.

Atualmente, o marcador mais utilizado para o CCR é o antígeno carcinoembriogênico (CEA, do inglês: *Carcinoembryonic Antigen*). Trata-se de uma glicoproteína cuja concentração aumenta quando produzida por tumores de vísceras ocas. Este marcador, porém, apresenta relativa baixa especificidade (36%) e 87% de sensibilidade. Valores acima de 5 μg/l são

considerados elevados e indicativos de presença de lesão tumoral. Além disto, o aumento da sua concentração está associado ao grau de desenvolvimento tumoral (ZHENG et al, 2001; SWIDERSKA et al, 2014).

Os progressos na biologia molecular nas últimas três décadas ajudaram a elucidar alguns dos mecanismos genéticos que levam à carcinogênese colorretal. Este processo resulta em tumores geneticamente heterogêneos, o que é necessário que se leve em conta quando se desenvolve um novo método diagnóstico molecular, uma vez que ele deverá refletir, na verdade, as características de um conjunto de células bastante variado. De qualquer forma, os avanços no entendimento deste processo oferecem a oportunidade de identificar marcadores moleculares além daqueles para diagnóstico precoce, ou seja, aqueles que também permitam a seleção de estratégias terapêuticas personalizadas e, ainda, outros que refinem o prognóstico do câncer colorretal, com real potencial de melhorar os desfechos desta doença.

Embora alguns dos testes de rastreamento do CCR disponíveis tenham se provado efetivos na redução da incidência e da mortalidade, um teste altamente específico e não-invasivo ainda não foi descoberto. A *American Cancer Society* recomenda uma série de testes de *screening* que vão de semi-invasivos (colonoscopia) à não-invasivos (exames de fezes) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Porém, a combinação de ausência de sintomas, métodos endoscópicos semi-invasivos e a acurácia questionável dos exames de fezes resulta em diagnósticos tardios em um número significativo de indivíduos (GONZALEZ-PONS e CRUZ-CORREA, 2015). Os testes moleculares são esperados serem mais sensíveis e específicos dos que os métodos atuais. Por isto, inúmeros estudos para a identificação de marcadores moleculares (DNA, RNA ou proteína) em tumores, sangue ou fezes estão recebendo muitos esforços.

Atualmente, os marcadores moleculares utilizados para avalição dos tumores colorretais incluem a instabilidade de microssatélites e a análise de mutações em BRAF e

KRAS. Mais recentemente, análises de CIMP, expressão variada de RNA mensageiros, miroRNA e componentes da via EGRF (do inglês: *epidermal growth fator receptor*) fazem parte de uma classe inovadora de marcadores em tumores colorretais.

(1) **Instabilidade de Microssatélites**: mutações genéticas e epigenéticas em genes da via de reparo de malpareamento (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) resultam em alterações em sequências de alta repetição. Um painel com 5 marcadores mononucleotídeo (Bat-25, Bat26, NR-21, NR-24 e MONO-27) é atualmente usado pela maioria dos laboratórios clínicos para detectar a presença de MSI. Muitas evidências sugerem que o uso da MSI nos tumores colorretais esporádicos possa ser uma importante ferramenta diagnóstica e preditiva da resposta ao tratamento. Isto por que a presença de MSI está ligada a melhores desfechos clínicos, como ausência de linfonodos metastáticos e metástases à distância (GRYFE et al, 2000; POPAT et al, 2005). Além disto, outras evidências sugerem que a MSI prediz a resposta ao tratamento com 5-FU, mostrando que, neste caso, os pacientes não seriam beneficiados (BENATTI et al, 2005; GUASTADISEGNTI et al, 2010). Porém, o uso da MSI como marcador prognóstico ainda não foi implantado na prática clínica.

(2) **Mutações nos genes KRAS e NRAS**: O proto-oncogene KRAS codifica uma pequena proteína G (proteína ligante guanosina trifosfato/guanosina difosfato) *downstream* das vias sinalizadoras PI3K/PTEN/AKT e RAF/MEK/ERK. A detecção das mutações em KRAS é atualmente o marcador preditivo mais utilizado para a resposta às terapias baseadas em anticorpos, como ao anti-EGFR, cetuximabe e panitumumabe (CUNNINGHAM et al, 2004). Entretanto, estudos recentes reportaram evidências interessantes de que em adição ao KRAS, as mutações em NRAS (do inglês: *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) predizem a presença de respostas refratárias às terapias anti-EGFR (DOUILLARD et al, 2010; ROOCK et

al, 2013). Estes estudos suportam o uso da análise mutacional de KRAS e NRAS como preditores negativos para a terapia anti-EGFR no CCR metastático (APRILE et al, 2013). Aproximadamente 60-70% dos pacientes com CCR metastático e KRAS selvagem apresentam uma resposta limitada às terapias anti-EGFR, inclusive já sendo um teste recomendado por algumas agências internacionais antes de iniciar esta terapia (ALLEGRA et al, 2009). Todavia, ainda não foi estabelecido claramente se o pior prognóstico associado às mutações em KRAS são independentes do regime quimioterápico utilizado.

(3) **Mutações no gene BRAF:** BRAF é um gene da família das serina/treonina quinases RAF, e o seu produto proteico atua como o efetor *downstream* imediato de KRAS na via Ras/Raf/MAPK. Mutações em BRAF foram associadas com o desenvolvimento do CCR e estão presentes em 30-40% dos casos de CCR esporádicos com alta MSI (DAVIES et al, 2002). A mutação mais observada é a sem sentido que resulta na alteração de uma valina por ácido glutâmico (V600E) (IKENOUE et al, 2003). As mutações em KRAS e BRAF são geralmente encontradas simultaneamente nos tumores colorretais (FRASÉN et al, 2004). Estudos recentes sugerem que as mutações em BRAF também possam ser utilizadas como marcadores preditivos de resposta às terapias anti-EGFR (VAN CUTSEM et al, 2009; ROOCK et al, 2011). As mutações em BRAF são associadas a um pior prognóstico, porém ainda não se sabe se isto é independente do tratamento.

(4) **CIMP:** Tumores colorretais com CIMP elevado são mais prevalentes em mulheres e são associados com mutações em BRAF. Estes tumores apresentam características distintas, que incluem localização proximal, pouca diferenciação celular, histologia mucinosa, MSI e baixa frequência de mutações em TP53 (ISSA, 2008). Atualmente não existe um consenso sobre o

painel de marcadores de metilação para definir a presença de CIMP, bem como sobre a técnica que deve ser utilizada.

(6) **microRNAs:** miRNAs são associados com a transição epitélio-mesenquimal durante o processo carcinogênico. Estes miRNAs podem agir como marcadores prognósticos do CCR. Em um estudo clínico de fase 3, Toiyama e colaboradores (2014) selecionaram miRNAs associados com metástases através da análise de quatro membros da família miR-200 no soro de 12 pacientes em todos os estágios do CCR. Os miRNAs candidatos foram validados em 182 pacientes com CCR e 24 controles. Por fim, a expressão destes miRNAs também foi avaliada em 156 tumores e tecidos saudáveis pareados e em um outro grupo de CCR e suas correspondentes metástases hepáticas, para se identificar a origem destes miRNAs. miR-200c foi encontrado em maiores níveis nas metástases hepáticas do que nos tumores primários. Este foi considerado o principal marcador para metástase, com seus níveis de expressão significativamente maiores em CCR de estágios mais avançados. Ainda, miR-200c foi considerado um marcador independente para linfonodos metastáticos e recorrência. Diversos outros miRNAs também foram descritos como potenciais biomarcadores prognósticos do CCR, como miR-214, miR-182, miR-124, mas ainda necessitando mais estudos para a sua validação na prática clínica (LIU et al, 2013; WANG et al, 2013; CHEN et al, 2014).

(7) **Via EGFR**: No CCR em estágios II e III, o esquema FOLFOX ou XELOX são consideradas padrão (LABIANCA et al, 2013), enquanto para o CCR metastático, FOLFOX ou FOLFIRI são os esquemas de primeira escolha (DE GRAMONT et al, 2000; GROTHEY et al, 2004). Com o maior entendimento da carcinogênese colorretal, terapias monoclonais como os bloqueadores de EGFR (cetuximabe e panitumumabe) foram adicionados ao tratamento do CCR, atuando através do bloqueio da ativação da transdução de sinal nas vias que envolvem

RAS e PI3K-AKT (AMADO et al, 2008). A efetividade destas terapias monoclonais foi confirmada em estudos clínicos de fase II e III. Todavia, análises de subgrupos demonstraram que pacientes com mutações em KRAS no éxon 2, códons 12 ou13, não respondem a este tipo de tratamento. O status desta mutação, então, deveria ser determinado antes do tratamento com anti-EGRF (LIEVRE et al, 2008; AMADO et al, 2008; ALLEGRA et al, 2009). Mutações em NRAS foram encontradas em 2,6% das amostras, a maioria no códon 61. Estes tumores tiveram uma resposta significativamente menor ao cetuximabe (TEJPAR et al, 2014; VAN CUTSEM et al, 2015).

1.2 SISTEMAS DE REPARO DO DNA

Durante o tempo necessário para ler esta frase, estima-se que o DNA do leitor irá sofrer cerca de 10 trilhões de lesões (LINDHAL et al, 2000; NAGEL et al, 2014). O número preciso e o tipo de lesões formadas variam entre os indivíduos, de acordo com as diferenças na exposição e ao estilo de vida, assim como com o metabolismo individual e outros processos celulares. Lesões específicas ao DNA podem induzir mutações que causem outras doenças além do câncer, assim como contribuem para o processo de envelhecimento. Diante deste quadro, as células desenvolveram uma rede de mecanismos para remover diferentes tipos de danos que o DNA venha a sofrer, sejam eles causados por agentes externos ou mesmo por intermediários do próprio metabolismo celular. Independentemente do tipo de lesão e do mecanismo à disposição para removê-lo, as células iniciam um processo em cascata altamente coordenado – coletivamente conhecido como DDR (do inglês: *DNA Damage Response*) -, o qual reconhece o dano ao DNA, sinaliza a sua presença e medeia seu reparo. Por exemplo, a DDR pode transitoriamente parar o ciclo celular para permitir um reparo eficiente da lesão antes da replicação ou da mitose (ZHOU e ELLEDGE, 2000; HOEIJMAKERS, 2009; MENCK e MUNFORD, 2014), ou sinalizar às células para que ativem a apoptose quando sob circunstâncias de persistência ou irreparabilidade do dano (RICH et al, 2000; FRIEDBERG et al, 2006).

O reparo dos danos ao DNA constitui um importante enfoque de estudo, visto que a sua perpetuação em células tumorais faz parte do conjunto de eventos que determina a evolução do câncer, bem como sua resposta ao tratamento (ROOS et al, 2016). De modo geral, as vias de reparo de DNA podem atuar através da reversão direta do dano no DNA ou através da excisão completa dessa lesão (Figura 4). Didaticamente, estas vias estão divididas em: reparo de malpareamento (MMR, do inglês: *Mismatch Repair*), reparo por excisão de bases (BER, do

inglês: *Base Excision Repair*) e nucleotídeos (NER, do inglês: *Nucleotide Excision Repair*), reparo por recombinação homóloga (HR, do inglês: *Homologous Recombination*) e junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês: *Non-Homologous End Joining*), além da via translesão ou mutagênica (TLS, do inglês: *Translesion Synthesis*). Embora estas vias sejam apresentadas de forma individualizada, cada vez mais evidências apontam para o *crosstalk* e a sobreposição entre elas no processamento de lesões ao DNA (FU et al, 2012; MALAQUIN et al, 2015; HAYNES et al, 2016; MICHL et al, 2016; SIMONELLI et al, 2016).

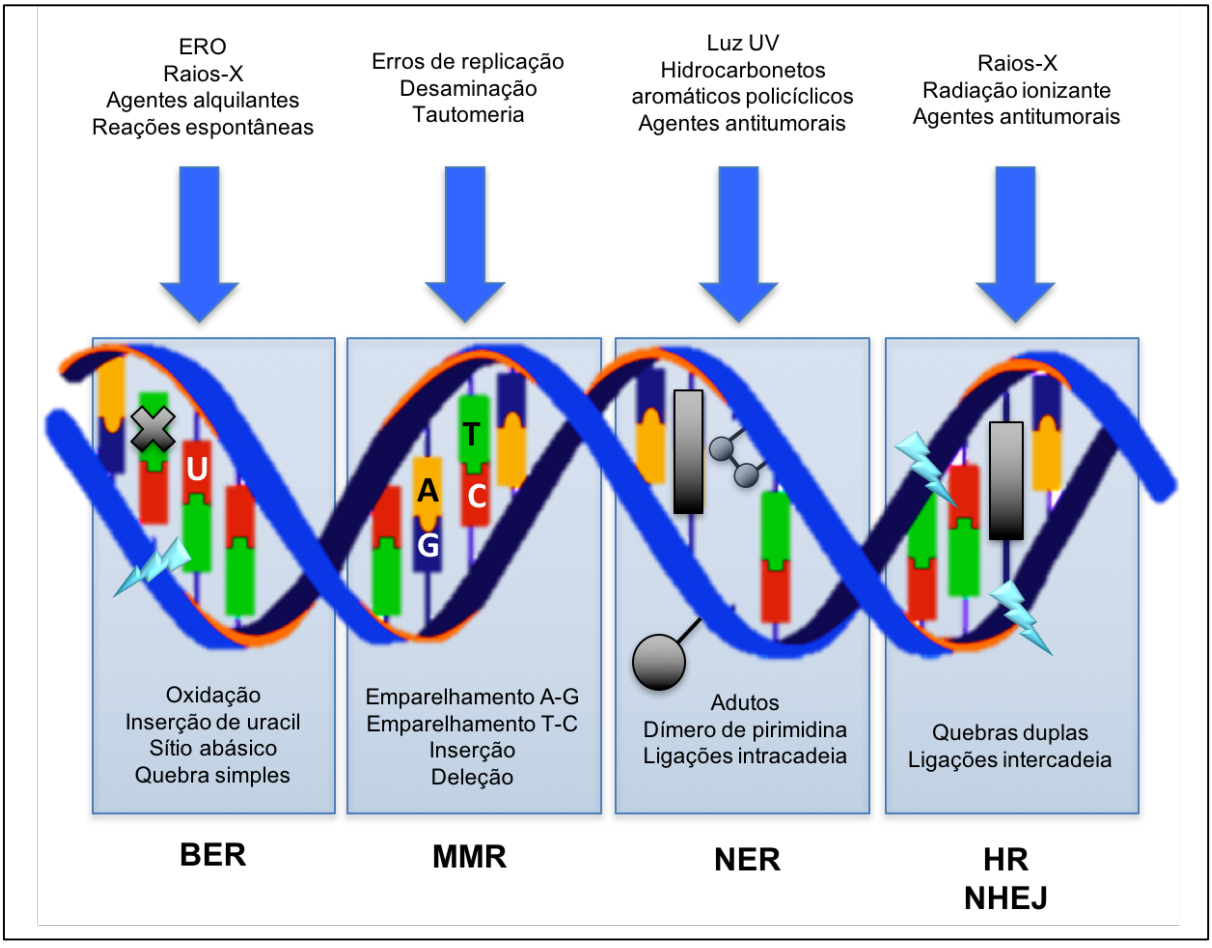


Figura 4: Esquema ilustrativo dos principais agentes endógenos e exógenos com potencial de danificar o DNA, exemplos das lesões causadas e vias diretamente envolvidas com o seu reparo (Adaptado de Hoeijimakers et al, 2001 e Iyama e Wilson III, 2014).

Como um prelúdio ao reparo do DNA danificado, é preciso primeiramente levar em consideração o conjunto dos tipos de danos. O DNA, assim como outras moléculas, está sujeito a reações químicas, sejam elas desencadeadas tanto pela ação de agentes intrínsecos como extrínsecos. A forma mais simples de dano ao DNA é a hidrólise espontânea (LINDHAL, 1993). A ponte N-glicosídica entre a base do DNA e a desoxirribose é particularmente sujeita à hidrólise catalisada por ácidos. Estima-se que cerca de 10 mil sítios abásicos (ou sítios AP, de apurínicos ou apirimidínicos) - que são produtos da perda hidrolítica de nucleotídeos ou mesmo da execução normal da via BER - ocorram por célula por dia (LINDHAL, 1993). Outra reação comum envolvendo hidrólise é a desaminação das bases do DNA que possuem grupos amino exocíclicos, como as lesões na formação da uracila oriunda da citosina, que ocorre numa taxa estimada de 100-500 vezes por célula por dia (KROKAN et al, 2002; YONEKURA et al, 2009). Adenina e guanina também podem, espontaneamente, desaminar para formas hipoxantina e xantina, respectivamente, embora em uma taxa muito mais baixa (KOW, 2002).

O DNA está também suscetível às modificações químicas por moléculas reativas que são criadas durante o metabolismo celular normal. Entre estas, as mais importantes são as espécies reativas do oxigênio (ERO), que incluem $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 e $OH^{\cdot}$ (MARNET, 2000; APEL et al, 2004; SEDELNIKOVA et al, 2010). As ERO geram cerca de uma centena de diferentes adutos oxidativos ao DNA, como modificações de bases, oxidação da desoxirribose, quebras duplas ou simples e ligações DNA-proteína (STORR et al, 2013). Espécies reativas de nitrogênio endógenas, majoritariamente óxido nítrico e seus produtos, podem também produzir adutos similares (WANG et al, 2008) A lesão oxidativa ao DNA mais estudada é a 8-oxoguanina, a qual é rotineiramente usada como medida analítica do dano oxidativo ao DNA em sistemas biológicos (RAVANAT, 2005). Adicionalmente, outro tipo de moléculas endógenas reativas que danificam o DNA são aquelas oriundas dos processos de alquilação. Os candidatos putativos dos agentes alquilantes incluem os doadores endógenos de metil, como

a S-adenosilmetionina (SAM), aminas nitrosadas e radicais metil gerados pela lipoperoxidação (DE BONT et al, 2004). Os sítios primários de alquilação são os átomos de O e N das núcleobases.

O dano genômico endógeno pode também surgir durante erros inevitáveis resultantes de reações fisiológicas de processamento do DNA. Citam-se por exemplo os malpareamentos, assim como as inserções e deleções, que são ocasionalmente introduzidas como resultado da incorporação errônea pelas polimerases replicativas (MCCULLOTH et al, 2008; RAYNER et al, 2016). Ao mesmo tempo, a incorporação errônea de precursores de nucleotídeos quimicamente alterados, como a 8-oxo-dGTP e dUTP, também representam uma fonte significativa de danos ao DNA relacionados à replicação. Além disto, o processo de reparo do DNA por si só às vezes pode também ser sujeito a erro e introduzir erros adicionais ao DNA (BRIDGES, 2005; MCCULLOTH et al, 2008).

Além de todas estas fontes endógenas de danos ao DNA, esta molécula está também sob constante ataque de agentes exógenos e ambientais que a danifique. Estes incluem o estresse físico, como a luz ultravioleta (UV), que primariamente causa dois tipos de lesões ao DNA, os dímeros de pirimidina e os 6-4 fotoprodutos, ambos consistindo de ligações covalente atípicas entre pirimidinas adjacentes (RAVANAT et al, 2001; FRIEDBERG, 2006). Outra fonte externa de dano ao DNA é a radiação ionizante, que pode tanto ter origem natural (radiação cósmica e gama) como artificial (raios-X e radioterapia). A radiação ionizante induz uma grande variedade de lesões ao DNA, sendo as mais tóxicas aquelas que resultam em quebras duplas (FRIEDBERG, 2006; KOBAYASHI et al, 2008).

Finalmente, o DNA celular pode ser danificado por agentes químicos como, como os agentes quimioterapêuticos. Nestes, incluem-se os agentes alquilantes, como metil-metanossulfonato (MMS) e a temozolomida (TMZ), que induzem alquilações às bases do DNA, assim como os agentes alquilantes bifuncionais ou seus mimetizadores, como as

mostardas nitrogenadas e os compostos platinados, respectivamente, e a mitomicina C, que causa ligações intra e intercadeia no DNA (NOLL et al, 2006; IRIGARAY et al, 2010). Os agentes quimioterapêuticos como os inibidores de topoisomerase I e II (camptotecina ou etoposido, respectivamente) geram quebras simples ou duplas através do sequestro ou inibição covalente das respectivas topoisomerases. Outros agentes incluem as N-nitrosaminas, aminas heterocíclicas e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os quais são comumente encontrados na dieta, sendo o último também produzido em emissões gasosas como fumaça de cigarro e exaustão veicular, e ligam-se covalentemente a vários sítios do DNA formando adutos volumosos (HENKLER et al, 2012).

1.2.1 Reparo direto

O reparo direto é assim denominado por atuar através de uma única enzima e durante um único passo, promovendo a remoção da lesão no DNA, conhecida como base alquilada (KAINA et al, 2007). Estes adutos são tóxicos para as células, e estão ligados tanto a processos mutagênicos como à indução da apoptose. Podemos exemplificar três principais enzimas que atuam nesta via, de acordo com o tipo de lesão encontrada: (1) fotorreversão de CPDs (do inglês: *Cyclobutane Pyrimidine Dimers*) e 6-4 fotoprodutos pelas DNA fotoliases após a absorção de fótons de luz azul; (2) remoção de bases danificadas por agentes alquilantes pela família de enzimas AlkB; e (3) remoção de grupos O^6-metil de O^6-metilguanina (O6MeG) pela enzima metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) (NAY e CONNOR, 2013).

O gene MGMT (10q26) codifica uma enzima de reparo com o mesmo nome que é responsável por remover adutos de metil de O^6-guanina. A enzima MGMT é responsável pelo reparo direto das lesões através da transferência do grupo alquil do oxigênio da base danificada para um resíduo de cisteína no grupo catalítico da MGMT, restaurando a base nitrogenada e

inativando a enzima, a qual será degradada pelo sistema ubiquitina-proteossomo (XU-WELLIVER e PEGG, 2002; ALTIERI et al, 2008).

A transcrição do gene MGMT é regulada por mecanismos epigenéticos. A metilação nos nucleotídeos CpG na região do promotor resulta em silenciamento gênico, perda de expressão e inabilidade de remoção dos grupos alquil da guanina (BAYLIN e OHM, 2006). Quando o grupo metil não é removido, O^6-methilguanina acaba sendo reconhecida como adenina, tornando-se incapaz de parear com a timina durante a replicação do DNA. A consequência é a formação de um polimorfismo de nucleotídeo simples do tipo transição (SVRCEK et al, 2010).

Enquanto protege as células normais da carcinogênese, a atividade de MGMT também protege as células tumorais dos efeitos letais da quimioterapia com agentes alquilantes, como a TMZ, amplamente utilizada para o tratamento de melanoma e glioblastoma. No glioblastoma, de fato, a metilação de MGMT foi identificada como um fator prognóstico relevante e um fator preditivo independente do benefício do tratamento com TMZ (HEGI et al, 2005; REIFENBERGER et al, 2012).

1.2.2 Reparo de malpareamento (MMR)

O sistema MMR, reparo de malpareamento ou reparo de emparelhamento errôneo, possui um papel essencial no reparo pós-replicativo dos *loops* de inserções e deleções ou, ainda, incorporações errôneas de nucleotídeos que escaparam da atividade de revisão das polimerases replicativas. O MMR é uma via altamente conservada ao longo da evolução, de *E.coli* a humanos. A sua significância é corroborada pelo fato de que células deficientes em MMR apresentam fenótipos com elevado grau mutagênico, que é caracterizado invariavelmente pela presença de instabilidade de microssatélites. Mais importante ainda é o fato de que mutações

em genes do MMR em células germinativas são predispostas a uma variedade de neoplasias, incluindo o câncer colorretal hereditário não-polipoide, também conhecido como síndrome de Lynch e outros tumores hereditários e esporádicos. (LI, 2008; FUKUI, 2010). O papel principal desta via, portanto, é a retificação dos erros de inserção e deleção durante a replicação do DNA e a garantia da fidelidade da informação genética durante a recombinação ou, ainda, participando do mecanismo que desencadeia a apoptose em células cujo DNA esteja danificado (DA SILVA et al.; 2009).

O MMR canônico é composto por dois complexos proteicos: (1) MutS, que incluem MSH2 (do inglês: *MutS homolog 2*), MSH3 (*do inglês: MutS homolog 3*) e MSH6 (do inglês: *MutS homolog 6*); (2) MutL, que engloba MLH1 (do inglês: *MutL homolog 1*), PMS1 (*do inglês: Post Meiotic Segregation Increased 1*), PMS2 (do inglês: *Post Meiotic Segregation Increased 2*) e MLH3 (do inglês: *MutL homolog 3*). Para o funcionamento do sistema MMR é necessário que o complexo proteico MutL se ligue a MutS-α (MSH2 e MSH6) ou MutS-β (MSH2 e MSH3). O MMR pode ser dividido em três principais etapas (Figura 5): (1) reconhecimento da base malpareada, feito pelos heterodímeros de MutS, MutSα (MSH2-MSH6) ou MutS (MSH2-MSH3); MutSα geralmente reconhece emparelhamentos errôneos e deleções/inserções pequenas (até 2 nucleotídeos), enquanto MutS reconhece principalmente bolhas formadas por deleções/inserções maiores; (2) excisão da porção da fita contendo o erro (o que gera uma lacuna), a qual é feita pelo heterodímero MutLα (principalmente MLH1-PMS1), com a participação das proteínas PCNA (do inglês: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e RFC (do inglês: *Replication Factor C*). O flap resultante da incisão é removido pela ação das enzimas RPA e Exo1; a DNA polimerase é responsável pela ressíntese do DNA com base na fita molde; (3) e religação da extremidade recém-sintetizada e da fita original, feita por uma DNA ligase (HSIEH e YAMANE, 2008).

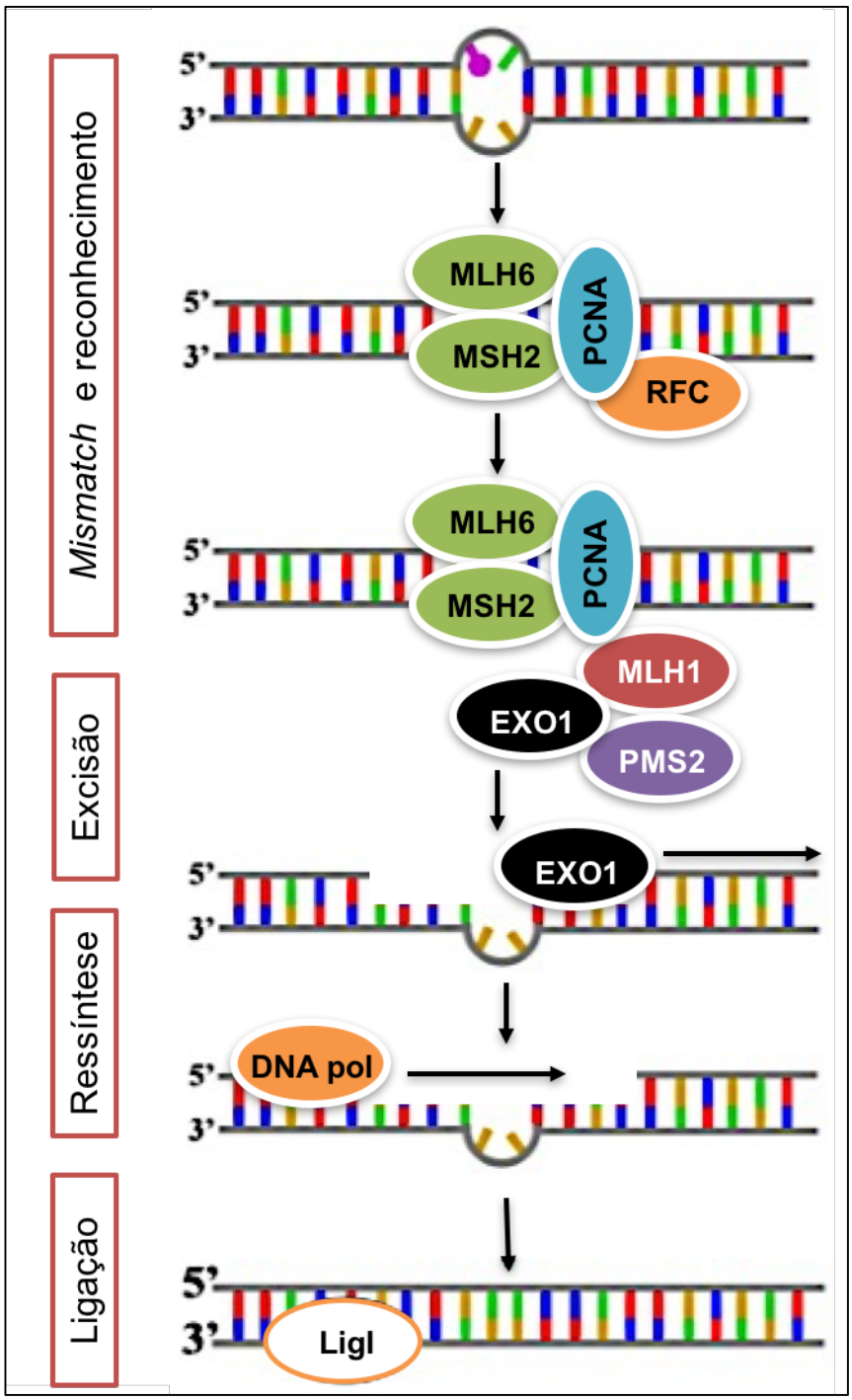


Figura 5: Representação esquemática das proteínas envolvidas em cada fase do processamento de um malpareamento, desde o seu reconhecimento até a religação do fragmento recém-sintetizado à fita original (Adaptado de Helledey et al, 2014).

A relevância clínica de disfunções nesta via paira sobre a Síndrome de Lynch, a qual é determinada por mutação germinativa nos genes hMSH2 e o hMLH1 em cerca de 90% dos casos. Os restantes 10% são causados, na quase totalidade, por alterações nos genes MSH6 e PMS2 (LYNCH et al, 1998; UMAR et al, 2004). A síndrome de Lynch, ou HNPCC, é uma é uma doença autossômica dominante, cujos indivíduos afetados podem desenvolver adenomas colônico com maior frequência do que a população geral, e a penetrância ao longo da vida para o desenvolvimento do câncer colorretal é de 50 a 80% (STOFFEL et al, 2009). A perda de função de algum destes genes implica em inativação parcial ou total da via de MMR e à formação de microssatélites, resultando em instabilidade genômica. Todavia, esta não é uma característica exclusiva desta modalidade de CCR hereditário: através do silenciamento epigenético (especialmente de MLH1), a MSI também é encontrada em aproximadamente 15% dos tumores colorretais esporádicos (VOGELSTEIN et al, 1988; BOLAND e GOEL, 2010).

1.2.3 Reparo por excisão de bases (BER)

A via do BER foi por anos a menos estudada das vias de reparo do DNA, principalmente se compararmos com a quantidade de dados disponíveis sobre MMR e NER, possivelmente pela ausência de síndromes humana causadas pela disfunção ou ausência completa de componentes desta via. O reparo por excisão de bases, como seu nome já diz, é o principal mecanismo atuante no reparo de bases danificadas que, em contraste com as lesões (como os dímeros de pirimidina e os fotoprodutos) reparadas através da excisão de nucleotídeos, não distorcem de forma significativa a estrutura do DNA (ZARDHOV, 2008). As lesões resultantes de oxidação, alquilação, desaminação e sítios AP culminam na incorporação de uma base incorreta pelas DNA ou polimerases, levando à formação de mutações durante os processos de

replicação e transcrição que, embora não comprometam a estrutura física do DNA, induzem paradas ou mesmo interrupções completas na replicação e transcrição, mecanismos associados à apoptose, senescência e, obviamente, mutagênese (PARSONS e DIANOV, 2013; DIANOV e HÜBSCHER, 2013). De uma maneira geral, o BER atua através do reconhecimento da lesão por uma DNA glicosilase especifica, clivagem da ligação N-glicosídica e remoção da base danificada, gerando um sítio abásico (WALLACE et al, 2014).

O BER é frequentemente descrito como uma via de reações enzimáticas consecutivas altamente coordenadas. Todavia, sub-vias do BER também ocorrem, as quais são específicas de acordo com o tipo de dano encontrado tanto no começo como durante o processo de excisão de bases. O BER pode ser dividido em duas vias: a via curta (SP-BER, do inglês *short-patch BER*), responsável pelo reparo de apenas uma base, ou a via longa (LP-BER, do inglês: *long-patch BER*), que pode remover de duas a oito bases. Durante a via curta, uma polimerase preenche a lacuna com a base correta utilizando a outra fita como molde e uma DNA ligase restaura a integridade da fita. Já na via longa, uma polimerase sintetiza um fragmento de DNA mais longo, levando à formação de uma estrutura em *flap* que é resolvida pela endonuclease específica (FEN1, do inglês: *flap endonuclease 1*), seguida da ação da ligase (PARSONS e DIANOV, 2013; DIANOV e HÜBSCHER, 2013).

Um conjunto de quatro categorias de proteínas garantem o modelo atual de funcionamento do BER (Figura 6): DNA glicosilase, AP endonuclease (ou AP DNA liase), DNA polimerase e DNA ligase. Esta via é tipicamente iniciada por uma DNA glicosilase lesão-específica, que remove a base danificada através da clivagem da ponte N-glicosídica que liga a base à desoxirribose, levando à produção de um sítio abásico (AP, que pode referir-se a apurínico ou apirimidínico, dependendo da base removida). Pelo menos doze DNA glicosilases já foram identificadas até o momento, cada uma agindo sobre uma única, ou um pequeno número de lesões de bases (JACOBS e SCHAR, 2012). Cada glicosilase é responsável pelo

reconhecimento de algum dano específico, mas não estritamente um único tipo de dano, podendo, portanto, reconhecer mais de um tipo de lesão. Da mesma forma, uma mesma lesão pode ser reconhecida e processada por mais de uma glicosilase. Este fenômeno garante a chamada redundância no reparo dessas lesões (MAYNARD et al, 2009). A DNA glicosilase OGG1 (8-oxoguanina DNA glicosilase), por exemplo, apresenta capacidade de reconhecimento não apenas de 8-oxoG como de FapyG. Para fins de classificação, as glicosilases podem ser separadas de acordo com suas lesões-alvo, como bases oxidadas/reduzidas (8-oxoG ou formamidopirimidinas), alquiladas (ou metiladas) ou desaminadas (uracil), ou, ainda, pelo seu mecanismo de ação, em monofuncionais (possuem somente atividade de glicosilase, como a uracil-DNA-glicosilase, UNG) ou bifuncionais (possuem atividade de glicosilase e AP liase, como a OGG1) (JACOBS e SCHAR, 2012). Apesar da sua diversidade estrutural, todas as DNA glicosilases utilizam um mecanismo de "*base-flipping*" no qual a base alvo do reparo é parcialmente removida para uma posição extra helical antes da sua excisão total (YANG et al, 2009). O sítio AP resultante é tanto um produto intermediário como uma lesão altamente prevalente no DNA, produzida por perda espontânea de uma base (HITOMI et al, 2007).

Em ambos os casos referidos, os sítios AP serão processados por uma AP endonuclease como a APE1, a segunda enzima na via canônica do BER. APE1 irá hidrolisar o esqueleto fosfodiéster em 5' do sítio AP, criando uma quebra simples flanqueada por uma terminação 3'-OH e um grupamento 5'-desoxirribose fosfato (5`-dRP) (ABBOTS et al, 2010). Alternativamente, algumas DNA glicosilases, como NEIL1 e NEIL2, possuem uma atividade AP liase associada e são também capazes de clivarem o sítio AP através da reação de β-eliminação para produzir 3'-fosfo-α, um aldeído β-insaturado, e 5'-fosfato nas margens da quebra da fita (JACOBS e SCHAR, 2012).

Independentemente da lesão que desencadeou e da glicosilase que iniciou o BER, a incisão da ponte fosfodiéster culmina em um intermediário do BER que abriga lesões 3’ e 5’, as quais bloqueiam a replicação e a transcrição do DNA. Para permitir que este processo seja completado, estes terminais devem ser restaurados aos convencionais 3’-OH e 5’-fosfato, essenciais para que as reações da DNA polimerase e da DNA ligase. Diferentes enzimas que processam as extremidades da lesão no DNA processam estas extremidades anormais dependendo de onde a clivagem ocorreu, se em 5’ ou 3’ do sítio AP. APE1, por exemplo, além da sua atividade endonuclease principal, possui uma atividade 3’-fosfodiesterase intrínseca, permitindo a restauração de 3’-OH. Ainda, a remoção dos grupamentos 5’-dRP ocorre durante o preenchimento guiado por um molde que a DNA polimerase β realiza juntamente com a sua atividade dRP liase (HITOMI et al, 2007; KIM e WILSON, 2012; WALLACE et al, 2014).

Os próximos estágios do BER envolvem o reparo da quebra simples através de síntese de DNA e ligação. O passo de síntese/ligação é dividido em duas subvias, como já referido anteriormente, SP-BER e LP-BER, cuja atividade é baseada no reconhecimento de um ou vários nucleotídeos que precisam ser incorporados no local de quebra do DNA, respectivamente (KIM e WILSON, 2012). Os mecanismos exatos que determinam a escolha por uma ou outra via ainda não foram completamente elucidados, mas alguns estudos mostram que essa determinação pode estar relacionada à disponibilidade de ATP na proximidade do sítio AP, além do tipo de intermediário que é gerado após a incisão que forma o sitio AP, dependente do tipo de lesão e da glicosilase que fez o reconhecimento e a excisão (PETERMANN et al, 2003; SUNG et al, 2006).

O modelo da SP-BER engloba o preenchimento de um único nucleotídeo e remoção do grupamento 5’-dRP pela DNA polimerase β, e a sucessiva ligação das extremidades do DNA, que pode ser feito tanto pela DNA ligase I como pelo complexo da DNA ligase III e XRCC1

(do inglês: *X-ray repair cross-complementing protein 1*). A via curta do BER representa aproximadamente 80-90% de todo o reparo por excisão de bases. A via longa do BER, por sua vez, é normalmente iniciada apenas quando há lesões que bloqueiem 5' e que são refratárias à atividade liase da DNA polimerase β. Além disso, esta sub-via demanda várias proteínas associadas com a replicação do DNA, incluindo as DNA polimerases ε e δ, PCNA RFC, FEN1 e DNA ligase I. Especificamente, as DNA polimerases β, ε ou δ, acompanhadas pelo PCNA, alongam a extremidade 3'-OH na lacuna e deslocam a lesão à 5' como parte do fragmento de DNA ou viram o oligonucleotídeo. Esta estrutura em aba (ou *flap*) é então removida pela FEN1, e a DNA ligase I em seguida sela a lesão que foi realocada *downstream* do sítio original de lesão do nucleotídeo (FORTINI et al, 2007).

Além dos fatores acima mencionados, existem proteínas secundárias que são sabidas pelo seu papel facilitador no BER. As mais notáveis são XRCC1 e PARP1 (do inglês*: Poly (ADP-ribose) Polymerase 1*). Sabe-se que XRCC1 não apresenta atividade enzimática conhecida, mas em contrapartida funciona como um arcabouço molecular que orquestra a montagem de vários componentes enzimáticos envolvidos na via do BER. Por exemplo, já foi demonstrado que XRCC1 interage fisicamente com diversas proteínas do BER, incluindo várias DNA glicosilases, DNA polimerase β, APE1, ligase III, PNPK, Tdp1 e APTX. Apesar da ausência de função catalítica descrita para XRCC1, já foi demonstrado que ela se liga diretamente ao DNA previamente incisado através do seu domínio N-terminal (CALDECOTT, 2003; CALDECOTT, 2008). Adicionalmente, PARP1 também interage fisicamente com XRCC1. PARP1 é uma proteína nuclear abundante que age como sensor molecular de quebras no DNA. PARP1 catalisa a sua própria porção poli (ADP-ribosil) (PAR) através de um processo denominado parilação (LE PAGE et al, 2003). Uma vez formada, esta modificação permite o recrutamento de proteínas de reparo, como a própria XRCC1. Ao mesmo tempo, a densa carga negativa de PAR resulta na liberação de PARP1 do DNA, o que permite acesso às

proteínas de reparo ao local da lesão.

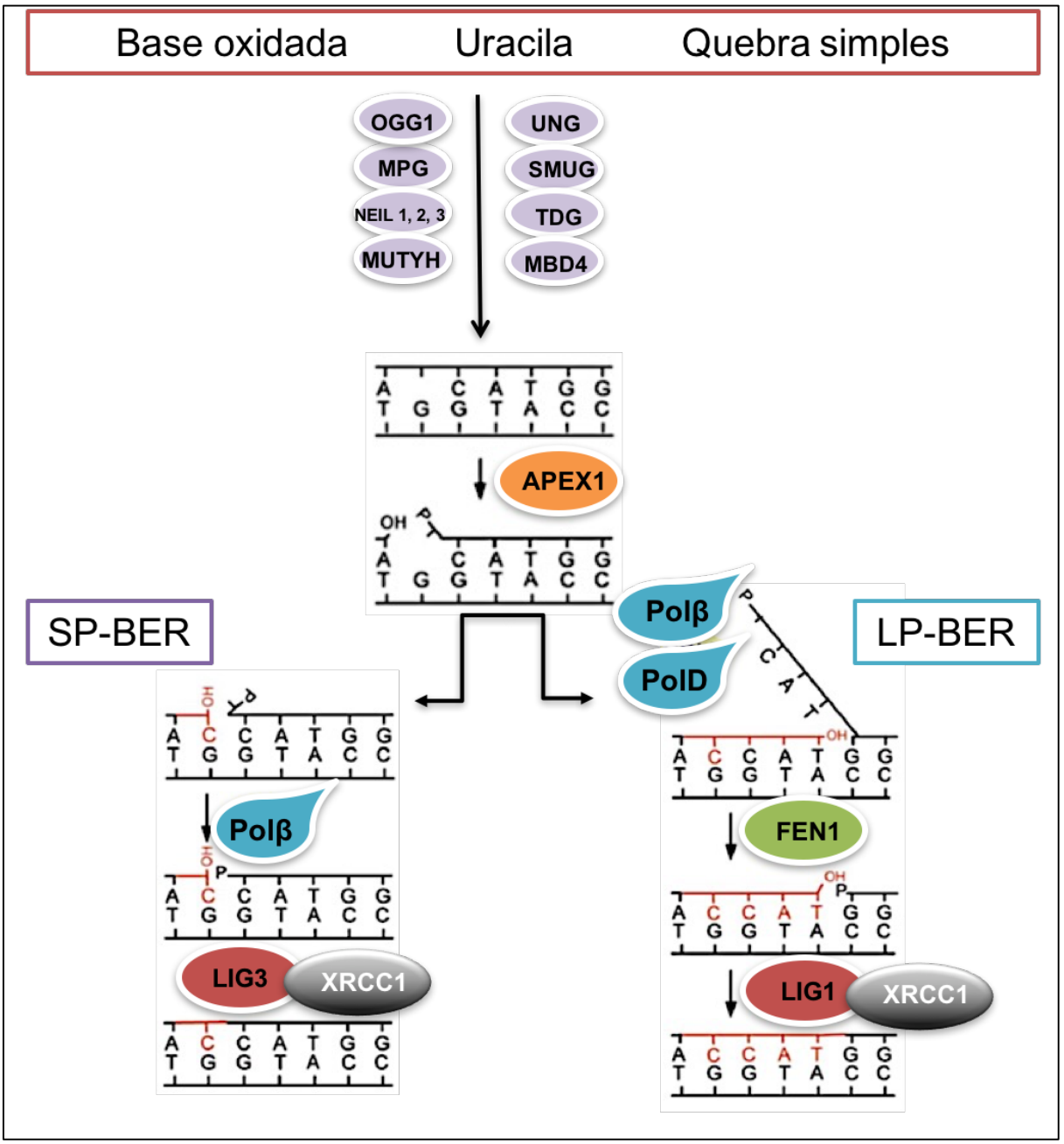


Figura 6: Representação esquemática do reparo por excisão de bases, seus principais efetores e suas subvias, longa e curta. No topo da figura estão as lesões mais comuns que acionam este mecanismo. (Adaptado de Helledey et al, 2014) SP-BER= via curta e LP-BER= via longa.

Clinicamente, a deficiência constitutiva de uma glicosilase gera a Síndrome de polipose associada ao MUTYH (PAM), uma síndrome autossômica recessiva responsável por aproximadamente 0,5% a 1% dos casos de CCR (NIELSEN et al., 2009). Indivíduos com MAP apresentam mutações bi-alélicas MUTYH, idade aproximada de 55 anos e múltiplos adenomas colorretais (entre 10 e 100) (POULSEN e BISGAARD, 2008; ROCHA e DUQUE, 2010). Esta população apresenta, ainda, risco duplicado de manifestações extracolônicas em relação à população em geral e 38% de risco de desenvolver estas manifestações ao longo da vida (VOGT, 2009).

1.2.4 Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

O NER é a via responsável por reparar danos que modifiquem a estrutura do DNA de forma significativa, ou seja, promovendo sua distorção que impossibilite o pareamento correto das fitas. Estas modificações, por sua magnitude, são enquadradas como danos mutagênicos e citotóxicos. Classicamente, o NER está envolvido com o reparo de fotoprodutos causados pela luz UV (CPDs e 6,4-PPs), mas sua ação é muito mais ampla, visto que se envolve no reparo de adutos oriundos da ação de vários agentes químicos, desde fumaça de cigarro, passando pelas aflatoxinas e, obviamente, quimioterápicos, especialmente aqueles derivados da platina e as nitrosureias. O NER, ainda, pode estar envolvido no reparo de bases oxidadas e *crosslinks*, embora estes mecanismos ainda não tenham sido completamente elucidados (CURTIN, 2012; SPIVAK e GANESAN, 2014).

Em linhas gerais, o NER também é um mecanismo que atua pela função coordenada e sequencial de cerca de 30 proteínas, incluindo helicases e endonucleases, as quais, assim como no BER, reconhecem a lesão, abrem a dupla hélice e removem o fragmento que contém o dano e, finalmente, ressintetizam e religam a simples fita processada (STARESINCIC et al, 2009).

A deficiência de uma destas proteínas está vinculada a desordens genéticas bastante estudadas como *Xeroderma Pigmentosum*, Síndrome de Cockayne e Tricotiodistrofia (CLEAVER e REVET, 2008; CLEAVER et al, 2009; GREGG 2011).

O mecanismo de excisão de nucleotídeos apresenta uma subdivisão da sua via de acordo com a lesão reconhecida e com as proteínas envolvidas no seu reparo (Figura 7). Aqui, referimo-nos ao Reparo do Genoma Global (GGR, do inglês: *Global Genome Repair*) e ao Reparo acoplado à Transcrição (TCR, do inglês: *Transcription Coupled Repair*) (VOLKER et al, 2001; HANAWALT e SPIVAK, 2008; CLEAVER et al, 2009;).

O primeiro, GGR-NER, é aquele restrito ao reparo de lesões em regiões não transcritas do genoma, assim como nas fitas não transcritas dos genes ativos, sendo o reconhecimento feito pelo complexo XPC (do inglês: *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C*), hHR23B e centrin- 2. XPC liga-fortemente ao DNA danificado, sendo considerada, portanto, o principal sensor de dano a esta molécula (KUPER e KISKER, 2012). O desencadeamento desta sub-via é dependente tanto da configuração da cromatina como da própria atividade das proteínas em reconhecer as lesões, fatores estes que são considerados limitantes da velocidade com que o reparo nesta via ocorre (ALTIERI et al. 2008).

A segunda sub-via, TCR-NER, reconhece, por sua vez, danos que causam distorções nas regiões ativas da cromatina devido ao bloqueio da RNA polimerase II, reparando-as de forma mais eficiente e envolve as proteínas CSA e CSB (do inglês: *Cockayne Syndrome Complementation Group A e B*) (HANAWALT e SPIVAK, 2008; SCHÄRER, 2013). Desta forma, o desencadeamento desta sub-via do NER depende apenas da parada da função da RNA polimerase. A proteína CSB – principal regulador da TCR-NER - interage fracamente com a RNA polimerase e estimula a transcrição, ligação que se torna mais forte quando a transcrição é interrompida. Para sua estabilização, CSB recruta então CSA para o interior da matriz nuclear após o dano no DNA. Juntas, elas recrutam as proteínas HMGN1 (do inglês: *High Mobility*

Group Nucleosome Binding Domain 1), XAB2 (do inglês: *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A Binding Protein 2*) e TFIIS para o local do dano (HANAWALT e SPIVAK, 2008; SPIVAK e GANESAN, 2014).

Após o reconhecimento da lesão, GGR e TCR convergem para uma via em comum, momento em que ocorrerá a montagem de um complexo para nova verificação da presença do dano e preparo do local, .com o recrutamento dos fatores TFIIH, XPA, RPA e XPG/ERCC5. XPA e RPA não apenas atuam no reconhecimento da lesão, como também ajudam na proteção do fragmento da fita simples de DNA e na estabilização do complexo como um todo.

As proteínas XPB/ERCC3 (helicase 3'-5' dependente de ATP) e XPD/ERCC2 (helicase 5'-3' dependente de ATP) (do inglês: *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group B e D*) são as helicases responsáveis pela abertura da dupla hélice ao redor da lesão. Quanto à XPB e XPD, é importante salientar que a abertura da lesão somente ocorre porque elas atuam em sentido contrário, complementando sua função mutuamente. (SCHÄRER, 2013).

A próxima etapa consiste na incisão da cadeia através da ação coordenada das endonucleases XPG e XPF-ERCC1, ambas responsáveis pelas incisões 3' e 5', respectivamente. XPF contém o domínio catalítico de nuclease, enquanto ERCC1 é necessária para a interação com XPA e outras proteínas de NER. XPC, XPA e TFIIH são liberados do complexo de reparo logo após a incisão a 5'. Subsequentemente, ocorre o recrutamento das proteínas RFC e PCNA na extremidade 3', o que leva à liberação da nuclease e ao início da replicação do novo fragmento de DNA (ou síntese de DNA pós-reparo), utilizando a fita intacta como molde. A ressíntese ocorrerá pela ação das DNA polimerases (DNA Pol δ, ε e/ou κ), após o que a ligação dos fragmentos deve ser realizada pelas DNA ligases I ou XRCC1-DNA ligase III. (TSODIKOV et al, 2007; HANAWALT e SPIVAK, 2008; SCHÄRER, 2013; MARTEIJIN et al. 2014).

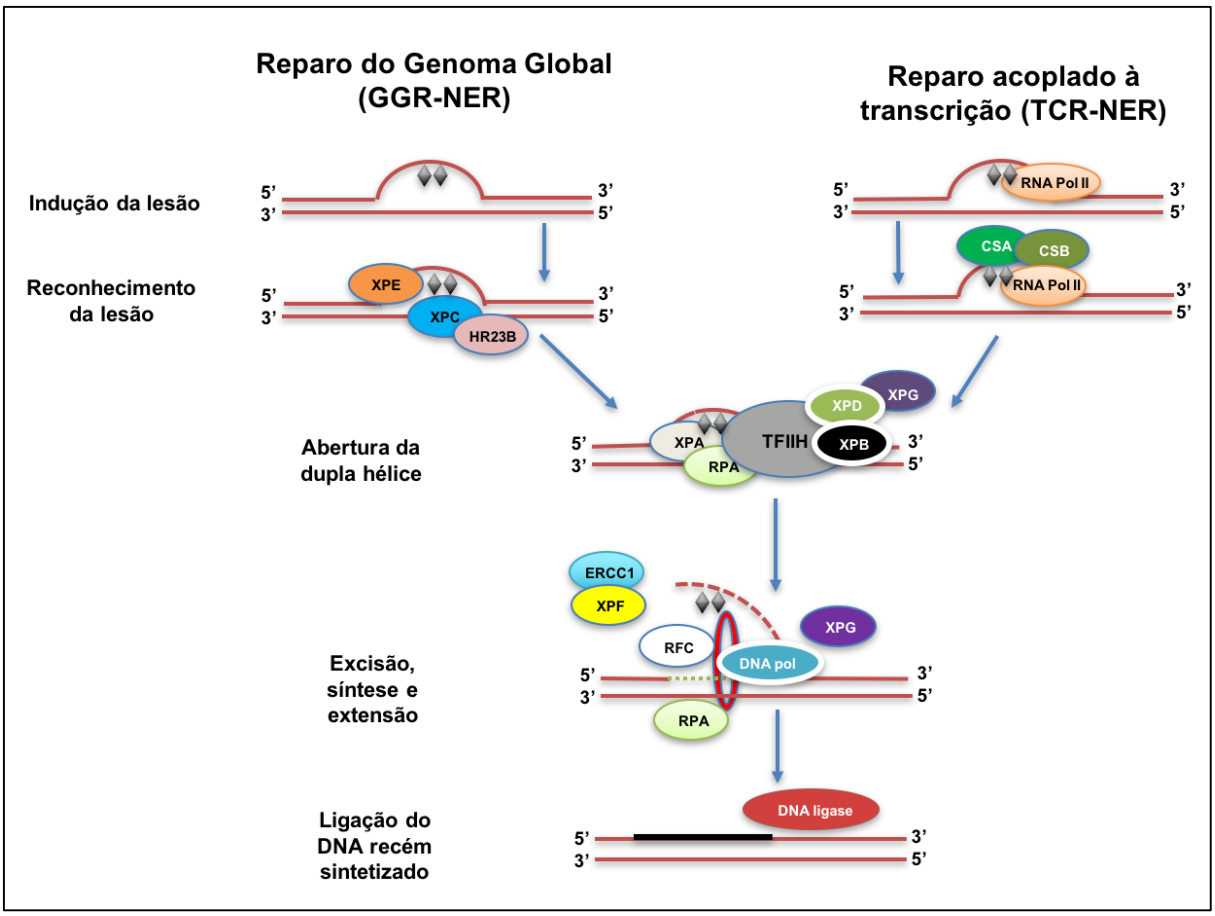


Figura 7: Representação esquemática da via de reparo por excisão de nucleotídeos. A etapa de reconhecimento da lesão é feita por uma das duas vias, GGR-NER ou TCR-NER. Em seguida, estas vias unem-se através de componentes em comum, convergindo para uma única via até o processo final de ressíntese e religação do fragmento processado (Adaptado de Iyama e Wilson III, 2013).

1.3 SISTEMA DE REPARO DO DNA E CÂNCER COLORRETAL

A significância biológica dos mecanismos de reparo do DNA é respaldada no fato de que sua desregulação pode contribuir tanto para a iniciação como para a progressão do câncer. Ao mesmo tempo, o reparo dos danos a essa molécula pode conferir resistência aos tratamentos desta mesma doença (i.e., quimioterapia e radiação), as quais baseiam-se na disfunção estrutural e metabólica do DNA para induzir a morte das células neoplásicas. Desta forma, inúmeros estudos buscam novas abordagens terapêuticas partindo do princípio de utilizar as deficiências internas nos mecanismos de reparo do DNA, a favor do aumento da sensibilidade celular aos agentes que geram lesões. A capacidade das células neoplásicas (ou mesmo das células-tronco neoplásicas) em reconhecer e iniciar o reparo do DNA é, portanto, o mecanismo chave para superar a resistência terapêutica e a recorrência da doença.

No câncer colorretal, a relevância clássica das vias de reparo do DNA está na atuação da via do reparo de malpareamento, cuja inativação é atribuída à perda de pelo menos um de dois dos seus principais componentes, MLH1 e/ou MSH2 (SARGENT et al, 2010), sendo responsável pelas versões hereditárias do CCR. O epitélio colônico possui uma alta taxa de divisão celular (ARAN et al, 2016), o que o torna mais suscetível a mutações que podem levar a perda da integridade genômica e a carcinogênese colorretal. Entre outras coisas já referidas anteriormente, o sistema de MMR, 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 (FEARON, 2011).

O epitélio colônico é um dos tecidos com uma das taxas de regeneração mais elevadas no corpo humano, o que lhe confere maior vulnerabilidade tanto em razão dos seus processos

metabólicos e de divisão celular, como pela constante exposição a compostos mutagênicos. A maioria dos fatores que favorece o desenvolvimento do CCR envolve a produção de estresse oxidativo e o desencadeamento de processos inflamatórios. Neste sentido, a falha ou ausência no reparo destas lesões passa a tratar-se não apenas da malignização celular, mas também da garantia de benefícios ao crescimento neoplásico, comportando uma maior vulnerabilidade ao acúmulo de danos ao DNA (SLYSKOVA et al., 2012).

Todavia, a relação entre o dano ao DNA e seu reparo é muito mais complexa do que o seu próprio conceito, pois nenhuma via individualmente é capaz de reparar todos os tipos de lesão eficientemente. Algumas lesões são substrato para mais de uma via , e existem evidências da interação entre proteínas envolvidas em vias distintas (NAGEL et al, 2014). Esta interação é, provavelmente, a responsável por gerar diferentes graus de malignidade e modular a resposta aos agentes terapêuticos no CCR.

1.3.1 Influência sobre o diagnóstico e prognóstico

Os sistemas de reparo do DNA claramente influenciam tanto a patogênese quanto os graus de agressividade do CCR, embora a lacuna de estudos diagnósticos e prognósticos na literatura ainda não permita o seu uso como biomarcadores moleculares para melhor estratificação dos tipos desta doença. A evidência mais sólida neste sentido é o quanto a presença de instabilidade de microssatélites, causada pela disfunção da via de reparo de malpareamento influencia tanto sobre o prognóstico como sobre a resposta aos quimioterápicos.

Entre todos os casos de CCR que se desenvolvem através da via de instabilidade cromossômica, aproximadamente 15% são caracterizados pela presença de MSI, que é tratado como um marcador molecular da presença de inativação da via de reparo de malpareamento.

A frequência de MSI varia de acordo com o estágio do tumor, sendo as mais altas quando em estágios iniciais e decresce com a progressão de locorregional a metástases à distância (POPAT et al, 2005).

A detecção de MSI pode ser obtida através de ensaios baseados em reações de PCR a partir de tecidos parafinados. Um painel de marcadores de microssatélites foi validado e é recomendado como padrão-ouro. Neste sentido, os tumores colorretais podem ser categorizados em três grupos de acordo com o status dos microssatélites: (1) MSI alto: se dois ou mais dos 5 marcadores de microssatélites mostram instabilidade (ou seja, possuem mutações causadas por inserções ou deleções); (2) MSI baixo: se apenas um dos cinco marcadores mostra instabilidade; (3) MSI estável: se nenhum dos cinco marcadores de microssatélites apresenta instabilidade. A deficiência da via MMR depende da presença de MSI em alta frequência, enquanto a baixa frequência indica proficiência desta via (BOLAND e GOEL, 2010). Ainda, a análise da expressão das proteínas da via MMR por imunohistoquímica é ensaio alternativo amplamente disponível e com a vantagem de não requerer técnicas de biologia molecular. Desde que foi demonstrado que a perda da expressão de proteínas da via MMR está em concordância com o teste molecular (LINDOR et al, 2002), estes dois testes são considerados complementares.

Entre 12-15% de todos os casos de CCR deficientes em MMR, cerca de 60% são esporádicos, sendo que a maioria desses tumores se desenvolve em um cenário de elevada hipermetilação de promotores (HUGHES et al, 2012). O silenciamento de MLH1 relacionado à CIMP é sabido por ser responsável por 80% dos casos nos quais a expressão de MLH1/PMS2 é perdida. Aproximadamente metade dos casos de CCR esporádicos deficientes em MMR são associados com mutações em $BRAF^{V600E}$, o que serve para distinguir estes casos daqueles por síndrome de Lynch (TOL et al, 2009).

Os pacientes com tumores deficientes em MMR apresentam características clínicas e patológicas distintas daqueles com proficiência nesta via como, a predominância da lesão no cólon proximal, pouca diferenciação celular e histologia mucinosa, além de aumento de infiltração linfocitária tumoral (BOLAND et al, 2010). Estes tumores são mais comuns em estágio II, e são relativamente incomuns entre os casos de CCR metastático (KOOPMAN et al, 2009). Mais ainda, os pacientes com CCR deficientes em MMR compartilham características clínicas com os pacientes com síndrome de Lynch, à exceção de que os casos esporádicos são mais diagnosticados em pacientes de idade mais avançada e predominantemente no sexo feminino (SINICROPE et al, 2006).

Evidências indicam que pacientes com tumores deficientes em MMR apresentam um prognóstico ajustado mais favorável do que aqueles proficientes nesta via. Estes dados são oriundos de estudos clínicos retrospectivos sobre terapias adjuvantes (SINICROPE et al, 2006; LANZA et al, 2006). Uma metanálise incluindo 32 estudos com 1277 casos de CCR com MSI (de um total de 7642 casos) mostrou que a deficiência de MMR garante melhor prognóstico em relação àqueles proficientes (POPAT et al, 2005). Esta análise incluiu tanto pacientes sem tratamento como com tratamento adjuvante baseado em 5-fluouracil – e o benefício da deficiência desta via foi mantido. Em geral, o impacto prognóstico da deficiência do MMR parece ser maior em tumores em estágios iniciais (I ou II) (LI et al 2009; KAWAKAMI et al, 2015).

Em relação ao reparo direto, a perda da atividade de MGMT na tumorigênese colorretal é complexa e ainda não completamente caracterizada. A sua inativação através da hipermetilação do promotor atua de forma importante na tumorigênese de diversos tipos tumorais, incluindo o CCR (HIBI et al, 2009; MA et al, 2013; COPPEDE et al, 2014). Baixos níveis de metilação de MGMT já foram detectados na mucosa intestinal saudável e mesmo em indivíduos sem CCR (AHLQUIST et al, 2006; NAGASAKA et al, 2008). Por outro lado, a

metilação de MGMT tem sido frequentemente encontrada em adenomas colorretais em comparação com seus tecidos normais, sugerindo que o *status* da metilação deste gene possa ser um biomarcador molecular para detecção precoce e predição do prognóstico do CCR. Todavia, em uma metanálise recente (LI te al, 2015), que incluiu 14 estudos e cerca de 600 pacientes, inferiu-se que a incidência da metilação é elevada em adenomas e tumores colorretais quando comparada ao tecido normal, mas não há diferença entre os adenomas e os CCR, o que sugere que a metilação exista no tecido normal como um evento inicial, precedendo o adenoma e o CCR. Este fato já foi referido por Shen e colaboradores (2005) como "*field defect*", mostrando que a metilação de MGMT na mucosa está mais para um agente que predispõe ao câncer do que um biomarcador prognóstico. Mais recentemente, foi sugerido que a densidade da metilação de MGMT aumenta gradualmente em duas regiões de promotores na sequência adenoma-carcinoma (NAGASAKA et al, 2008).

A expressão proteica de MGMT reflete a sua capacidade em reparar adutos que podem atuar como desencadeadores do processo tumorigênico. Desta forma, a metilação ou perda de MGMT têm sido associadas com prognósticos desfavoráveis em glioblastoma e linfomas de células B (ESTELLER et al, 2002; HEGI et al, 2009). Entretanto, no CCR, existem muitos resultados inconsistentes para associações com parâmetros clínicos e patológicos prognósticos, provavelmente devido aos desenhos experimentais dos estudos, baixo poder estatístico ou investigação errônea das regiões metiladas. A redução da expressão de MGMT foi associada com gênero de pacientes com CCR, sendo a metilação um evento mais frequente em indivíduos do sexo feminino, o qual aumenta com a idade (MENIGATTI et al, 2009). Como resultado mais encontrado tem-se que a modulação da expressão de MGMT através da metilação parece estar mais envolvida com a carcinogênese colorretal do que com os aspectos prognósticos da doença.

O NER, por sua vez, é um dos maiores atuantes na manutenção da integridade genômica, podendo modular não apenas a predisposição a diversos tipos de câncer como a sua resposta frente aos tratamentos. Várias doenças já foram associadas à ausência de algum componente desta via, como mencionado anteriormente, mas há uma lacuna muito grande na literatura no que tange aos efeitos desta disfunção sobre o prognóstico do CCR. Além disto, como os tratamentos de primeira linha do CCR incluem agentes platinados, o NER cada vez mais vem ganhando importância como marcador de sensibilidade a estes quimioterápicos.

É possível citar poucos estudos neste sentido, como, por exemplo, em 2008, Kobayashi e colaboradores quantificaram os níveis de expressão gênica de ERCC1 em tumores colorretais e demonstraram que o aumento destes níveis estava associado à presença de metástases hepáticas sincrônicas, o que é um indicativo de pior prognóstico. Na sua maioria, e com base em dados pré-clínicos, o papel prognóstico do NER no CCR possui um foco que paira sobre o estudo de polimorfismos de ERCC1. Além disto, todos esses estudos publicados foram gerados no contexto metastático e sob ação de compostos derivados da platina, especialmente a oxaliplatina. Esta influência será discutida na próxima seção.

Finalmente, em relação ao BER, e graças à sua função sobre o reparo de lesões oxidativas, é possível citar alguns estudos sobre alterações no câncer colorretal, embora dados sobre sua relevância prognóstica ainda sejam escassos. Maiores níveis de Polβ são associados à linfonodos metastáticos, metástases à distância e estágios TNM mais elevados em pacientes com CCR (IWATSUKI et al, 2009). Menores níveis de expressão gênica de OGG1 no tecido do cólico normal foram correlacionados com maior sobrevida, mas não foi encontrada nenhuma associação em relação à expressão de PARP-1 (DZIAMAN et al, 2013). Outro estudo, mostrou níveis de mRNA de OGG1 e APE1 aumentados juntamente com aumento de taxa de excisão de 8 oxoG em pacientes com CCR (OBTULOWICZ et al, 2010). Ainda, já foi relatado um aumento na expressão gênica de NEIL1, APEX1, OGG1 e PARP1, porém não

relacionados com a capacidade de reparo do DNA nas células tumorais (SLYSKOVA et al, 2012). Em contrapartida, o estudo de Santos e colaboradores (2014) mostraram *downregulation* de OGG1 e *upregulation* de XRCC1 em tecido tumoral colorretal.

Este mesmo estudo reportou que a redução da expressão gênica de APE1, OGG1 e PARP1 correlaciona-se à localização primária do tumor (reto). Curiosamente, quando se leva em conta o estágio do tumor, os pacientes com mais graus avançados (III e IV) apresentam redução de APE1, OGG1 e PARP1. A maioria dos tumores colorretais apresenta maiores níveis de PARP1, sendo que a sua expressão proteica PARP1 está associada com a localização do tumor primário. Esses achados podem ter um significado clínico porque a avaliação da PARP-1 expressão em amostras de tumor pode melhorar a seleção de pacientes com CRC para tratamento com inibidores da PARP (SULZYC-BIELICKA et al, 2012).

Em relação à influência sobre a quimioterapia, lembramos que o 5-fluoruracil continua sendo o agente quimioterápico mais comum usado no tratamento do CCR. Enquanto a quimioterapia adjuvante é opcional no CCR em estágio II, o 5-FU combinado com a leucovorina, ou combinações destas drogas com oxaliplatina, são consideradas tratamento padrão no tratamento do CCR em estágio III. Modelos pré-clínicos têm sugerido que tumores deficientes em MMR são associados com resistência ao 5-FU (FISCHER et al, 2007; LI et al, 2009). Estas evidências também sugerem que terapias adjuvantes baseadas em 5-fluouracil são ineficientes em pacientes com tumores deficientes em MMR (VILAR et al, 2010). Embora alguns estudos anteriores já tenham sugerido que em comparação a pacientes com tumores proficientes em MMR, apresentam benefício similar ou ainda maior dos tratamentos adjuvantes baseados em 5-FU (SARGENT et al, 2010). Estes resultados conflitantes foram baseados em estudos nos quais os pacientes não foram randomizados entre o tratamento com 5-FU e foram observados após ressecção, além de terem um número relativamente pequeno de pacientes com tumores de cólon deficientes em MMR.

Ribic e colaboradores (2003), estudaram pacientes com CCR em estágios II e III. Neste grupo, a deficiência do MMR foi associada a desfechos mais favoráveis, quando comparada aos tumores proficientes nesta via. Além disso, a quimioterapia adjuvante baseada em 5-FU pode atenuar a vantagem prognóstica da deficiência. Ainda, estes dados sugeriram que pacientes com tumores deficientes em MMR em estágio II não deveriam receber 5-FU. Sargent e colaboradores (2010) também investigaram pacientes com CCR em estágios II e III e que foram incluídos em cinco ensaios randomizados avaliando 5-FU associado à levamisol ou leucovorina como terapia adjuvante *versus* nenhum tratamento pós-tratamento cirúrgico. Nesta análise, pacientes com tumores deficientes em MMR tiveram maior sobrevida do que aqueles com tumores proficientes, embora a deficiência em MMR em ambos os estágios não tenha garantido maior benefício isoladamente ao tratamento com terapias baseadas em 5-FU. Estes dados trazem a possibilidade da utilidade do status da via MMR em tumores colorretais como um fator preditivo da eficácia do 5-FU, embora o mecanismo molecular que o respalde ainda não tenha sido completamente elucidado.

Além do MMR, o BER também tem recebido cada vez mais atenção sobre o seu papel na resposta celular ao 5-FU, uma vez que suas enzimas reconhecem e removem tanto uracil como o 5-FU do DNA (WYATT e WILSON, 2009). Daí a ideia central da maioria dos estudos (em células e animais) em desabilitar o BER para aumentar a sensibilidade de 5-FU mesmo em tumores não classicamente tratados com esta droga. As glicosilases UNG e SMUG1, especificamente, são sabidas por remover, *in vitro,* as lesões causadas por este agente. Entretanto, os modelos experimentais até então relatados têm demonstrado resultados conflitantes quanto ao seu papel na citotoxicidade do 5-FU (WELSH et al, 2003; AN et al, 2007; KUNZ et al, 2009; PETTERSEN et al, 2011; NAGARIA et al, 2012). Em contrapartida, poucos estudos mostram o envolvimento dos componentes *downstream* do BER na sensibilidade ao 5-FU em estudos clínicos.

Em 2007, foi demonstrado que o domínio inibitório de APC interage fisicamente com Polβ e FEN1, bloqueando a via longa do BER, impedindo a recolocação do novo fragmento recém-sintetizado e promovendo maior sensibilidade ao 5-FU em células de câncer colorretal (JAISWAL et al, 2007; BALUSU et al, 2007). Desta forma, estes resultados apontam para uma possível predição de sensibilidade às fluoropirimidinas em pacientes com tumores colorretais com o produto do gene APC funcional (DAS et al, 2014).

Importante salientar, também, que células deficientes em MPG, XRCC1, APE1, Polβ são supersensíveis a agentes alquilantes em tumores variados (PAIK et al, 2005; HORTON et al, 2008; TANG et al, 2011). Agentes alquilantes provocam lesões que são reparadas, principalmente pelo reparo direto, MMR e BER. Neste sentido, inibidores destes sistemas têm surgido, mas eles têm como alvo principalmente as vias de reparo direto e de malpareamento em tumores como glioblastoma (TRIVEDI et al, 2008). O bloqueio da via BER tem sido negligenciado especialmente o que tange à superação da resistência à temozolomida. Acontece, que a temozolomida não é utilizada na rotina terapêutica do CCR, embora, recentemente, estudos de fase II e III com pacientes com CCR metastáticos têm ganhado certa relevância (*Clinical Trials identifiers*: NCT01781403; NCT00423150; NCT01051596). Interessantemente, a literatura mostra que tanto o *knockdown* como o aumento da expressão de MPG sensibilizam as células a agentes alquilantes (RINNE et al, 2004; FISHEL et al, 2007). Para evitar o dano induzido pela alquilação que são acumuladas pela ausência de expressão de MPG, a sua superexpressão forçada parece ser uma estratégia e uma terapia gênica viável para sensibilizar as células a temozolomida. Estes mecanismos não foram explorados no tratamento do CCR até o momento.

Mais recentemente, através do uso de inibidores de PARP, os quais rompem a funcionalidade do BER, tem-se visto que estas moléculas sensibilizam tanto as células proficientes como as deficientes em MMR ao 5-FdUrd (5-fluorodeoxiridina), mas não ao 5-

FU. Isto é particularmente importante porque os tumores colorretais deficientes em MMR apresentam resposta terapêutica limitada ao 5-FU, e inibir PARP1 sensibiliza estes tipos celulares ao 5-FdUrd. De forma similar, inibir PARP1 em tumores proficientes em MMR, aumenta o poder terapêutico de 5-FdUrd (GENG et al, 2011).

Conquanto o estadiamento do CCR continue sendo a principal variável prognóstica e possivelmente seja ainda a chave que efetivamente determine o manejo terapêutico do paciente, uma série de outros fatores independentes destas escalas têm apresentado importantes correlações com desfechos clínicos. Portanto, delinear o perfil de expressão e atividade dos componentes do sistema de reparo do DNA, bem como sua influência mútua no CCR é claramente uma forma atual de refinar o prognóstico e planejar terapias mais certeiras.

São claros os esforços da comunidade acadêmica para o encontro de marcadores que refinem o prognóstico e que sirvam de marcadores de sensibilidade no tratamento do câncer. Para muitos tipos de neoplasias, esta realidade já é mais palpável, a exemplo do câncer de mama. Todavia, em relação ao CCR, esta lacuna ainda necessita ser preenchida, já que toda a conduta terapêutica se respalda apenas no estadiamento patológico da doença. Além disto, levando em conta os aspectos fisiológicos do tecido colorretal, bem como os seus fatores etiológicos, é também claro que o sistema de reparo do DNA exerce influência em ambos. Daí a grande relevância na busca por alterações significativas que possam apresentar correlações com aspectos clínicos e patológicos, para que venham a endossar os critérios atuais de estadiamento e provejam informações prognósticas e preditivas. Desta forma, a compreensão da modulação do sistema de reparo do DNA no desenvolvimento dos tumores colorretais, abre um caminho importante também para os esforços no delineamento de terapias mais certeiras e na redução da mortalidade.

Portanto, uma vez que o tecido intestinal apresenta uma taxa de replicação elevada e está sujeito diversas injúrias causadas por agentes endógenos e exógenos, é totalmente

plausível que os componentes do sistema de reparo do DNA estejam alterados, especialmente aqueles ligados aos sistemas de excisão. Mais do que isto, eles podem modular os graus de agressividade tumoral e a resposta a quimioterapia neste tipo de tumor, fornecendo importantes informações sobre o prognóstico da doença. Este trabalho propõe, enfim, buscar marcadores moleculares relacionados ao sistema de reparo do DNA capazes de refinar as ferramentas já consolidadas de estadiamento do câncer colorretal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência dos componentes das vias de reparo do DNA direto, de malpareamento (MMR) e por excisão de bases (BER) e nucleotídeos (NER) sobre o prognóstico de pacientes com câncer colorretal.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os níveis da expressão dos genes- e das proteínas-chave das vias de reparo direto do DNA, MMR, BER e NER em adenocarcinomas colorretais com os tecidos adjacentes saudáveis pareados;
- Correlacionar os dados moleculares de expressão de genes e proteínas das vias de reparo do DNA com dados clínicos e os critérios atuais de estadiamento;
- *In vitro*, avaliar a influência da exposição ao 5-fluoracil e à temozolomida na indução de citotoxicidade em células de CCR deficientes em MMR (HCT116) superexpressando MPG ou XRCC1;
- *In vitro*, avaliar o a influência do metabolismo energético na viabilidade de células de CCR deficientes em MMR (HCT116) que superexpressando MPG ou XRCC1.

CAPÍTULO I

Neste artigo original, aceito para publicação no periódico Oncotarget, abordamos a expressão gênica e proteica das vias de reparo do DNA por via direta, malpareamento e excisão de bases em tumores colorretais e seus tecidos saudáveis pareados, correlacionando os dados moleculares com os aspetos patológicos de estadiamento da doença. Ao mesmo tempo, em um modelo in vitro, apresentamos a influência da superexpressão de duas proteínas-chave na via de reparo por excisão de base na resposta a dois agentes quimioterápicos: um clássico (5-fluoruracil) e um não utilizado na rotina (temozolomida), bem como exploramos o metabolismo energético envolvidos com morte e resistência celular conferido pela modulação da expressão gênica. Finalmente, neste trabalho é proposto o uso de marcadores moleculares para determinação do uso destas drogas em um perfil específico de pacientes portadores de câncer colorretal.

3. CAPÍTULO I

Manuscript title: Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy.

Natalia M. Leguisamo[1*], Helena C. Gloria[1], Antonio N. Kalil[1,2], Talita V. Martins[2], Gustavo A. Laporte[1,2], Daniel B. Azambuja[1,2], Lisiane B. Meira[3§], and Jenifer Saffi[1§]

1 Genetic Toxicology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
2 Oncology and Colorectal Surgery, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
3 Department of Clinical and Experimental Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, United Kingdom.

*To whom correspondence should be addressed. *Laboratory of Genetic Toxicology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.* Tel: +55 51 33038803; Email: nmleguisamo@gmail.com
§Author's information: Lisiane B. Meira and Jenifer Saffi share senior authorship

Keywords: Colorectal cancer; base excision repair; prognosis; energy metabolism; temozolomide.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) treatment often involves surgery and genotoxic chemotherapy. DNA repair mechanisms, such as base excision repair (BER) and mismatch repair (MMR), may not only influence tumor characteristics and prognosis but also dictate chemotherapy response. Defective MMR contributes to chemoresistance in colorectal cancer. Moreover, BER affects cellular survival by repairing genotoxic base damage in a process that itself can disrupt metabolism. We characterized BER and MMR gene expression in colorectal tumors and the association between this repair profile with patients' clinical and pathological features. We also exploited the possible mechanisms underlying the association between altered DNA repair, metabolism and response to chemotherapy. Seventy pairs of sporadic colorectal tumor samples and adjacent non-tumor mucosal specimens were assessed for BER and MMR gene and protein expression and their association with clinical features. MMR-deficient colon cancer cells (HCT116) overexpressing *MPG* or *XRCC1* were treated with 5-FU or TMZ and evaluated for viability and metabolic intermediate levels. Increase in BER gene and protein expression is associated with more aggressive tumor features and poor pathological outcomes in CRC. Imbalancing BER by overexpression of *MPG*, but not *XRCC1*, sensitizes MMR-deficient colon cancer cells to 5-FU and TMZ and leads to ATP depletion and lactate accumulation.

Introduction

Colorectal carcinoma (CRC) is the third most common malignancy worldwide, and over 1 million new cases of colorectal carcinoma are diagnosed each year [1]. Disease prognosis and therapy selection for CRC largely depends on pathology-related staging following the tumor-node-metastasis (TNM) classification and staging system. Despite widely used, TNM staging seldom predicts the clinical outcome of CRC patients accurately. Highlighting the limitations of the TNM classification system is the observation that 20-40% of patients with relatively low-grade, stage II colorectal cancer rapidly worsen and die [*2*,3]. Moreover, despite significant advances in diagnosis and treatment, CRC-related mortality remains unchanged for the past 20 years and patients with advanced disease derive limited if any benefit from the recent advances in adjuvant therapy [4].

Therapy for CRC includes surgery, radiation and/or chemotherapeutic schemes, largely based on the use of 5-fluorouracil (5-FU) and its prodrug capecitabine [5]. Treatment with 5-FU results in thymidylate synthase (TS) inhibition, depletion of thymidine triphosphates (TTPs) available for DNA synthesis, and misincorporation of FdUTP (5-FdUrd triphosphate) into DNA, and/or of FUTP (5-fluorouridine triphosphate) into RNA [5]. Despite therapy, cancer recurrence is common within the first few years following treatment completion, indicating stem cells repopulation [6] and drug resistance [7].

Base excision repair (BER) and mismatch repair (MMR) both play a key role in dictating cellular responses to 5-FU treatment, since BER recognizes and removes uracil and 5-FU from DNA [8] and MMR drives 5-FU-induced cytotoxicity [9]. Greater survival benefit after 5-FU treatment is observed in patients whose tumors are MMR-proficient, while MMR-deficiency, characterizing 15-20% of sporadic CRC cases, is not associated with survival benefit after 5-FU treatment [10]. In the case of BER, evidence exists suggesting an association between alteration of various BER proteins and increased tumor aggressiveness in CRC [for

review see 11]. However, how inappropriate BER affects tumor malignancy remains to be determined since the few published studies on this subject often report conflicting results on the expression of a relatively low number of BER genes [12, 13, 14]. Despite these limitations, modulation of some BER proteins is under active investigation as a potential therapeutic approach for chemotherapy sensitization [for review see 15].

BER is a multi-step repair pathway acting on damaged bases generated by alkylation, oxidation or deamination and proceeds through a sequence of reactions depending on the initial base lesion [11]. BER is initiated upon base removal by one of many substrate-specific DNA glycosylases, such as N-methylpurine DNA glycosylase (MPG) and 8-oxo-guanine (OGG1). The enzymatic steps taking place once BER is initiated lead to the generation of toxic intermediates such as apurinic/apyrimidinic (AP) sites and single strand breaks (SSB). Efficient BER completion is coordinated by an important BER accessory factor, the chromatin associated enzyme poly(ADP-ribose) polymerase or PARP. PARP is activated upon binding to sites of SSB allowing for recruitment of downstream BER enzymes and completion of the repair process [16].

BER modulation may affect cellular outcomes to chemotherapy depending on the step in the pathway that is modulated. Loss of DNA glycosylase activity, such as MPG, can prevent BER initiation and consequently the accumulation of cytotoxic BER intermediates [17]. In contrast, once BER has initiated, PARP1 inhibition can lead to cell death due to the accumulation of unrepaired SSBs and double-strand breaks (DSBs) [18]. An imbalance in the pathway due to MPG overexpression has also been reported to sensitize cancer cells to the alkylating agent temozolomide (TMZ) [19]. TMZ cytotoxicity, similarly to 5-FU, is mediated through functional BER and MMR pathways [20]. In this context, a better understanding of a tumor-specific BER signature may aid the development of new tailored therapeutic approaches especially designed to bypass the chemoresistance observed in MMR deficient tumors.

The mechanisms that contribute to the enhanced cell death observed upon PARP inhibition may be explained through the link between BER initiation, PARP activation and cellular bioenergetic metabolites. PARP activation upon binding to unrepaired SSB intermediates of BER initiation results in the NAD^+-dependent synthesis of the polyADP-ribose polymer (or PAR). PAR has been recently shown to directly inhibit the enzyme hexokinase, therefore inhibiting glycolysis, causing energy depletion and cell death [21, 22, 23]. Because cancer cells remarkably depend on enhanced aerobic glycolysis for energy production [24, 25], disruption of energy metabolism through BER modulation coupled to chemotherapy may represent a powerful approach in cancer treatment [26].

In this study, we profiled BER and MMR gene expression in sporadic colorectal tumors and matched non-tumor tissues, and related the expression of these DNA repair genes with clinical tumor features and pathological staging. We find that high BER gene expression is associated with poor clinical outcomes. In addition, we overexpressed the BER proteins MPG and XRCC1 in MMR-defective HCT116 cells and assessed how increased levels of these proteins affected cell survival and metabolic intermediates after 5-FU and TMZ treatments. We find that MPG overexpression, but not XRCC1 overexpression, results in increased 5-FU and TMZ sensitivity, ATP depletion and lactate accumulation. Our results suggest that BER modulation can alter both tumor metabolism and response to DNA damage, making it an attractive therapeutic target for colorectal cancer.

Results

BER imbalance and reduction in MGMT expression characterize colorectal cancer tissues

The mRNA levels for MGMT (direct repair); MLH1 and MSH2 (MMR); and OGG1, MPG, APE1, PARP1, Polβ and XRCC1 (BER) were first quantified using qPCR in 70 pairs of primary sporadic colorectal tumors and adjacent healthy mucosal tissues. MGMT mRNA levels were reduced in tumor samples in comparison to healthy mucosal tissues (Fig. 1A), and this reduction was seen in 73% of patients (Fig. 1B). MGMT promoter methylation and consequent decreased expression is observed in 27-40% of chemo resistant metastatic colorectal tumors and is a frequent event in colorectal carcinogenesis [27]. However, since MGMT loss has been also identified in healthy colorectal tissue, this event has been referred as a "field defect", which means it is neither necessary nor sufficient to cancer progression [28].

Differently from direct repair, BER is multi-step repair process that requires coordinated expression of several proteins to prevent accumulation of cytotoxic repair intermediates. With the exception of Polβ, where we observed no significant differences in gene expression levels between tumor and healthy tissues, all other BER genes examined were found to be overexpressed in tumor colorectal tissues if compared to healthy tissue (Fig. 1A). However, it is important to note that a consistent upregulation for the entire group of BER genes was only observed in approximately 7% of our patient cohort (5 out of 70 patients). This means that a majority of sporadic CRC cases present an imbalance in this pathway, with some BER genes overexpressed without compensatory changes in downstream BER steps (Fig.1B).

Regarding MMR, we found no difference in expression with respect to MLH1 and MSH2 mRNA levels between tissue specimens (Fig. 1A); however, 31% of all patients showed MLH1 downregulation in tumor tissue in comparison to healthy tissue, and 24% displayed

reduced expression of both MMR genes in neoplastic tissue (Fig. 1B). It is well established that a functioning MMR pathway is necessary for the triggering of apoptosis in response to mispairing base damage. [29]. MLH1 inactivation (*i.e.* MMR deficiency) occurs in 15-20% of colorectal tumors [26], and in the absence of MMR, the repair of base damage will require the BER pathway. For this reason, we assessed the relationship between base excision repair gene expression profiles and MMR status (Figure 2). This analysis showed that deficiency in MMR (characterized by low *MLH1* and *MSH2* gene expression simultaneously) is associated with lower expression of MPG, OGG1 and PARP1, but not other BER proteins.

Next, we verified the qPCR results by assessing protein expression levels for the same genes. Protein expression levels for MLH1, MPG, FEN1, Polβ and XRCC1 was assessed by immunohistochemistry in tumor specimens and healthy tissue (Fig. 1C and Supplementary Figure 1). Upregulation of MLH1, MPG, Polβ and XRCC1 was found, respectively, in 79%, 59%, 56% and 57% of all cases (Supplementary Table 1).

Table 1: Clinicopathological features of CRC patients included in this study (n=70). The numbers in parentheses indicate the percentage of cases with a specific clinical or pathological characteristic.

Variable	n (%)
Total cases	70
Age (mean± SD)	67.7± 11
Age, y	
≤65	30 (43)
>65	40 (57)
Gender	
Male	38 (54)
Female	32 (46)
Tumour location	
Colon	42 (60)
Rectum	28 (40)
Histology	
Adenocarcinoma	60 (85)
Mucinous	10 (15)
Cellular differentiation	
Well or moderately differentiated	30 (43)
Poorly differentiated	40 (57)
Tumour invasive depth	
T1-T2	20 (29)
T3-T4	50 (71)
Lymph node status	
N0 (*n=0*)	19 (27)
N1 (*n≤3*)	26 (37)
N2 (*n>3*)	15 (21)
Lymphatic invasion	
No	38 (54)
Yes	32 (46)
Perineural invasion	
No	44 (63)
Yes	26 (37)
Preoperative CEA, ng/mL	
≤5	42 (60)
>5	28 (40)
AJCC/TNM stage	
I-II	41 (59)
III	29 (41)

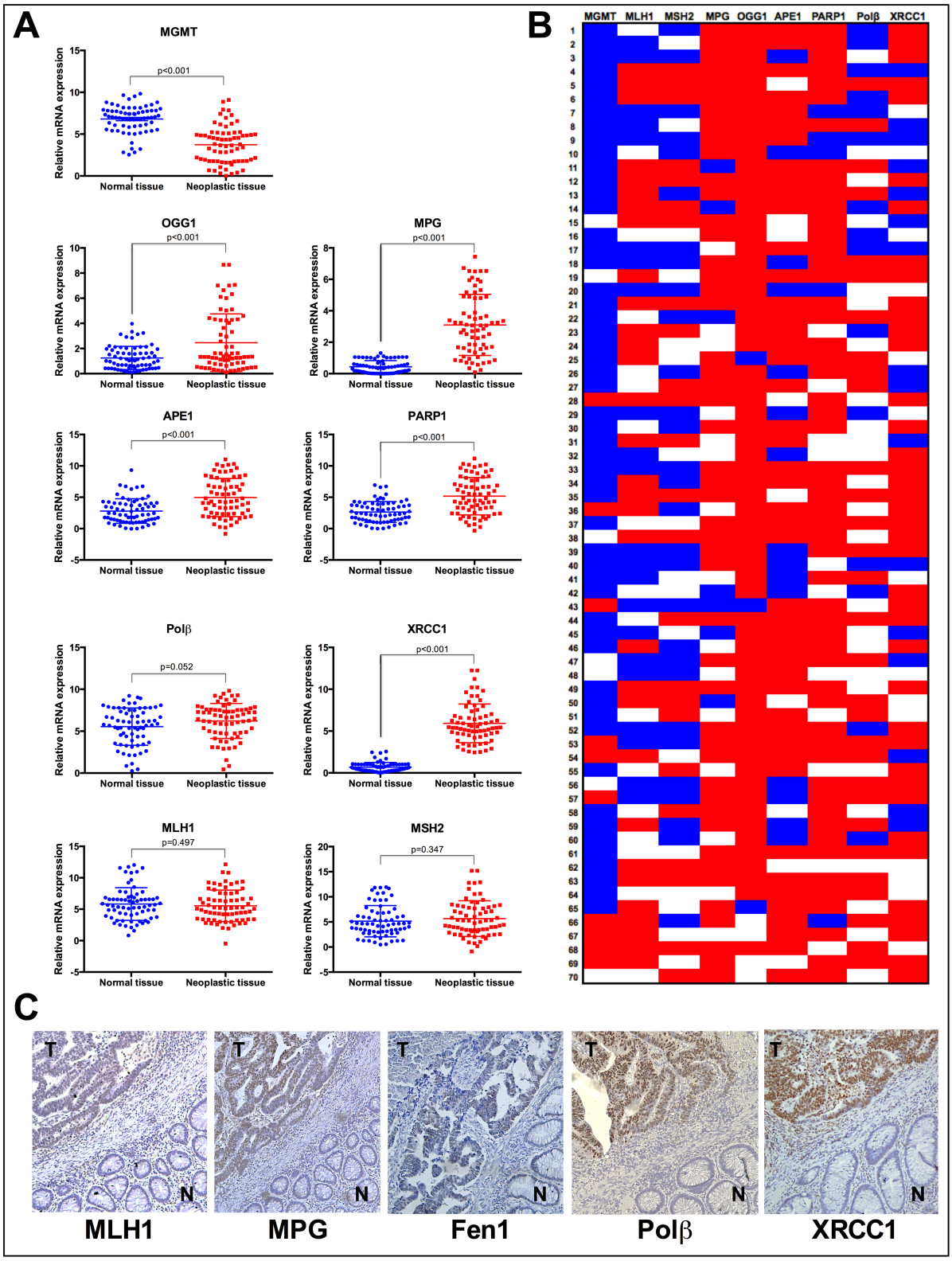


Figure 1: Sporadic colorectal tumors present imbalance of BER genes in comparison to healthy adjacent mucosa. A, Gene expression was quantified for a panel of DNA repair genes by real-time qPCR analysis in neoplastic and normal mucosal tissues from 70 patients with

sporadic colorectal cancer. The following genes were examined: MGMT, MLH1, MSH2, MPG, OGG1, APE1, PARP1, Polβ and XRCC1. Gene expression data are shown as scatter diagrams. **B**, Heat map of individual gene expression changes in sporadic colorectal cancer. Fold changes were calculated for neoplastic tissue *vs.* adjacent normal tissue. Blue indicates decreased relative gene expression, red indicates increased relative gene expression and white indicates no change in gene expression. **C**, Representative photomicrographs showing immunohistochemical staining in colorectal tumor specimens for MLH1, MPG, Fen1, Polβ and XRCC1; N: normal tissue; T: tumor tissue. Images were taken at x100 magnification.

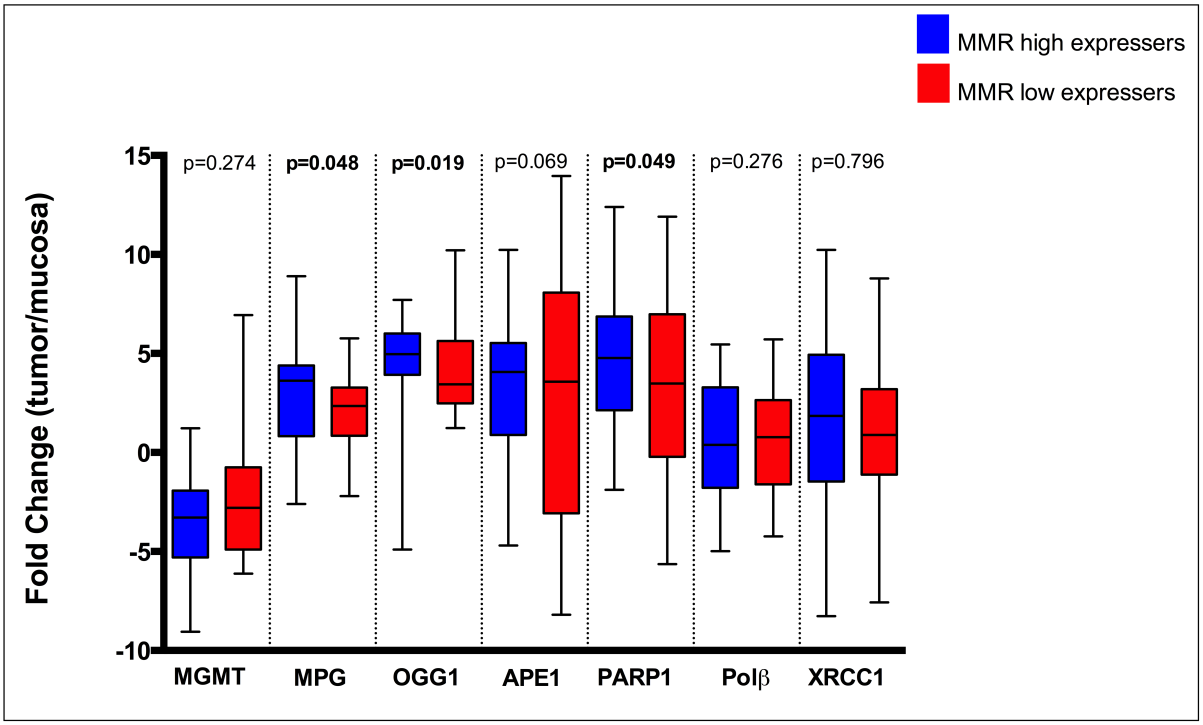
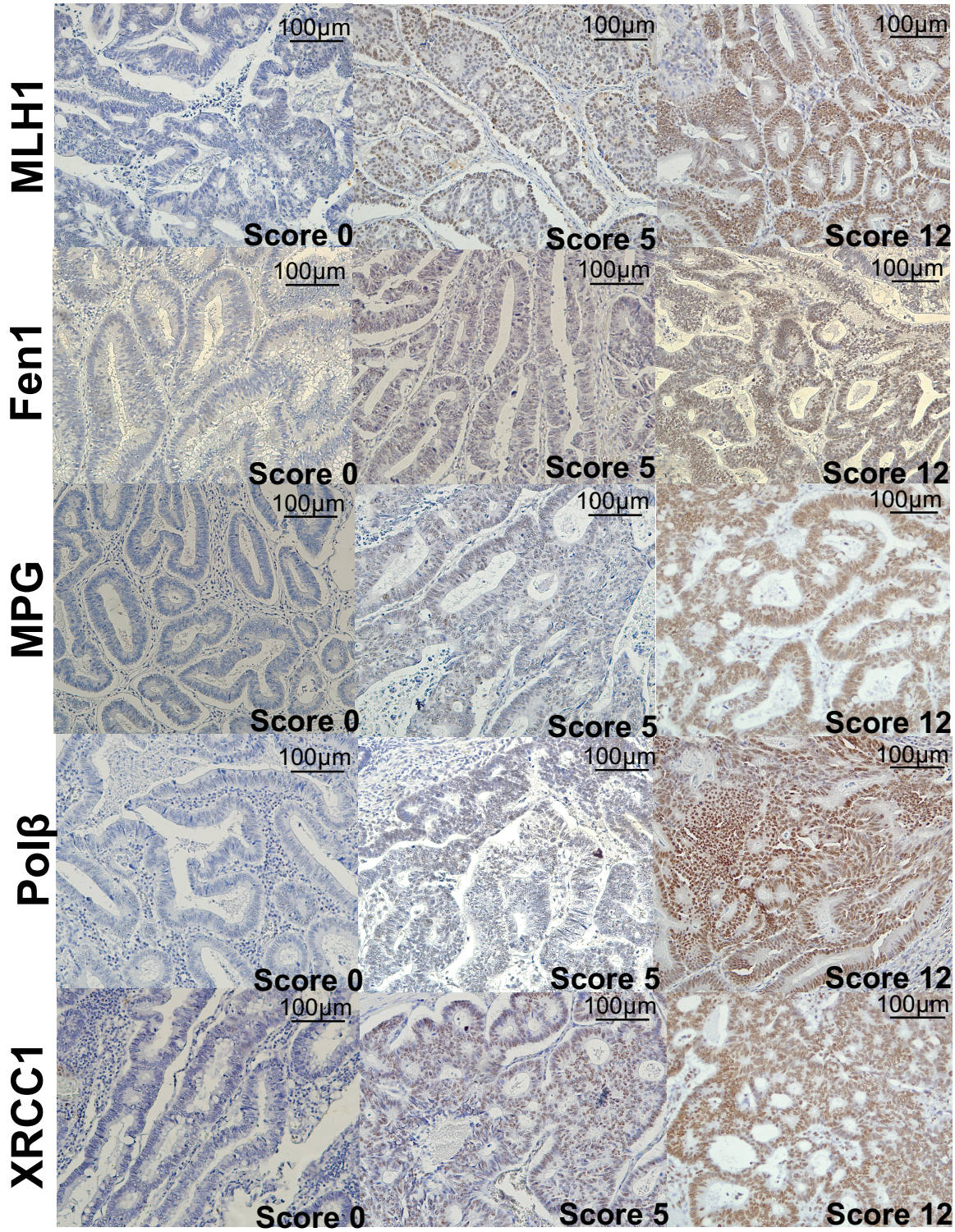


Figure 2: MMR repair deficiency is associated with low expression of glycosylases (MPG and OGG1) and PARP1. MMR status (simultaneous low or high expression of MLH1 and MSH2) and its correlation with MPG, MGMT, Fen1, Polβ and XRCC1 fold change (tumour/normal tissue).

Supplementary Table 1: Clinicopathological findings and correlation with MLH1, MPG, Fen1, Pol and XRCC1 expression in colorectal tumour tissues. The "*" symbol denotes statistical significance. The numbers in parentheses indicate the percentage of tumours with a specific clinical or pathological feature for a protein expression subtype.

Variable		MLH1			MPG			Fen1			Polβ			XRCC1		
		High	Low	*p value*	High	Low	*p value*	High	Low	*p value*	High	Low	*p value*	High	Low	*p value*
Total cases	70	55 (79)	15 (21)		41 (59)	29 (41)		31 (44)	39 (56)		39 (56)	31 (44)		40 (57)	30 (43)	
Age, years																
≤65	30 (43)	23 (77)	7 (23)	*0.737*	23 (77)	7 (23)	*0.834*	15 (50)	15 (50)	*0.405*	17 (47)	13 (43)	*0.891*	22 (73)	8 (27)	*0.676*
>65	40 (57)	32 (80)	8 (20)		18 (45)	22 (55)		16 (40)	24 (60)		22 (55)	18 (45)		18 (45)	22 (55)	
Tumour location																
Colon	42 (60)	**32 (76)**	**10 (34)**	***0.002****	23	19	*0.014*	18 (43)	24 (57)	*0.768*	23 (55)	19 (45)	*0.844*	23 (55)	19 (45)	*0.622*
Rectum	28 (40)	**23 (82)**	**5 (18)**		7	21		13 (46)	15 (54)		16 (57)	12 (43)		17 (61)	11 (39)	
Histology																
Adenocarcinoma	60 (85)	47 (78)	13 (22)	*0.905*	34 (57)	26 (43)	*0.428*	27 (45)	33 (55)	*0.768*	35 (59)	25 (41)	*0.281*	34 (57)	26 (43)	*0.844*
Mucinous	10 (15)	8 (80)	2 (2)		7 (70)	3 (3)		4 (40)	6 (60)		4 (40)	6 (60)		6 (60)	4 (40)	
Cellular differentiation																
Well or moderately differentiated	30 (43)	23 (78)	7 (22)	*0.355*	16 (53)	14 (47)	*0.441*	7 (23)	23 (77)	*0.728*	22 (73)	8 (27)	*0.891*	**14 (46)**	**16 (55)**	***0.05****
Poorly differentiated	40 (57)	22 (55)	8 (45)		25 (62)	15 (38)		24 (60)	16 (40)		17 (42)	23 (58)		**26 (65)**	**14 (35)**	
Tumour invasive depth																
T1-T2	20 (29)	**19 (95)**	**1 (5)**	***0.045****	**16 (90)**	**4 (20)**	***0.021****	10 (50)	10 (50)	*0.543*	10 (50)	10 (50)	*0.543*	12 (60)	8 (40)	*0.760*
T3-T4	50 (71)	**36 (72)**	**14 (28)**		**25 (50)**	**25 (50)**		21 (42)	29 (58)		29 (58)	21 (42)		28 (56)	22 (44)	
Lymph node status																
N0-N1	55 (79)	44 (80)	11 (20)	*0.577*	35 (67)	20 (33)	*0.100*	26 (47)	29 (53)	*0.335*	31 (56)	24 (44)	*0.834*	30 (54)	25 (46)	*0.400*
N2	15 (21)	11 (73)	4 (27)		6 (40)	9 (60)		5 (33)	10 (67)		8 (53)	7 (47)		10 (67)	5 (33)	
Lymphatic invasion																
No	38 (54)	30 (79)	8 (21)	*0.933*	**27 (71)**	**11 (29)**	***0.021****	17 (45)	21 (55)	*0.934*	20 (53)	18 (47)	*0.572*	**18 (47)**	**20 (53)**	***0.042****
Yes	32 (46)	25 (78)	7 (22)		**14 (44)**	**18 (56)**		14 (44)	18 (56)		19 (59)	13 (41)		**22 (68)**	**10 (32)**	
Perineural invasion																
No	44 (63)	34 (77)	10 (23)	*0.731*	28 (64)	16 (36)	*0.263*	18 (41)	26 (59)	*0.459*	**19 (43)**	**25 (57)**	***0.006****	25 (57)	19 (43)	*0.943*
Yes	26 (37)	21 (80)	5 (20)		13 (50)	13 (50)		13 (50)	13 (50)		**20 (77)**	**6 (23)**		15 (57)	11 (43)	
Preoperative CEA, ng/mL																
≤5	42 (60)	33 (78)	9 (22)	*1.000*	26 (62)	16 (38)	*0.488*	19 (45)	23 (55)	*0.844*	22 (52)	20 (48)	*0.492*	25 (60)	17 (40)	*0.622*
>5	28 (40)	22 (78)	6 (22)		15 (53)	13 (47)		12 (43)	16 (57)		17 (61)	11 (39)		15 (53)	13 (47)	
AJCC/TNM stage																
I-II	41 (59)	33 (80)	8 (20)	*0.642*	**30 (73)**	**11 (27)**	***0.003****	19 (47)	22 (53)	*0.681*	**11 (27)**	**30 (63)**	***0.008****	23 (56)	18 (44)	*0.843*
III	29 (41)	22 (76)	7 (24)		**11 (38)**	**18 (62)**		12 (41)	17 (59)		**28 (97)**	**1 (3)**		17 (59)	12 (41)	



Supplementary Figure 1 (S1): Immunohistochemistry images representative of the scores calculated for MLH1, MPG, Fen1, Polβ and XRCC1 protein expression in colorectal tumour tissue specimens. Magnification is x100.

Changes in BER gene and protein expression have prognostic value in patients with colorectal cancer

Using regression-correlation analysis, we next assessed whether the expression levels for the above proteins acting in the three distinct DNA repair pathways (namely, direct repair, MMR and BER) were associated with clinical and pathological features currently used for staging and prognosis determination in colorectal cancer patients (Table 2 and Figure 3). We find that, primary tumors located in rectum are associated with lower MLH1 expression (p=0.014) and higher MSH2 expression (p=0.015). Our analysis also showed that mucinous histological subtypes are associated with higher levels of MGMT (p=0.027) and lower levels of MPG (p=0.031) expression. Poorly differentiated tumors were associated with reduced MPG (p=0.033) and increased XRCC1 (p=0.042) expression. Presence of lymphatic and/or perineural invasion is associated with overexpression of MPG (p=0.044) and PARP1 (p=0.016 and 0.043, respectively), but also with reduction of Polβ gene expression (p=0.024 and 0.003, respectively). Finally, we found association between TNM stage III-IV and overexpression of APE1 (p=0.018) and low expression of Polβ (p=0.001).

Table 2: Correlations between gene expression and clinical features.

	MGMT	MLH1	MSH2	MPG	OGG1	APE1	PARP1	Polβ	XRCC1
Age	0.518	0.147	0.585	0.441	0.226	0.888	0.377	0.522	0.819
Tumour location	0.369	**0.014**	**0.015**	0.276	0.601	0.502	0.915	0.298	0.745
Histology	**0.027**	0.666	0.678	**0.031**	0.816	0.862	0.495	0.201	**0.042**
Cellular differentiation	0.176	0.233	0.949	**0.033**	**0.042**	0.302	0.444	0.321	**0.031**
Tumour invasive depth	0.812	**0.020**	0.743	0.832	0.302	0.704	0.709	0.733	0.317
Lymph node status	0.125	0.848	0.537	0.164	0.983	0.188	0.439	**0.003**	0.345
Lymphatic invasion	0.884	0.766	0.687	**0.044**	0.889	0.847	**0.016**	**0.024**	0.451
Perineural invasion	0.555	0.062	0.852	0.459	0.395	0.406	**0.043**	**0.003**	0.389
Preoperative CEA	0.472	0.103	**0.033**	0.253	0.704	0.392	0.652	0.247	0.892
TNM stage	0.198	0.732	0.953	0.131	0.920	**0.018**	0.329	**0.001**	0.576

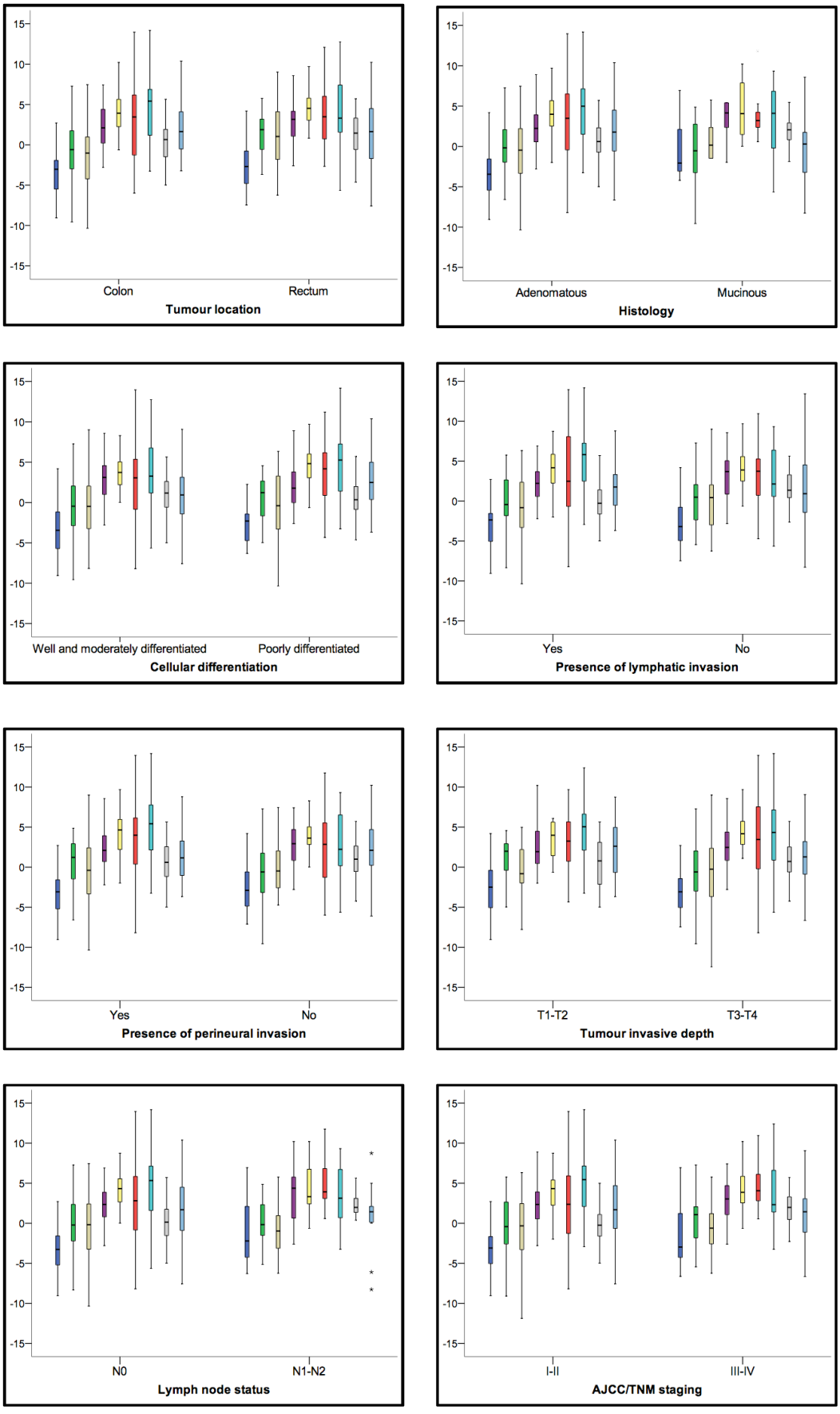

15
10
5
0
-5
-10
-15
Colon
Rectum
Tumour location
Adenomatous
Mucinous
Histology
Well and moderately differentiated
Poorly differentiated
Cellular differentiation
Yes
No
Presence of lymphatic invasion
Yes
No
Presence of perineural invasion
T1-T2
T3-T4
Tumour invasive depth
N0
N1-N2
Lymph node status
I-II
III-IV
AJCC/TNM staging
MGMT
MLH1
MSH2
MPG
OGG1
APE1
PARP1
PolB
XRCC1

Figure 3: Expression changes in direct repair, MMR and BER genes are associated with specific clinical and pathological outcomes in CRC patients. Box plots showing fold change in gene expression between tumor tissue and normal adjacent mucosa (y axis). Horizontal lines represent the median; the bottom and top of the boxes represent the 25th and 75th percentiles, respectively; and the vertical bars represent the range of data.

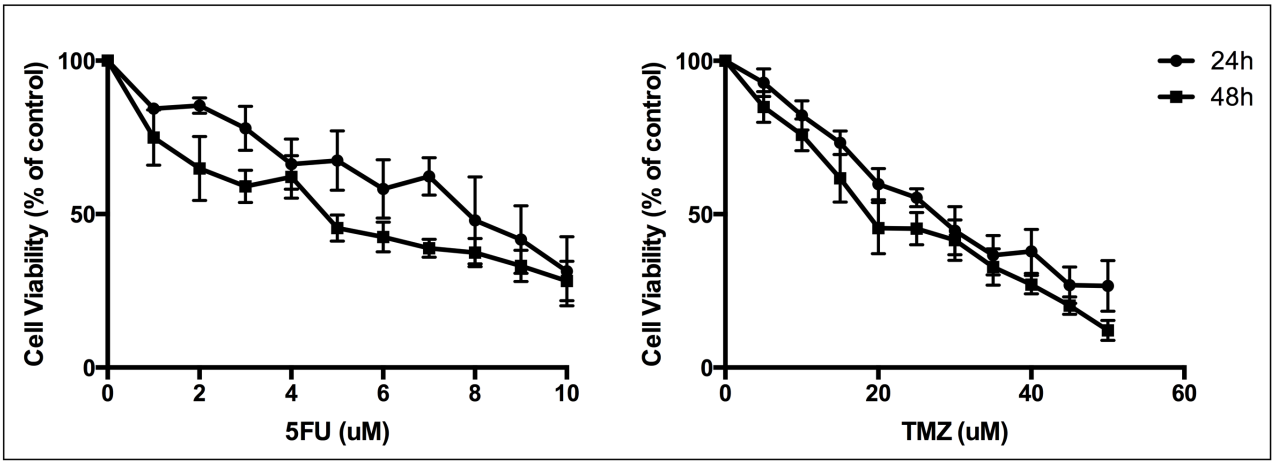
We also verified the associations between clinical and pathological characteristics and protein expression (Supplementary Table 1). Overexpression of MLH1 is associated with tumor location (p=0.002) and tumor invasive depth (p=0.045); high expression of MPG is associated with tumor location (p=0.014), lymphatic invasion (p=0.006) and TNM stage (p=0.008); overexpression of Polβ is associated with perineural invasion (p=0.043); XRCC1 overexpression is associated with histology (p=0.044) and presence of lymphatic invasion (p=0.005); while FEN1 protein expression did not present any significant association with clinical data.

Overexpression of MPG, but not XRCC1, sensitizes colon cancer cells to 5-FU and temozolomide

Since we found that colorectal tumors that present increased MPG and XRCC1 mRNA and protein levels are more prone to unfavorable pathological outcomes, we decided to investigate *in vitro* the potential impact of modulating the levels of these two key BER components on cellular viability after exposure to 5-FU and TMZ. Human cells overexpressing MPG are more sensitive to alkylation-induced damage in a Polβ-dependent manner [19], but no evidence was yet reported for MPG and Polβ levels affecting the cellular response to 5-FU. While 5-FU is a classic first line chemotherapeutic drug in CRC treatment, TMZ is an alkylating agent inducing BER substrates, presently under investigation for metastatic CRC

patients heavily pre-treated but non-responders (Clinical Trials identifiers: NCT01051596, NCT02414009).

We treated colorectal tumor HCT116 cells overexpressing MPG or XRCC1 (Fig 4A, 4B and 4C) with 5-FU (2.5μM and 5μM) (Fig. 4D and 4E) and with TMZ (10μM and 20μM) for 24h and 48h (Fig. 3F and 3G). The above-mentioned doses correspond to the IC_{20} and IC_{50}, respectively, for each drug (Supplementary Figure 2). The MPG overexpressing colon cancer cells were more sensitive to both 5-FU doses after 24h and 48h in comparison to XRCC1-overexpressed cells ($p<0.001$). XRCC1 overexpression did not significantly affect cell viability to 5-FU, while MPG overexpression led to a significant reduction in cellular viability after 5-FU treatment ($p<0.01$), with viability reduced to 31% or 21% 24h or 48h after treatment, respectively. The same scenario was observed after the TMZ IC_{50} treatment: the overexpression of MPG, but not of XRCC1, promoted an increase in cellular sensitivity to TMZ in both time points, and viability was reduced to 28% or 15% 24h or 48h after treatment, respectively ($p<0.01$ for both time points).



Supplementary Figure 2 (S2): Dose-response curves for IC_{20} and IC_{50} calculation of 5-FU and TMZ treatments used in viability and metabolic assays.

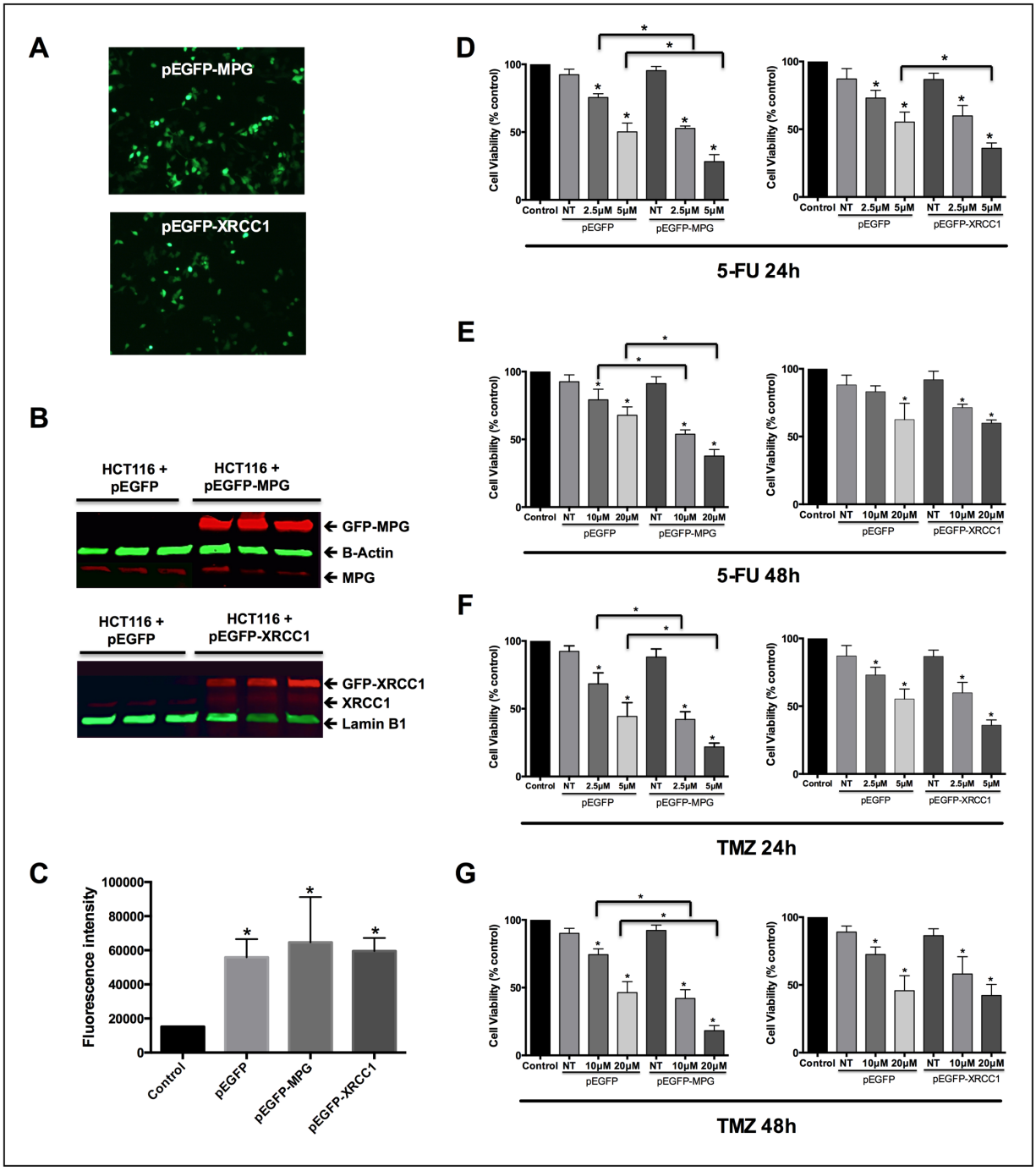
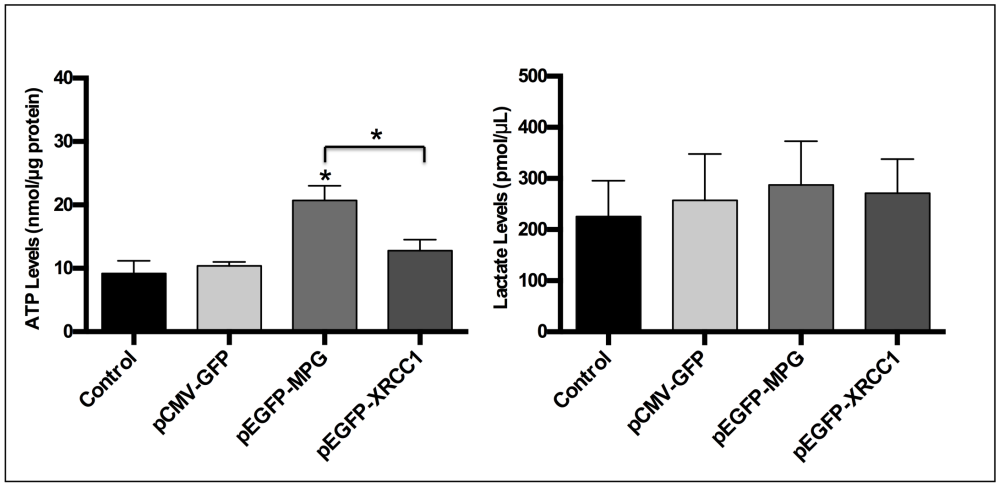


Figure 4: Overexpression of MPG, but not of XRCC1, sensitizes colon cancer cells to 5-FU and TMZ. A, representative photomicrographs of viable HCT116 cells displaying normal cellular morphology and exhibiting green GFP fluorescence 48h after transfection. **B,** Western blot analysis of MPG and XRCC1 protein levels in HCT116 cells 48 hours after transfection.

GFP-MPG protein: 64kD; B-Actin: 42kD; MPG: 37kD; GFP-XRCC1: 112kD; XRCC1: 85kD; Lamin-B1: 66kD. **C,** GFP fluorescence intensity 48h after transfection with the different GFP expressing vector constructs. **D and E**, Viability assessment of cells overexpressing GFP alone, GFP-MPG fusion protein and GFP-XRCC1 fusion protein 24h (D) and 48h (E) after treatment with 5-FU. **F and G**, Viability assessment of cells overexpressing GFP alone, GFP-MPG fusion protein and GFP-XRCC1 fusion protein 24h (F) and 48h (G) after treatment with TMZ. Symbols above the error bars represent statistically significant difference ($p<0.05$) between cells overexpressing GFP alone and cells overexpressing the GFP-fusion proteins.

The increased basal cytosolic ATP levels following MPG overexpression dramatically drops after TMZ treatment in colon cancer cells

In order to understand the mechanisms underlying the increased sensitivity to cytotoxic drugs that MPG - but not XRCC1 - overexpression promotes in colon cancer cells, we considered the possibility that misbalancing BER by MPG overexpression could induce metabolic dysfunctions, such as ATP loss and lactate accumulation. Surprisingly, MPG-overexpressed cells presented a 2-fold increase in cytosolic ATP basal levels (48h after the transfection) in comparison to control ($p<0.001$) and to the XRCC1-overexpressed cells ($p<0.01$), but no basal changes in lactate secretion (Supplementary Figure 3).



Supplementary Figure 3 (S3): Basal cytosolic ATP and extracellular lactate levels 48h after transfection of HCT116 cells with empty, MPG- or XRCC1-expression vectors. *p<0.01.

We then treated cells with 5-FU and TMZ and assessed these parameters one and four hours after treatment (Fig. 5). The treatment with 5-FU (2.5µM) induced a significant reduction in ATP levels in colon cancer cells overexpressing MPG after 1h, but still maintaining the rates greater than control. However, after 4h, a higher reduction in ATP levels occurred with both doses, but with 5µM these levels were equal to the controls (Fig. 5A). Similarly, TMZ treatment led to even greater changes in ATP levels in MPG-overexpressing cells (Fig. 5C). While after 1h of treatment, these cells presented increasing ATP levels with both doses, after 4h, the ATP levels dramatically dropped, becoming even lower than the control cells (transfected with the empty plasmid). In counterpart, we did not observe any changes in ATP levels following 5-FU and TMZ treatments in cells overexpressing XRCC1 (Fig. 5B and 5D).

While 5-FU treatment did not affect lactate secretion levels in either genotype (Fig. 5F and 5G), the lactate levels were altered by TMZ treatment. We observed a substantial time and dose-dependent increase in lactate accumulation in cells overexpressing MPG (Fig. 5G) and a modest one in the XRCC1-overexpressed cells after 4h (Fig. 5H).

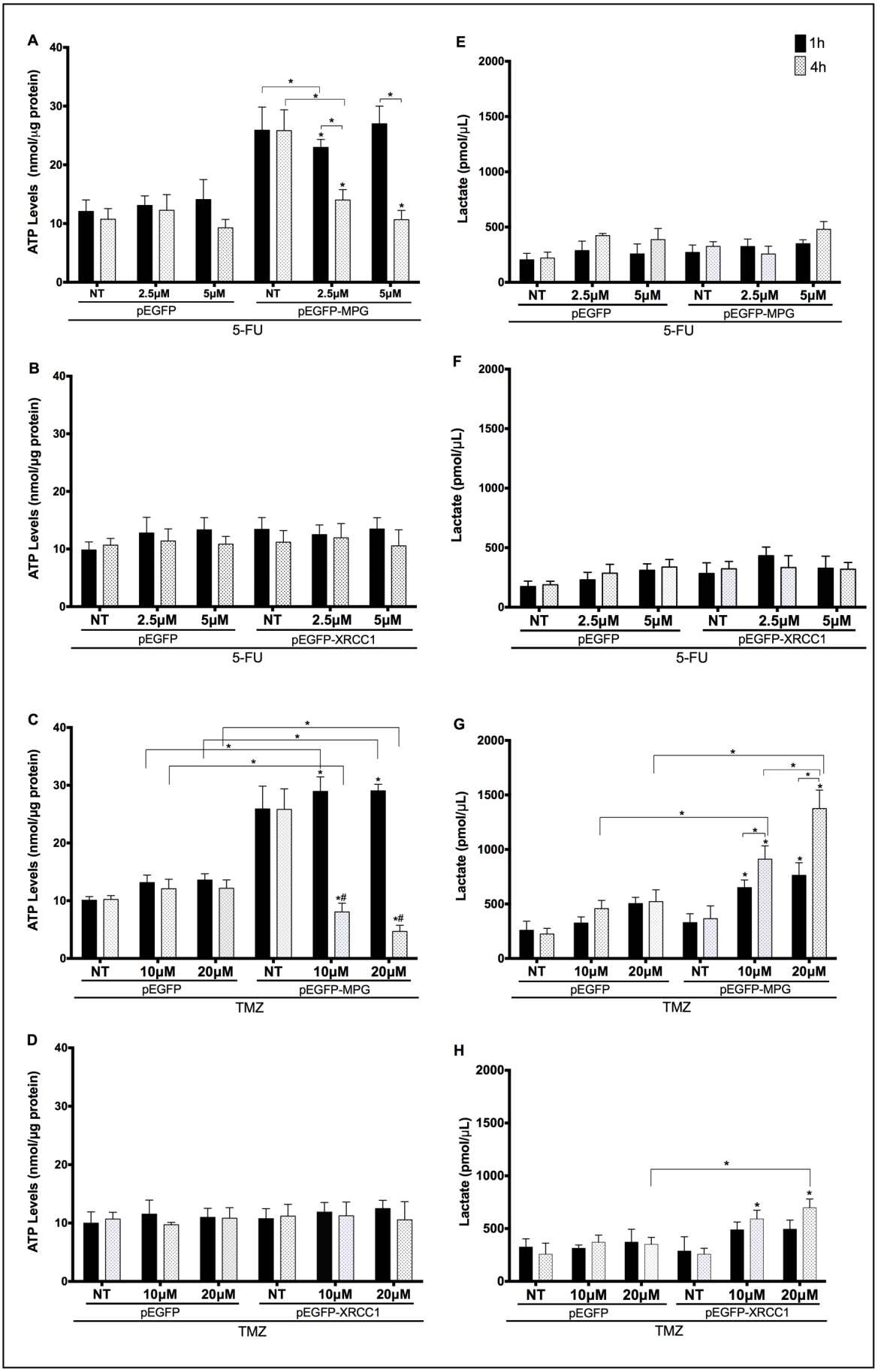

A
ATP Levels (nmol/μg protein)
NT
2.5μM
5μM
pEGFP
pEGFP-MPG
5-FU
B
pEGFP-XRCC1
C
10μM
20μM
TMZ
D
E
1h
4h
Lactate (pmol/μL)
F
G
H

Figure 5: ATP levels are modulated by MPG overexpression and 5-FU and TMZ treatments. A and B, Cytosolic ATP levels in MPG and XRCC1- overexpressing cells treated with 5-FU; **C and D**, Cytosolic ATP levels in MPG and XRCC1- overexpressed cells treated with TMZ; **E and F**, lactate secretion levels in MPG and XRCC1- overexpressed cells treated with 5-FU; **G and H**, lactate secretion levels in MPG and XRCC1- overexpressed cells treated with 5-TMZ. Symbols above the error bars represent statistically significant differences ($p<0.01$) in comparison to the cells transfected with the same plasmid that did not receive treatment. (#) Represents statistically significant differences ($p<0.01$) comparing two time points after treatment. NT: non-treated cells. Comparisons between two data sets (empty plasmid *vs.* plasmid for overexpression) are indicated individually (*$p<0.01$).

Discussion

We investigated if alterations in BER, MMR and direct repair pathways are associated with a particular clinical outcome in CRC and therefore have prognostic value. Here, we report that BER genes are upregulated in a majority of sporadic CRC, represented by increases in MPG, OGG1, APE1, PARP1 and XRCC1 gene and protein expression. We also report the association between these individual repair gene expression levels and poor outcome features in colorectal tumors. However, when we analyzed the entire BER pathway as a whole for each individual CRC case, we noticed that there were no consistent levels of co-expression for the BER proteins, indicating an imbalance or deregulation in this repair mechanism.

The classical relevance of DNA repair in sporadic CRC carcinogenesis is attributed to the inactivation of MMR, by MLH1 and MSH2 loss or silencing [30], which occurs in 15-20% of the patients. While this characteristic is considered to promote better overall survival rate

and modulate the response to 5-FU [31], individual patients with advanced tumor staging still present poor overall response rates (20–30%) [2]. However, nowadays, DNA repair in CRC emerges as a promising strategy for personalized treatment. The DNA damage induced by 5-FU can be repaired by both MMR and BER, and it has been suggested that a crosstalk between these DNA repair pathways modulates cytotoxicity and resistance [32], which turns the DNA repair response to 5-FU both puzzling and promising for CRC therapy tailoring. Thus, a potential approach to enhance the DNA-based mechanisms of 5-FU-mediated cell death is to identify how BER alterations can contribute to evade resistance.

While coordinated BER pathway avoids excessive toxic intermediate formation, such as AP sites and SSBs, and contributes to tumor resistance and lethal outcomes for the patient [11], imbalances in different steps of this pathway (*e.g.,* caused by overexpression, loss or inhibition) are responsible for a wide range of cellular fates. We found that individual overexpression of all studied BER components were associated with clinical features that indicate tumor aggressiveness, such as poorly cellular differentiation, presence of lymphatic and perineural invasions and advanced tumor stage. However, by analyzing the entire BER components set, we can infer that the imbalance (which means that at least three of six BER genes are abnormally modulated) is probably leading to increased tumor aggressiveness. Indeed, the modulation of individual BER enzymes levels implicates in several different phenotypes both *in vivo* and *in vitro*. For example, DNA glycosylase inhibition jeopardizes BER initiation and results in accumulation of cytotoxic and mutagenic base lesions [33]; on the other hand, while overexpression of Polβ increases spontaneous mutagenesis in mammalian cells [34], Polβ downregulation leads to hypersensitivity to alkylation-induced DNA damage [35]. Yet, XRCC1-deficient mammalian cells do not repair SSBs properly, due to inefficient DNA termini clean up and nick ligation [36].

Preclinical and clinical evidence show that MMR deficiency is also associated with poor therapeutic response to a wide range of cytotoxic drugs, such as 5-FU and TMZ, in cell lines and patients [37]. For this reason, we analyzed the patients individually, and 24% of them presented low expression of MLH1 and MSH2 simultaneously, which is known inactivate MMR. In our study, CRC patients expressing low levels of MMR proteins also presented lower expression for MPG, OGG1 and PARP1. 5-FU DNA-mediated toxicity requires MMR, but it also demands BER AP endonucleases, confirming that the crosstalk between these pathways is essential for 5-FU cytotoxicity [38]. Since imbalanced BER can arise either by increased DNA glycosylase activity, or by a decrease in any downstream BER steps [39], we decided to evaluate the effects of this imbalance in cellular viability and chemotherapeutic response. For this, we modulated *in vitro* the levels of two proteins of this pathway that represent upstream (MPG) and downstream (XRCC1) effectors in damaged base repair.

The expression status of a full panel of BER genes had not been previously evaluated in CRC patients, and it is presently unclear to what magnitude MMR and BER collectively contribute to 5-FU and TMZ cellular sensitivity. Using colon cancer HCT116 cells, which are MMR-deficient (h*MLH1*$^{-/-}$ and h*MSH3*$^{-/-}$) and wild type for *TP53*, we were able to show that MPG overexpression results in increased sensitization to 5-FU in colon cancer cells. MPG overexpression was previously reported in some types of neoplasias, including CRC [40, 41], however, to our knowledge, MPG-dependent sensitization to 5-FU in colon cancer cells has not been previously reported. On the other hand, few studies have looked at the involvement of BER components downstream of the DNA glycosylases with regards to 5-FU sensitivity. In agreement with our results, previous reports showed that disrupting BER by XRCC1 depletion did not sensitize cells to 5-FU [41]. That XRCC1 modulation does not affect response to 5-FU is striking given its prominent role in later steps of BER. One possible explanation might be altered sub-pathway choice depending on the cell type examined. For example, long-patch

BER may complete the steps downstream of APE1-mediated incision, during which Polδ/ε performs nucleotide synthesis, flap endonuclease (Fen1) removes the nucleotide overhang, and DNA ligase I seals the nick. Further investigation is necessary to assess whether 5-FU-induced damage is repaired by long–patch BER, making short-patch dispensable.

Interestingly, MPG, but not XRCC1, overexpression resulted in an even greater sensitivity to TMZ in colon cancer cells. The occurrence of chemorefractory disease poses a major therapeutic challenge, especially in advanced CRC. MPG expression does predict temozolomide sensitivity in glioblastoma and ovarian cancer cell lines [16]. However, TMZ has been investigated in clinical trials for CRC [42] supported by the same principle resulted from the association between MGMT loss and increased responsiveness to temozolomide in glioblastoma patients [43]. Indeed, MGMT methylation in CpG islands and low MGMT gene and protein expression appear to be early events in CRC patients [44], which is consistent with our clinical results. In addition, an even better response to TMZ seems to be granted by concomitant downregulation of both MGMT and MPG [45]. However, and in agreement with our results, high levels of MPG were shown to sensitize cells to treatment: studies involving breast, glioma, and ovarian cancer cell lines, reported that MPG overexpression conferred sensitivity to alkylating agents, such as TMZ [19, 40]. In this case, if higher MPG levels lead to BER imbalance and a better response to TMZ, we suggest TMZ treatment would potentially benefit CRC patients and BER imbalance could be used as a new potential biomarker for this emerging CRC therapy.

The increased sensitivity to chemotherapy resulting from MPG overexpression led us to propose energy metabolism alterations may explain this scenario. We therefore decided to measure basal cytosolic ATP levels in both transfected cells types and we found a basal 2-fold increase in cells overexpressing MPG, suggesting that MPG overexpression can lead to higher ATP levels even in the absence of DNA damage induction. Interestingly, *Mpg* knockout mouse

embryonic fibroblasts show a significant decrease in basal ATP levels if compared to wild type (Alhumaydhi and Meira, personal communication).

Subsequently, we observed that both 5-FU and TMZ have sensitized MPG-overexpressing cells followed by ATP depletion and lactate accumulation, pointing out to an energy metabolism disruption that might be underlying this response. Remarkably, while 5-FU treatment reduced the basal ATP levels to normal but had no effect in lactate basal accumulation, TMZ treatment led to a dramatic drop in ATP levels associated with significant increase in lactate secretion to medium, which is compatible to lactic acidosis. The same metabolic scenario was already reported in several physiologically significant outcomes, such as ischemia and diabetes, which have the hypoxic context in common [46, 47]. Since BER failure triggers NAD^+ reduction, ATP-depletion mediated cell death has become critical player in tissue injury [20]. Moreover, in a streptozotocin-induced diabetes model, it was clear that cell death is also dependent on MPG activity-mediated energy imbalance [47], explaining the increased sensitivity mediated by metabolism disruption that we found in MPG, but not XRCC1, overexpressed cells. In addition, lactate accumulation within tumor tissue is chiefly due to the increased glycolytic rate of cancer cells, and it also correlates with metastasis and poor disease-free and overall survival [48]. Despite, cell death can also be mediated by glycolytic genes repression as a cellular response to lactate accumulation, which is associated with significantly increased patient survival rates [49]. This indicates that colon cancer cells response to TMZ treatment via ATP depletion and high lactate may in fact influence patient outcomes.

Our data suggest that BER imbalance characterizes sporadic CRC and affects tumor aggressiveness and patient outcome. However, the identification of the exact point of imbalance in the pathway is crucial to the better tailoring of chemotherapeutic approaches. This is made clear by our results in MMR-deficient colon cancer cells overexpressing either MPG

or XRCC1; we only observed increased sensitivity to 5-FU and TMZ in MPG-overexpressed cells. In addition, alkylation treatment was more cytotoxic than 5-FU, since it also leads to more pronounced metabolism disruption. We believe that assessing MPG expression levels and the identification of MPG overexpressing tumors could represent a therapeutic advantage for MMR-deficient sporadic CRC, since this subtype of colon cancer presents poor response to 5-FU and reduced patient overall survival, but the BER imbalance by MPG upregulation may be the key for resistance evasion.

We therefore propose a model to depict how detecting extreme imbalances in early (such as MPG) or late (such as XRCC1) BER steps can be used as a therapeutic advantage to non-responder tumors (Fig. 6). Our model proposes that the metabolic characteristics of tumor cells contribute to tumor aggressiveness but can also be exploited to improve chemotherapeutic response. BER imbalance in initial steps (such as through MPG overexpression), leads to increased sensitivity to 5-FU and TMZ treatments and energy metabolism disruption. On the other hand, imbalancing BER at later steps (e.g. XRCC1 overexpression) would not significantly alter tumor response to 5-FU or TMZ, since no increase in energy metabolism disruption was observed in XRCC1 overexpressing cells upon 5-FU or TMZ treatment.

In light of our results, we propose TMZ is an attractive candidate for a new chemotherapy approach in CRC. TMZ may be especially effective in MMR-deficient MPG-overexpressing colon cancer cells, concomitantly inducing DNA damage and disrupting metabolism, potentially leading to higher therapeutic efficiency for this subset of CRC patients.

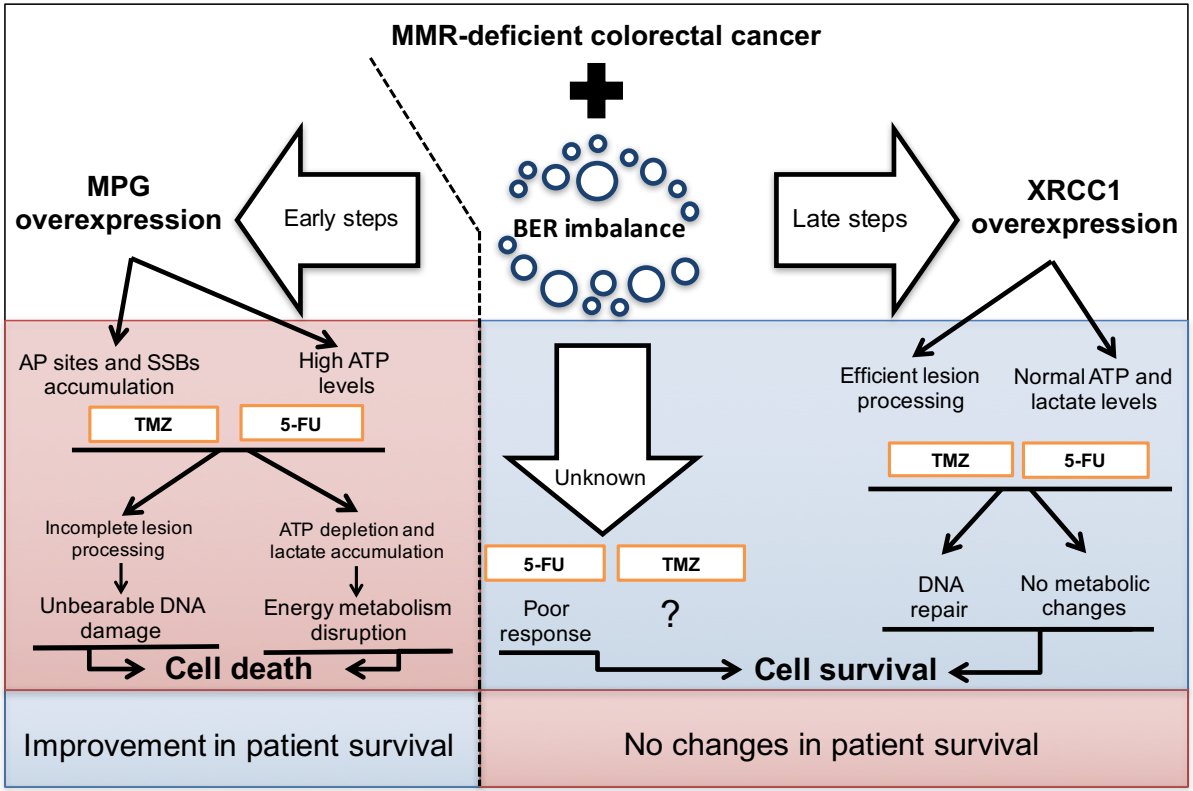


Figure 6: Model depicting the potential therapeutic value of BER status assessment in colorectal cancer. BER pathway imbalance can be therapeutically exploited to benefit MMR-deficient colorectal cancer patients. MMR-deficient sporadic CRC patients derive little benefit from chemotherapy, Modulation of early BER steps (i.e. MPG overexpression) results in enhanced sensitivity to DNA damage and energy metabolism disruption, representing therefore an attractive therapeutic target for this subset of CRC patients.

Conclusions

Our clinical and experimental observations revealed sporadic colorectal tumors display altered BER gene and protein expression, indicative of BER imbalance, which is associated with poor prognosis markers. Using a colorectal cancer model tumor cell line, we find that overexpression of a BER upstream component (MPG), but not downstream (XRCC1), leads to higher sensitivity to 5-FU and TMZ, ATP depletion and lactate accumulation. Our results suggest that evaluation of the BER status in colorectal tumors can help predict therapy effectiveness and raise the interesting possibility that TMZ would be an effective therapeutic approach for CRC.

Material and Methods

Patients

A total of 70 surgically resected fresh tissue specimens comprising of tumor tissues (percentage of tumor cells >70%) and adjacent normal tumor-free regions (non tumor healthy mucosa at >10 cm distance from the tumor) of primary sporadic CRC were collected between 2013 and 2015. Only cases with a primary diagnosis of colorectal cancer undergoing upfront surgery were selected for the purpose of this study. We excluded patients who had received pre-operative treatment in the form of radiation or chemotherapy. We also excluded patients with family history of Familiar Adenomatous Polyposis (FAP) and Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer (HNPCC). Histopathological grades and clinical staging were evaluated according to the standard criteria described in the sixth edition of AJCC/UICC Classification by pathologists blinded for the study purposes. Ethical committees of participating institutions approved the study, and written informed consent was obtained from patients before study enrolment. The study was carried out in accordance with the principles of the Helsinki Declaration.

Quantitative reverse transcription PCR

We evaluated the differential gene expression in colorectal tumors and healthy paired tissues in duplicate by RT2 Profiler™ PCR Array (SABiosciences/Qiagen). The selected genes composing the arrays were: *MPG, OGG1, APEX1, PARP1, POLβ* and *XRCC1* from the BER pathway; *MLH1* and *MSH2* from the MMR pathway; and the direct repair gene *MGMT*.

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 mucosa samples using an 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 analysis was based on the ΔΔCT method with normalization of the raw data to two housekeeping genes (*EIF2B* and *PPIA*).

Immunohistochemistry

MLH1, MPG, FEN1, Polβ and XRCC1 expression in primary tumors was examined from formalin-fixed paraffin-embedded samples. Tissues were sectioned at 4-μm and mounted on silanized slides, which were stored at 4°C. 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-MPG (dilution 1:100, Abcam, mouse, EPR10959(B)), anti-Polβ (dilution 1:500, Abcam, rabbit, ab26343), anti-FEN1 (dilution 1:800, Abcam, rabbit, ab17993), anti-XRCC1 (dilution 1:50, Abcam, mouse, ab1838) and anti-MLH1 (dilution 1:100, Abcam, ab92312) antibodies, and then incubated with appropriate secondary antibodies (DAKO). Diaminobenzidine (DAB) was used as chromogen and the sections were counterstained with haematoxylin. Omission of the primary antibody was used as a negative control. Protein expression was evaluated using Quick Score (QS) (by assessing both staining intensity and the percentage of the stained area with a given intensity) and dichotomized in low (score between 0 and 4) and high expression (score between 5 and 12). Only stained nuclei of malignant cells were assessed.

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. Non-representative samples or samples with only a few tumor cells (<100) were excluded from the analysis. 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). Protein expression levels was 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 cells, 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. In Figure S1, we present representative images for each score.

Cell culture and transfection

The human colorectal cancer cell line HCT116 (ATCC® CCL-247™). was obtained from the American Type Culture Collection. This cell line was originally obtained from ATCC, which performs cell line characterizations, prior to February 2015. The authors did not authenticate this cell line. HCT116 was cultured in McCoy's 5A Medium (Gibco) containing 10% FBS (Sigma), penicillin (10^7 U/L) and streptomycin (10 mg/L), maintained at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator. The plasmid allowing for the overexpression of a GFP-MPG fusion protein was a kind gift from Clara F. Charlier in the Meira lab, while the GFP-XRCC1 fusion construct was a kind gift from Dr Akira Yasui. For transient transfections, cells were seeded into 96-well plates (at $1x10^4$ cells per well) at 70% to 80% confluence. After 24 hours, cells were transfected with Lipofectamine 2000 following the manufacturer's protocol (Invitrogen), with 1μg plasmid DNA. After 5 hours of incubation at 37°C, the transfection medium was replaced with complete medium. All experiments were performed in triplicate

and 48h after the transfection. Basal values correspond to the 48h post-transfection time point but without intervention.

Cytotoxic drugs treatment

5-FU and TMZ were purchased from Sigma-Aldrich and reconstituted in DMSO, aliquoted and maintained at -20°C. 48h after transfection, chemotherapeutic agents at the desired concentrations were added into each well and plates were incubated for 24h and 48h (for viability assays) or for 1h and 4h (for metabolic measurements) in an incubator with 5% CO_2 at 37°C.

Cell viability assay

Viability was assessed with the CellTiter-Aqueous MTS reagent (Promega), 24 and 48 h post-treatment. Briefly, MTS reagent was added into each well and incubated for 3h with 5% CO_2 at 37°C. MTS absorbance was then measured at 490nm. Results are reported as the percentage of treated cells relative to the cells without treatment (% Control).

Western Blot

Cell lysates were obtained with mammalian cell lysis buffer M-PER (PIERCE) containing protease inhibitors (Sigma). Protein content was determined with the BCA Protein Assay according to manufacturer's instructions (Pierce, Thermo Fisher Scientific). Twenty micrograms of protein lysate was loaded onto a SDS-PAGE gel (Bio-Rad) and transferred eletrophoretically onto a polyvinylidene fluoride membrane. The membranes were blocked overnight with PBS containing 0.1% Tween 20 in 5% skim milk at 4°C and subsequently probed using the following primary antibodies: anti-MPG (1:250, Sigma, HPA006531), anti-XRCC1 (1:500, Abcam, ab1838), anti-β-Actin (1:2000, Abcam, mouse ab6276 and rabbit

ab52614) and anti-Lamin-B1 (1:2000, mouse ab8983 and rabbit ab133741). Detection followed by incubation with IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG or IRDye 680RD Goat anti-Mouse IgG (both from LI-COR). Membranes were scanned using an Odyssey CLx infrared imaging system (LI-COR Biosciences).

ATP and lactate measurements

For lactate measurements, medium was sampled from cells 1h and 4h after treatment and deproteinized with Amicon centrifugal filters (Merck Millipore) for lactate dehydrogenase removal. Colorimetric method was performed with lactate assay kit (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. Absorbance was read at 570 nm.

For ATP measurements, cells were lysed with digitonin-based buffer (Cayman). Intracellular ATP was determined by a luciferin/luciferase method using an ATP bioluminescent assay kit (Sigma-Aldrich). Luminescence was measured using a 96-well plate luminometer. Cytosolic ATP content was calculated by an ATP standard curve and normalized to cellular protein content/well.

Statistical Analysis

Clinical data was analyzed using SPSS version 22.0 (SPSS Inc.). Qualitative variables were compared using the $\chi 2$ Test and Fisher's exact test; and quantitative variables were analyzed by the *t* test. Univariate analysis of clinical factors including age, sex, TNM stage, tumor invasion, lymph node metastases, cellular differentiation, location and tumor size was assessed by the log-rank test. Experimental data was analyzed with GraphPad Prism 6 software (GraphPad) and statistical analysis carried out by two-way ANOVA and Tukey's post-hoc. The results were considered statistically significant when p-value was less than 0.05.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Grant support

This research was supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul – FAPERGS (no. 1313-2551/13-8), Coordenação de Apefeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES and Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq.

References

1. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2015;65(1):29.
2. 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 2011;305(22):2335–2342.
3. O'Connell MJ, Campbell ME, Goldberg RM, Grothey A, Seitz J-F, Benedetti JK, André T, Haller DG, Sargent DJ. Survival following recurrence in stage II and III colon cancer: findings from the ACCENT data set. J Clin Oncol 2008;26(14):2336–2341.
4. 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.
5. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. Nat Rev Cancer 2003;3(5):330–338.
6. Brocardo MG, Borowiec JA, Henderson BR. Adenomatous polyposis coli protein regulates the cellular response to DNA replication stress. Int J Biochem Cell Biol 2011;43(9):1354–1364.
7. Martino-Echarri E, Henderson BR, Brocardo MG. Targeting the DNA replication checkpoint by pharmacologic inhibition of Chk1 kinase: a strategy to sensitize APC mutant colon cancer cells to 5-fluorouracil chemotherapy. Oncotarget 2014; 5(20): 9889-9900.
8. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. Nature 2012;481(7381):287–294.
9. Iwaizumi M, Stephanie TR, Carethers JM. DNA mismatch repair proficiency executing 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells. Cancer Biol Ther 2011;12(8):756–764.
10. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, French AJ, Kabat B, Foster NR, Torri Vm Ribic C, Grothey A, Moore M, et al. Defective mismatch

repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. J Clin Oncol 2010;28(20):3219–3226.

11. Wallace SS. Base excision repair: A critical player in many games. DNA Repair (Amst) 2014; 19:14-26.
12. Broderick P, Bagratuni T, Vijayakrishnan J, Lubbe S, Chandler I, Houlston RS. Evaluation of NTHL1, NEIL1, NEIL2, MPG, TDG, UNG and SMUG1 genes in familial colorectal cancer predisposition. BMC Cancer 2006;6:243.
13. 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):17333–17343.
14. Obtułowicz T, Swoboda M, Speina E, Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Janik J, Janowska B, Ciesla JM, Jawien A, Banaskiewicz Z, Dziamn T, et al. Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. Mutagenesis 2010;25(5):463–471.
15. Dietlein F, Reinhardt HC. Molecular pathways: Exploiting tumor-specific molecular defects in DNA repair pathways for precision cancer therapy. Clin Cancer Res 2014; 20(23): 5882–5887.
16. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. Nat Rev Cancer 2010;10(4):293–301.
17. 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(1):2–10.
18. Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. Nat Rev Cancer 2012;12(2):104–120.

19. Tang JB, Svilar D, Trivedi RN, Wang XH, Goellner EM, Moore B, Hamilton RL, Banze LA, Brown AR, Sobol RW. N-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase beta modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to temozolomide. Neuro Oncol 2011;13(5):471–486.

20. Goellner EM, Grimme B, Brown AR, Lin YC, Wang XH, Sugrue KF, Mitchell L, Trivedi RN, Tang JB, Sobol RW. Overcoming temozolomide resistance in glioblastoma via dual inhibition of NAD^+ biosynthesis and base excision repair. Cancer Res 2011;71(6):2308-2317.

21. Fouquerel E, Goellner EM, Yu Z, Gagné, JP, de Moura, MB, Feinstein T, Wheeler D, Redpath P, Li J, Romero G, Migaud M, Van Houten B, Poirier GG, et al. ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase 1 independent of NAD^+ depletion. Cell Rep 2014;8(6): 1819-1831.

22. Andrabi SA, Umanah GKE, Chang C, Stevens DA, Karuppagounder SS, Gagné JP, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. Proc Natl Acad Sci 2014;111(28):10209–10214.

23. Formentini L, Macchiarulo A, Cipriani G, Camaioni E, Rapizzi E, Pellicciari R, Moroni F, Chiarugi A. Poly(ADP-ribose) catabolism triggers AMP-dependent mitochondrial energy failure. J Biol Chem 2009;284(26):17668–17676.

24. Zhou Y, Tozzi F, Chen J, Fan F, Xia L, Wang J, Gag G, Zhang A, Xia X, Brasher H, Widger W, Ellis LM, Weihua Z. Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. Cancer Res 2012;72(1):304–14.

25. Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. Nutr Metab (Lond). 2010;7:7.

26. Tang J, Goellner EM, Wang X, Trivedi RN, St Croix CM, Jelezcova E, Svilar D, Brown AR, Sobol RW. Bioenergetic metabolites regulate base excision repair-dependent cell death in response to DNA damage. Mol Cancer Res 2010;8(1):67–79.

27. Shima K, Morikawa T, Baba Y, Nosho K, Suzuki M, Yamauchi M, Hayashi M, Giovanucci E, Fuchs CS, Ogino S. MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. Cancer Causes Control 2011;22(2):301–309.
28. Nagasaka T, Goel A, Notohara K, Takahata T, Sasamoto H, Uchida T, Nichida N, Tanaka N, Boland CR, Matsubara N. Methylation pattern of the O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis. Int J Cancer 2008; 122(11): 2429-2436.
29. Casorelli I, Russo MT, Bignami M. Role of mismatch repair and MGMT in response to anticancer therapies. Anticancer Agents Med Chem 2008;8(4):368–380.
30. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. Gastroenterology 2015;149(5):1177–1190.
31. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni, S, Monges, G, Labianca, R, Kim GP, Yothers G, Allegra C, Moore MJ, Gallinger S, Sargent DJ. 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):863-875.
32. Wyatt MD, Wilson DM. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. Cell Mol Life Sci 2009. p. 788–799.
33. Paik J, Duncan T, Lindahl T, Sedgwick B. Sensitization of human carcinoma cells to alkylating agents by small interfering RNA suppression of 3-alkyladenine-DNA glycosylase. Cancer Res 2005; 65(22): 10472–10477.
34. Albertella MR, Lau A, O'Connor MJ. The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer. DNA Repair (Amst) 2005; 4(5): 583–593.
35. Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. J Clin Oncol 2008; 1;26(22):3785-3790.

36. Horton JK, Watson M, Stefanick DF, Shaughnessy DT, Taylor JA, Wilson SH. XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. Cell Res 2008;18(1):48–63.

37. Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2008;8(3):193–204.

38. SenGupta T, Torgersen ML, Kassahun H, Vellai T, Simonsen A, Nilsen H. Base excision repair AP endonucleases and mismatch repair act together to induce checkpoint-mediated autophagy. Nat Commun 2013;4:2674.

39. Calvo JA, Moroski-Erkul CA, Lake A, Eichinger LW, Shah D, Jhun I, Limsirichai P, Bronson RT, Christiani DC, Meira LB, Samson LD. Aag DNA Glycosylase Promotes Alkylation-Induced Tissue Damage Mediated by Parp1. PLoS Genet 2013;9(4):1–13.

40. Song S, Xing G, Yuan L, Wang J, Wang S, Yin Y, Tian C, He F, Zhang L. N-methylpurine DNA glycosylase inhibits p53-mediated cell cycle arrest and coordinates with p53 to determine sensitivity to alkylating agents. Cell Res 2012;22(8):1285–1303.

41. Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, Hussain SP, Roth RB, Zhou X, Mechanic LE, Zurer I, Rotter V, Samson LD, et al. The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. J Clin Invest 2003;112(12):1887–1894.

42. Hochhauser D, Glynne-Jones R, Potter V, Gr Avalos C, Doyle TJ, Pathiraja K, Zhang Q, Zhang L, Sausville EA. A Phase II Study of Temozolomide in Patients with Advanced Aerodigestive Tract and Colorectal Cancers and Methylation of the O^6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter. Mol Cancer Ther 2013; 12(5): 809-818.

43. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with

clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. J Clin Oncol 2008; 26(25): 4189–4199.

44. Melguizo C, Prados J, González B, Ortiz R, Concha A, Alvarez PJ, Madeddu R, Perazzoli G, Oliver JA, López R, Rodríguez-Serrano F, Aránega A. MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy. J Transl Med 2012;10:250.
45. Agnihotri S, Burrell K, Buczkowicz P, Remke M, Golbourn B, Chornenkyy Y, Gajadhar A, Fernandez NA, Clarke ID, Barszczyk MS, Pjovic S, Ternamian C, Head R, et al. ATM Regulates 3-Methylpurine-DNA Glycosylase and Promotes Therapeutic Resistance to Alkylating Agents. Cancer Discov 2014;4(10):1198–1213.
46. Robbins NM, Swanson RA. Opposing effects of glucose on stroke and reperfusion injury: acidosis, oxidative stress, and energy metabolism. Stroke 2014;45(6):1881-1886.
47. Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta a, Blackshaw S, Verma A, Wang ZQ, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. Proc Natl Acad Sci 1999;96(6):3059–3064.
48. Kennedy KM, Scarbrough PM, Ribeiro A, Richardson R, Yuan H, Sonveaux P, Lndon CD, Chi JT, Pizzo S, Schroeder T, Dewhisrt MW. Catabolism of Exogenous Lactate Reveals It as a Legitimate Metabolic Substrate in Breast Cancer. PLoS One 2013;8(9).
49. Chen JL-Y, Lucas JE, Schroeder T, Mori S, Wu J, Nevins J, Dewhirst M, West M, Chi JT. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. PLoS Genet 2008;4(12)

CAPÍTULO II

Neste artigo original a ser submetido, analisamos a expressão gênica e proteica de componentes da via do reparo do DNA por excisão de nucleotídeos em tumores colorretais e tecidos saudáveis e sua associação com aspectos prognósticos conferidos pelas ferramentas atuais de estadiamento da doença, bem como com os diferentes perfis da via de reparo de mal pareamento.

4. CAPÍTULO II

Manuscript title: Prognostic impact of changes in nucleotide excision repair machinery in sporadic colorectal cancer.

Natalia M. Leguisamo [1,] (nmleguisamo@gmail.com)
Helena C. Gloria [1](helenadecastroegloria@gmail.com)
Daniel B. Azambuja [2] (dazambuja@uol.com.br)
Talita V. Martins (talitavilamar@bol.com.br)
Antonio Nocchi Kalil [2] (ankalil@terra.com.br)
Jenifer Saffi[1*] (jenifers@ufcspa.edu.br)

[1] *Genetic Toxicology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*
[2] *Oncology and Colorectal Surgery, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

*****To whom correspondence should be addressed. *Laboratory of Genetic Toxicology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.* Tel: +55 51 33038861.

Keywords: Colorectal cancer; nucleotide excision repair; prognosis.

Abstract

Background: Colorectal cancer (CRC) pathological staging still fails to accurately predict prognosis, recurrence and chemosensitivity. Nevertheless, no molecular panel has proven reliable for better stratification in clinical practice. Alterations in nucleotide excision repair (NER) expression levels caused by loss, inhibition or overexpression are associated with poor outcomes and resistance to chemotherapy in various cancer types and might be promisor as a tool for current staging refinement in CRC patients.

Methods: Pre-treatment tumor samples from 70 patients with sporadic colorectal adenocarcinoma were assessed for 6 NER gene and protein expression by qPCR and immunohistochemistry, respectively. MLH1 gene and protein expression were used to determine the mismatch repair status (proficient or deficient) of each patient. The molecular data were analyzed in relation to clinical features and TNM staging as a prognosis predictor.

Results: All NER studied components were found to be altered in colorectal tumors in comparison to healthy intestinal tissues. The reduction of CSB and XPG were associated with poor pathological outcomes (poorly differentiated tumors, advanced TNM stages and more invasive tumors). On the other hand, higher levels of ERCC1 and XPF were associated with unfavorable pathological outcomes, such as tumor poorly differentiated and mucinous, as well as the presence of lymphatic invasion. Gene and protein expression of ERCC1, XPD and XPG were strongly correlated. No associations were found between XPA mRNA levels and pathological features. Moreover, there is no difference in NER profile expression in different MMR patients' profiles (proficient or deficient).

Conclusions: Our findings indicate that specially deficiencies in NER pathway could play a role in the aggressiveness of colorectal cancer, since there are many associations with clinical features of tumor aggressiveness, such as presence of lymphatic and perineural invasion and advanced TNM stages. Thus, the NER proteins appear to be suitable candidates to refine the TNM current staging of colorectal cancer. Nevertheless, to propose these proteins as prognostic biomarkers, it is imperative to understand if they are part of colorectal cancer's etiology or a side effect of its development.

Keywords: Colorectal cancer; nucleotide excision repair; mismatch repair; prognosis.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the fourth leading cause of cancer-related death worldwide, resulting in over 690 000 deaths annually (1). Recently, decreasing CRC mortality rates have been recorded in developed countries, most likely due to larger efforts in cancer screening and improved treatments (2). Currently, the primary method for assessing prognostic differences among patients is the tumor-node-metastasis (TNM) staging system, developed by the American Joint Committee on Cancer (AJCC) and the International Union Against Cancer (UICC) (3). While stage I disease usually can be cured by surgery alone, patients with high-risk stage II, III or IV disease are recommended for chemotherapy in the adjuvant or palliative setting (3). CRC is recognized as a multifactorial, heterogeneous disease based on the fact that even histologically similar tumors present significant variation in outcome of patients within the same tumor stage (4, 5). With the exception of KRAS mutational status for selection of biologic therapy, no predictive or prognostic biomarker has yet been validated (6, 7).

While in the etiopathogenesis of inherited CRC forms the influence of particular genetic features predominates, sporadic forms (around 80% of all cases) show a multifactorial pattern, which are determined by an interaction of numerous genetic, environmental and lifestyle elements (reviewed in 8). Colon epithelium is one of the most continuously regenerated tissues in the body. It consequently has increased susceptibility to a wide range of mutagens present both in the bowel contents or in the blood. Cigarette smoking, alcohol, red meat, or processed saturated fat have been established CRC risk factors through the production of strong DNA-reactive compounds (9). Thus, keeping in mind the significance of DNA repair in the disease progress and the influence over the effectiveness of anticancer therapy, it seems realistic to consider a classification of tumors based on DNA repair features.

In this context, mismatch repair (MMR) pathway comprises the classical relevance in CRC pathogenesis, since the microsatellite instability (MSI) subgroup accounts for 15 % of early-stage and 3 % of metastatic CRCs, and are a result of pathogenic mutations or epigenetic changes in MMR proteins, primarily MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 (10). MMR is responsible for correcting replication errors such as base-base mismatches and polymerase slippage products (i.e. insertion/deletion loops) at nucleotide repeat sequences. CRC patients with deficient MMR tumor have distinct clinical and pathologic features, such as proximal colon predominance, poor differentiation and mucinous histology, with increased numbers of tumor-infiltrating lymphocytes (11). In vitro studies indicate resistance of MSI-high tumors to various chemotherapeutic agents, such as 5-Fluorouracil (5-FU) and cisplatin (reviewed in 12).

Another DNA repair pathway, the nucleotide excision repair (NER), repairs a great variety of DNA lesions, for example pyrimidine dimers, bulky DNA adducts and intrastrand DNA cross-links, which all distort the DNA double helix. The classic NER pathway involves roughly thirty proteins operating in a coordinated manner. NER proceeds through a series of steps, starting with damage recognition, DNA uncoiling, incision and removal of the DNA-strand around the damage and lastly DNA synthesis and ligation (12). In addition to functioning in global genome repair (GG-NER), NER maintains a specialized pathway, termed transcription-coupled NER (TC-NER), which specifically deals with lesions on the transcribed strand of DNA that block RNA polymerase progression. These two NER pathways are thought to differ only at the lesion recognition step, but utilize common machinery to execute the final steps of the repair response (13).

No study has to date reported any defect in NER in any form of CRC or its association with MMR status. However, a number of studies have examined whether there is a correlation between NER gene polymorphisms and colorectal cancer risk (14, 15). The results, though, remain unconvincing and do not offer any clear way regarding their participation in the

malignant transformation, but rather might contribute to chemoresistance and growth advantage of tumor cells. Hence, since oxaliplatin is one of the main agents used in the treatment of CRC for patients diagnosed with TNM stage III and IV and provokes bulky DNA adducts classically thought to be repaired by the NER pathway (reviewed in 16), some studies have been exploring NER components gene and protein expression in CRC tumor tissue as a prognostic marker for therapy outcome (17, 18).

Bearing in mind that division of colorectal cancers into molecular subsets yields important consequences for prognosis and therapeutic response, it seems quite reasonable to consider a categorization of tumors based on DNA repair characteristics. The aim of the present study was to compare NER gene and protein expression profiles in colorectal adenocarcinomas matched with adjacent healthy mucosa from 70 newly diagnosed patients with CRC and to investigate if possible alterations in this pathway have associations with classic prognostic factors and MMR status.

Material and Methods

Study patients and collection of biologic specimen

The study included seventy patients with sporadic CRC who underwent surgical resection between 2013 and 2015. Fresh tissue specimens comprising of tumor tissues (percentage of tumor cells >70%) and adjacent normal tumor-free regions (non tumor healthy mucosa at >10 cm distance from the tumor) of primary sporadic CRC were collected. All patients signed informed consent. Ethics approval was granted by the appropriate committees (no. 34145614.9.0000.5335 and 09761613.4.0000.5345). Only cases with a primary diagnosis of colorectal cancer undergoing surgery were selected for the purpose of this study. Patients were excluded if at least one of the follow criteria was identified: suspicion or register of hereditary colorectal cancer (familial adenomatous polyposis and hereditary non-polypoid colorectal cancer); presence of colorectal cancer associated with inflammatory bowel disease; realization of neoadjuvant chemoradiation therapy. Histopathological grades and clinical staging were evaluated according to the standard criteria described in the sixth edition of AJCC/UICC Classification by pathologists blinded for the study purposes.

Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

We evaluated the differential gene expression in colorectal tumors and healthy paired tissues in duplicate by RT2 Profiler™ PCR Array (SABiosciences/Qiagen). The selected genes composing the arrays were: *XPA, XPD, XPF, CSB, ERCC1* from the NER pathway and *MLH1* and *MSH2* from the MMR 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 mucosa samples using an 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 analysis was based on the ΔΔCT method with normalization of the raw data to two housekeeping genes (*EIF2B* and *PPIA*).

Immunohistochemistry

Mlh1, Xpd, Xpg and Ercc1 proteins expression in primary tumors were examined from formalin-fixed paraffin-embedded samples. Tissues were sectioned at 4-µm and mounted on silanized slides, which were stored at 4°C. 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-Xpd (dilution 1:200, Abcam, rabbit, EPR9675, ab167418), anti-Xpg (dilution 1:200, Abcam, rabbit, ab189317), Ercc1 (dilution 1:200, Spring Bioscience, rabbit, SP68) and anti-Mlh1 (dilution 1:100, Abcam, EPR3894, ab92312) antibodies, and then incubated with appropriate secondary antibodies (DAKO). Diaminobenzidine (DAB) was used as chromogen and the sections were counterstained with haematoxylin. Omission of the primary antibody was used as a negative control. Protein expression was evaluated using Quick Score (QS) (by assessing both staining intensity and the percentage of the stained area with a given intensity) and dichotomized in low (score between 0 and 4) and high expression (score between 5 and 12). Only stained nuclei of malignant cells were assessed.

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. Non-representative samples or samples with only few tumor cells (<100) were excluded from the analysis. 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). Protein expression levels was 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 cells, 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.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software version 22.0. Immunohistochemistry and clinical features correlations were analyzed through contingency tables, chi-square ($\chi 2$) test and Fisher's exact test. Quantitative variables were analyzed by the *t* or Mann-Whitney tests. Univariate analysis of clinical factors including age, sex, TNM stage, tumor invasion, lymph node metastases, cellular differentiation, location and tumor size was assessed by the log-rank test. All statistical tests were two sided and $p \leq 0.05$ was considered significant.

Availability of data and materials

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

Results

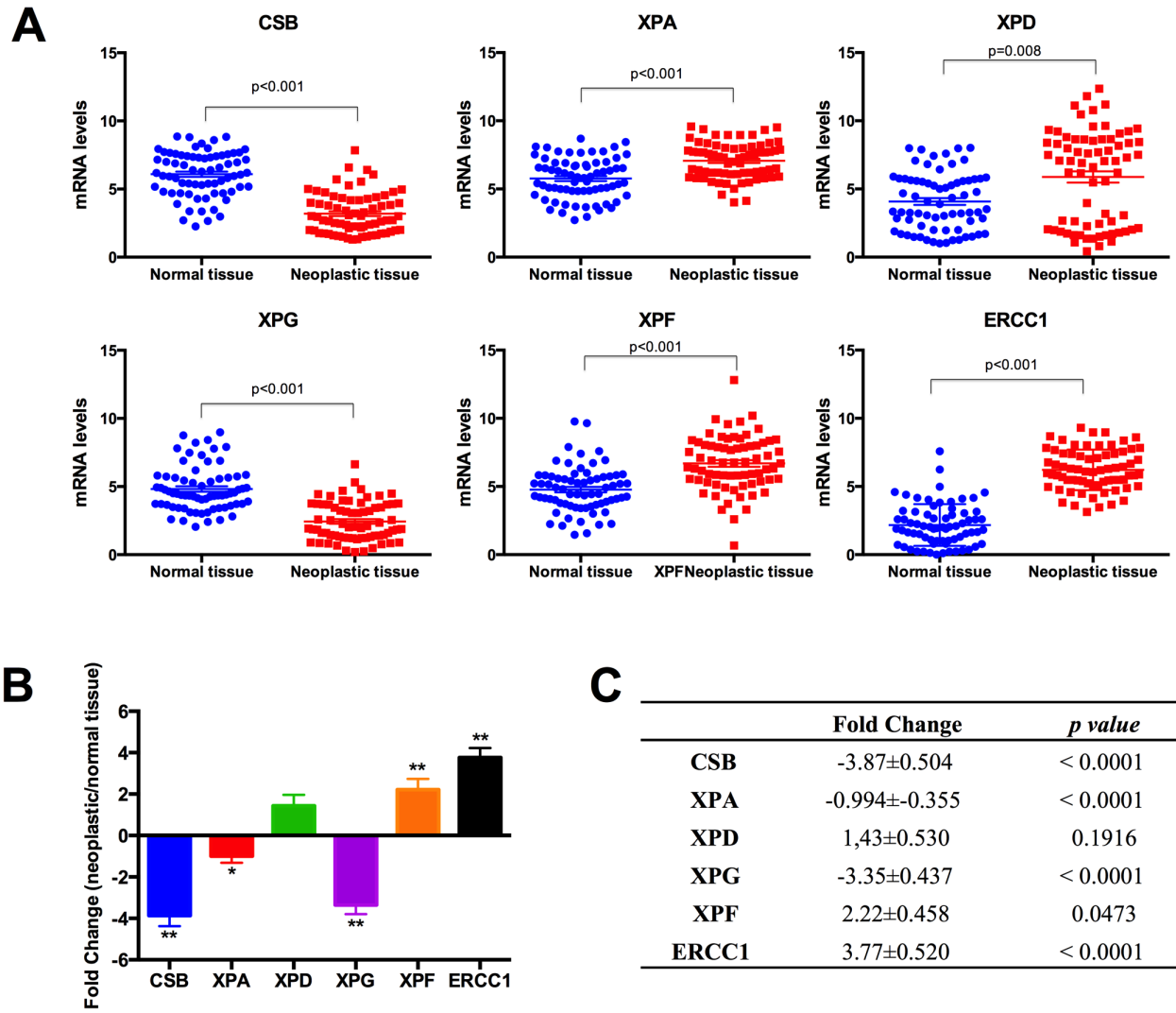
Changes in NER gene and protein expression levels have prognostic value in sporadic colorectal cancer

The group of patients (showed in Table 1) included 38 (54%) men and 32 (26%) women with a mean age of 67,7 years old (±11). The clinical stage of patients at diagnosis was classified according to the tumor–node–metastasis (TNM) system, 41 patients were diagnosed with pathologic stage I or II (59%), 29 as stage III or IV (41%). The histology indicates 60 (85%) patients with adenocarcinoma and 10 (15%) patients with mucinous tumors. 42 patients had tumor localized in the colon (60%) and 28 in the rectum (40%). In 30 patients (43%), tumors were of well-or moderately differentiated grade, and in 40 patients (57%) poorly differentiated.

The mRNA levels for *CSB, XPA, XPD, XPG, XPF* and *ERCC1* were quantified using qPCR in 70 pairs of primary sporadic colorectal tumors and adjacent healthy mucosal tissues. *CSB* mRNA levels were reduced (-3.87; $p<0.0001$) in the mucosal tissue in comparison to tumors, as shown in Fig 1B. On the scatterplot (fig.1A), by analyzing the patients individually, we found difference in *XPA* mRNA levels between tumor and normal tissue ($p<0.001$). However, in the fold change, on average, we can infer that *XPA* is downregulated is neoplastic tissues (-0.994; $p<0.0001$). On average there was no significant overexpression of *XPD* in the tumor tissue as shown in the fold change (Fig. 1B), however this overexpression can be seen in the scatterplot (Fig. 1A) in the individual analysis. *XPG* mRNA levels (-3.35; $p<0.0001$) were reduced (Fig 1C) in the tumors. We found overexpression of XPF (2.12; $p<0.01$) and *ERCC1* (3.6; $p<0.001$) in the neoplastic tissue.

Table 1: Clinicopathological profile of patients with colorectal adenocarcinoma (n=70). CEA: carcinoembryonic antigen.

Variable	n (%)
Total cases	70
Age (mean± SD)	67.7± 11
Age, y	
≤65	30 (43)
>65	40 (57)
Gender	
Male	38 (54)
Female	32 (46)
Tumour location	
Colon	42 (60)
Rectum	28 (40)
Histology	
Adenocarcinoma	60 (85)
Mucinous	10 (15)
Cellular differentiation	
Well or moderately differentiated	30 (43)
Poorly differentiated	40 (57)
Tumour invasive depth	
T1-T2	20 (29)
T3-T4	50 (71)
Lymph node status	
N0 (*n=0*)	19 (27)
N1 (*n≤3*)	26 (37)
N2 (*n>3*)	15 (21)
Lymphatic invasion	
No	38 (54)
Yes	32 (46)
Perineural invasion	
No	44 (63)
Yes	26 (37)
Preoperative CEA, ng/mL	
≤5	42 (60)
>5	28 (40)
AJCC/TNM stage	
I-II	41 (59)
III	29 (41)



C

	Fold Change	*p value*
CSB	-3.87±0.504	< 0.0001
XPA	-0.994±-0.355	< 0.0001
XPD	1,43±0.530	0.1916
XPG	-3.35±0.437	< 0.0001
XPF	2.22±0.458	0.0473
ERCC1	3.77±0.520	< 0.0001

Figure 1: NER genes are differentially expressed between sporadic colorectal tumors and healthy adjacent mucosa and correlate with pathological features of tumor aggressiveness. A, Gene expression was quantified for a panel of DNA repair genes by real-time qPCR analysis in neoplastic and normal mucosal tissues from 70 patients with sporadic colorectal cancer. The following genes were examined: *CSB, XPA, XPD, XPG, XPF* and *ERCC1*. Gene expression data are shown as scatter diagrams. **B and C,** Fold change (neoplastic/normal tissue). *p<0.05; **p<0.0001

The distribution of intensities of NER proteins Ercc1, Xpd and Xpg and MMR protein Mlh1 staining and the correlation with clinical features are shown in table 2 and, in figure 3, we show the representative images of immunohistochemistry positive staining for ERCC1 (Fig 3A), XPD (Fig 3B) and XPG (Fig 3C). ERCC1 overexpression was found in 47% of the cases and presented very consistent associations with clinical features of tumor aggressiveness, such as tumor location (p= 0.045), cellular differentiation (p=0.041) and lymphatic invasion (p=0.026). However, differently from ERCC1 gene expression correlation, there was no association between ERCC1 protein levels and histological tumor type (p=0.739). Regarding XPD, 60% of the cases shown low expression of this protein in tumor tissue. However, high levels of XPD protein content were associated with low preoperative CEA (p=0.038). Finally, 80% of all cases presented low contents of XPG in the colorectal tumors and it was associated with stage III tumors (p=0.038) and tumor invasive depth (p=0.028). None of these associations for XPD and XPG were found for gene expression levels, although the gene and protein expression of these three NER components were found strongly correlated (ERCC1: 0.944; p<0.0001; XPD: 0.292; p=0.014; XPG: 0.429; p<0.0001). MMR repair protein MLH1 were underexpressed in only 15% of the cases and presented association with colon tumor location (p=0.002) and smaller tumor invasive depth (p=0.045).

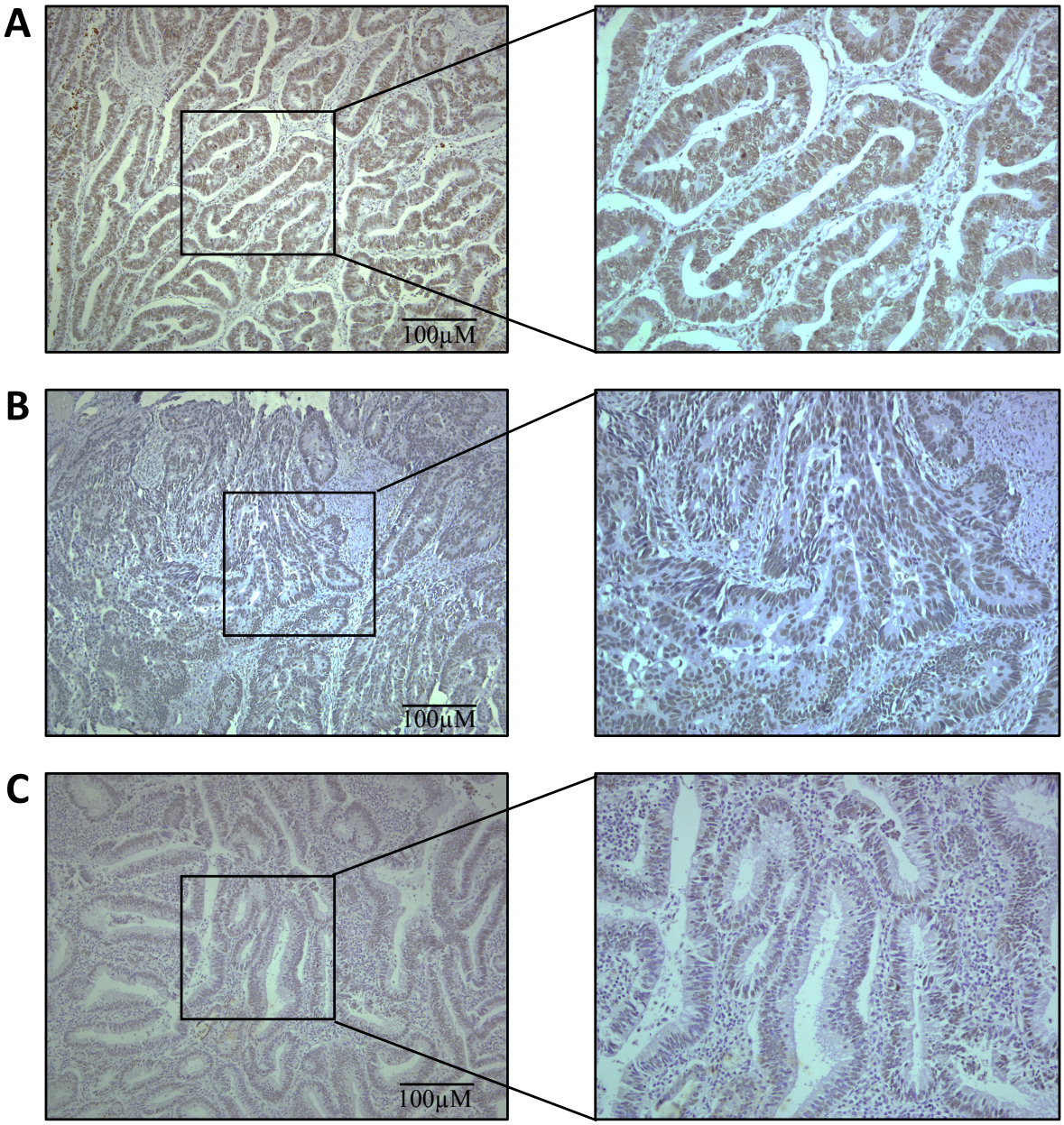


Figure 2: Representative immunohistochemical staining of NER proteins in colorectal cancer tissues. A: ERCC1; B: XPD; C: XPG. Original magnification: 100x (left) and 200x (right).

Table 2: Different levels of NER proteins are associated with clinical features of tumor aggressiveness in sporadic colorectal tumors.

Associations were analyzed with the chi-square ($\chi 2$) test and Fisher's exact test.

Variable		MLH1			ERCC1			XPD			XPG		
		High	**Low**	***p value***	**High**	**Low**	***p value***	**High**	**Low**	***p value***	**High**	**Low**	***p value***
Total cases	70	55 (79)	15 (21)		33 (47)	37 (53)		28 (40)	42 (60)		14 (20)	56 (80)	
Age, years													
≤65	30 (43)	23 (77)	7 (23)	*0.737*	15 (50)	15 (50)	*0.810*	11 (37)	19 (63)	*0.806*	5 (17)	25 (83)	*0.764*
>65	40 (57)	32 (80)	8 (20)		18 (45)	22 (55)		17 (43)	23 (57)		9 (23)	31 (77)	
Tumour location													
Colon	42 (60)	**32 (76)**	**10 (34)**	***0.002***	**23 (54)**	**19 (46)**	***0.045***	15 (36)	27 (64)	*0.457*	6 (14)	36 (86)	*0.222*
Rectum	28 (40)	**23 (82)**	**5 (18)**		**10 (36)**	**18 (64)**		13 (46)	15 (54)		8 (29)	20 (71)	
Histology													
Adenocarcinoma	60 (85)	47 (78)	13 (22)	*0.905*	29 (48)	31 (52)	*0.739*	23 (38)	37 (62)	*0.506*	12 (20)	48 (80)	*1*
Mucinous	10 (15)	8 (80)	2 (2)		4 (40)	6 (60)		5 (50)	5 (50)		8 (50)	8 (50)	
Cellular differentiation													
Well or moderately differentiated	30 (43)	23 (78)	7 (22)	*0.355*	**28 (93)**	**2 (7)**	***0.041***	9 (30)	21 (70)	*0.217*	9 (30)	31 (70)	*0.764*
Poorly differentiated	40 (57)	22 (55)	8 (45)		**5 (12)**	**35 (88)**		19 (48)	21 (52)		51 (13)	25 (87)	
Tumour invasive depth													
T1-T2	20 (29)	**19 (95)**	**1 (5)**	***0.045***	9 (45)	11 (55)	*1*	9 (45)	11 (55)	*0.601*	**6 (30)**	**14 (70)**	***0.028***
T3-T4	50 (71)	**36 (72)**	**14 (28)**		24 (48)	26 (52)		19 (38)	21 (62)		**6 (12)**	**44 (88)**	
Lymph node status													
N0-N1	55 (79)	44 (80)	11 (20)	*0.577*	26 (47)	29 (53)	*1*	21 (38)	34 (62)	*0.567*	12 (22)	43 (78)	*0.718*
N2	15 (21)	11 (73)	4 (27)		7 (47)	8 (43)		7 (45)	8 (55)		2 (13)	13 (87)	
Lymphatic invasion													
No	38 (54)	30 (79)	8 (21)	*0.933*	**10 (26)**	**28 (74)**	***0.026***	14 (37)	24 (63)	*0.628*	9 (24)	29 (74)	*0.551*
Yes	32 (46)	25 (78)	7 (22)		**23 (72)**	**9 (28)**		14 (44)	18 (56)		5 (16)	27 (84)	
Perineural invasion													
No	44 (63)	34 (77)	10 (23)	*0.731*	18 (41)	26 (59)	*0.219*	15 (34)	29 (66)	*0.215*	8 (18)	36 (82)	*0.759*
Yes	26 (37)	21 (80)	5 (20)		15 (58)	11 (42)		13 (50)	13 (50)		6 (23)	20 (77)	
Preoperative CEA, ng/mL													
≤5	41 (60)	33 (78)	9 (22)	*1.000*	20 (49)	21 (51)	*0.81*	**26 (63)**	**15 (37)**	***0.038***	9 (22)	32 (88)	*0.765*
>5	29 (40)	22 (78)	6 (22)		13 (79)	16 (21)		**2 (6)**	**27 (94)**		5 (17)	24 (83)	
AJCC/TNM stage													
I-II	41 (59)	33 (80)	8 (20)	*0.642*	19 (46)	22 (54)	*1*	16 (39)	25 (61)	*1*	**12 (29)**	**29 (71)**	***0.038***
III	29 (41)	22 (76)	7 (24)		14 (48)	15 (52)		12 (41)	17 (59)		**2 (7)**	**27 (93)**	

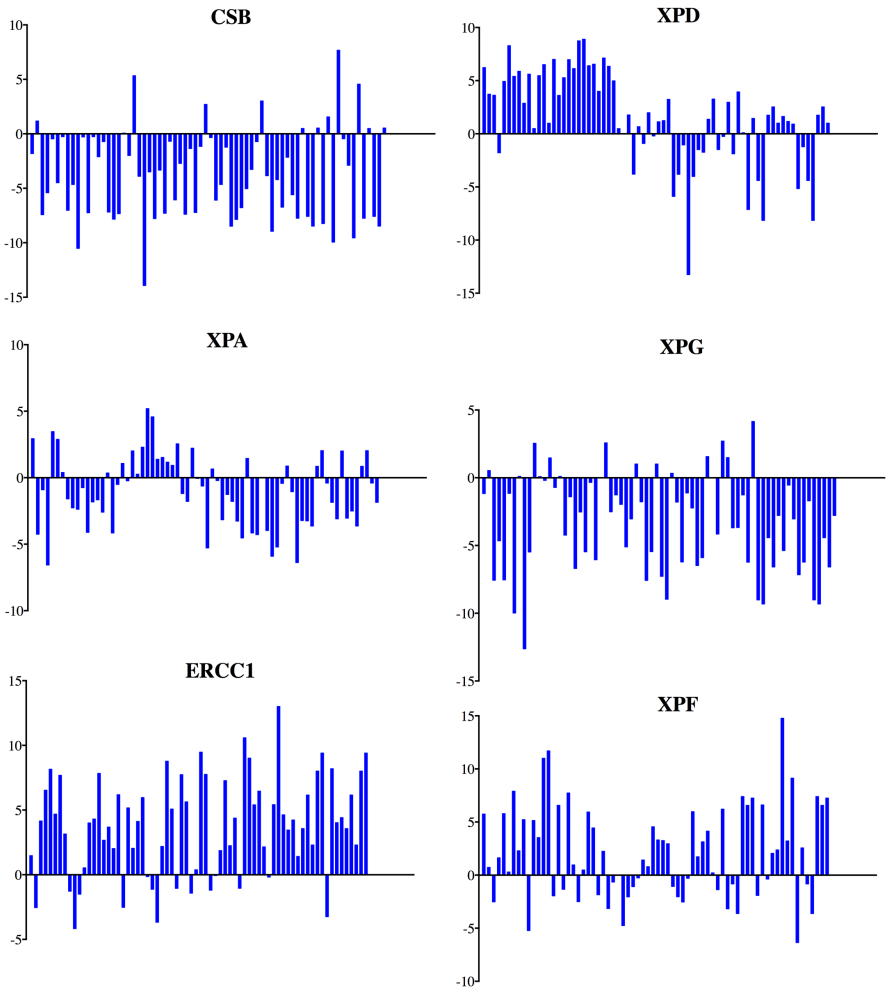
Variations in NER gene expression are associated with poor prognosis clinicopathological characteristics

Using univariate analysis, we next assessed whether the expression levels for the key NER repair pathway genes to see if they were associated with pathological features currently used for staging and prognosis determination in colorectal cancer patients (Table 3). Higher levels of XPF were associated with older patients (p=0.049). The tumor site was associated with lower levels of CSB (p=0.040) and higher levels of ERCC1 (p=0.046). Higher levels of ERCC1 (p=0.034) and XPD (p=0.045) were associated with tumor invasive depth. Poorly differentiated tumors were associated with reduced XPG (p=0.036) and increased ERCC1 (p=0.038) expression levels. Presence of perineural invasion is associated with overexpression of XPF (p=0.048). Finally, we found association between TNM stage III and low expression XPG (p=0.044). No associations were found between XPA mRNA levels in neoplastic tissue and pathological features.

Table 3: Univariate analysis of NER genes expression levels in neoplastic tissues and clinicopathological features. Significant p values are highlighted in bold font.

	ERCC1	XPA	XPD	XPF	XPG	CSB
Age	0.304	0.493	0.850	**0.049**	0.827	**0.791**
Tumor location	**0.046**	0.876	0.489	0.966	0.527	**0.048**
Histology	**0.047**	0.459	0.940	0.881	0.566	0.382
Cellular differentiation	**0.038**	0.872	0.805	**0.737**	**0.036**	0.805
Tumour invasive depth	**0.034**	0.269	**0.045**	0.812	0.787	**0.032**
Lymph node status	0.863	0.826	0.635	0.661	0.169	0.605
Lymphatic invasion	**0.037**	0.451	0.608	0.049	0.907	**0.049**
Perineural invasion	0.818	0.496	0.162	**0.048**	0.683	0.372
Preoperative CEA	0.233	0.405	0.230	**0.047**	0.351	0.394
TNM stage	0.300	0.128	0.398	0.176	**0.044**	0.404

Patients with values above the median were considered to present overexpression of the studied genes. We found 43% of all cases that presented 2 or less NER genes overexpressed and 57% that had 3 or more NER genes overexpressed. Only five patients had shown all studied genes consistently downregulated. In general, it is possible to infer the presence of a heterogeneous pattern of expression between the patients (Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 1). There was no correlation between these two profiles and the clinical variables (data not shown).



Supplementary Figure 1: The mRNA expression ratios (T(tumor)/N(normal)) of initiation genes in 70 tumors and adjacent control tissues. Patients with values above the median were considered to present overexpression of the studied genes.

Supplementary Table 1: Fold change (neoplastic/normal tissue) individual values and stratification for over (highlighted in red) and underexpression (highlighted in blue). Definition of expression level followed the median criteria. Median for each studied gene is indicated in the last row.

Patient	ERCC1	XPA	XPD	XPF	XPG	CSB
1	1.49	2.95	6.25	5.77	-1.18	-1.83
2	-2.56	-4.27	3.74	0.75	0.55	1.19
3	4.17	-0.92	3.65	-2.54	-7.58	-7.44
4	6.55	-6.58	-1.80	1.65	-4.67	-5.42
5	8.17	3.48	4.95	5.81	-7.55	-0.48
6	4.70	2.90	8.31	0.31	-1.17	-4.51
7	7.70	0.41	5.42	7.92	-10.00	-0.28
8	3.16	-1.61	5.90	2.31	0.12	-7.04
9	-1.29	-2.28	2.89	5.24	-12.64	-4.67
10	-4.18	-2.39	5.63	-5.24	-5.49	-10.53
11	-1.52	-0.76	0.51	5.16	2.56	-0.31
12	0.55	-4.13	5.49	3.55	0.10	-7.26
13	4.02	-1.84	6.53	11.02	-0.21	-0.28
14	4.32	-1.68	1.01	11.72	1.48	-2.12
15	7.85	-2.61	7.02	-1.97	-0.73	-0.73
16	2.68	0.37	3.63	6.59	0.11	-7.20
17	3.70	-4.17	5.29	-1.36	-4.25	-7.85
18	2.04	-0.52	7.00	7.75	-1.42	-7.35
19	6.20	1.09	6.15	0.98	-6.71	0.08
20	-2.54	-0.25	8.76	-2.52	-2.54	-2.01
21	5.18	2.03	8.91	0.50	-5.48	5.35
22	2.06	0.28	6.42	5.96	-0.36	-3.92
23	4.14	2.31	6.57	4.46	-6.07	-13.94
24	5.98	5.21	4.01	-1.87	-0.01	-3.51
25	-0.16	4.59	7.15	2.26	2.59	-7.80
26	-1.14	1.40	6.37	-3.17	-2.53	-3.35
27	-3.69	1.54	5.00	-0.67	-1.28	-7.31
28	2.20	1.18	0.50	0.04	-1.98	-0.70
29	8.79	0.94	0.00	-4.77	-5.12	-6.08
30	5.09	2.56	1.79	-2.07	-3.05	-2.74
31	-1.07	-1.21	-3.82	-1.10	1.03	-7.40
32	7.75	-1.80	0.69	-0.28	-1.79	-1.37
33	5.65	2.23	-0.93	1.44	-7.59	-7.24
34	-1.44	-0.07	2.00	0.81	-5.47	-1.18
35	0.40	-0.64	-0.22	4.57	1.03	2.72
36	9.49	-5.30	1.15	3.33	-7.29	-0.36
37	7.77	0.67	1.26	3.27	-8.98	-6.11
38	-1.21	-0.23	3.26	2.97	0.34	-4.67
39	-0.08	-3.18	-5.91	-1.09	-1.81	-1.25
40	1.88	-1.28	-3.83	-2.06	-6.23	-8.50
41	7.29	-1.80	-1.06	-2.55	-1.14	-7.88
42	2.26	-3.28	-13.27	-0.32	-2.25	-6.80
43	4.39	-4.55	-4.03	5.99	-6.49	-5.05
44	-1.06	1.46	-1.51	1.74	-5.91	-3.29
45	10.60	-4.17	-1.76	3.15	1.58	-0.73
46	9.03	-4.30	1.39	4.16	0.00	3.03
47	5.42	0.02	3.29	0.23	-4.17	-3.86
48	6.48	-3.99	-1.50	-1.39	2.72	-8.96
49	2.17	-5.92	-0.27	6.23	1.50	-4.23
50	-0.20	-5.23	2.99	-3.19	-3.71	-6.75
51	5.43	-0.44	-1.90	-0.85	-3.69	-2.17
52	13.02	0.89	3.96	-3.64	-1.28	-5.61
53	4.65	-1.07	0.11	7.42	-6.25	-7.77
54	3.47	-6.40	-7.14	6.59	4.17	0.51
55	4.25	-3.24	1.47	7.27	-9.03	-7.60
56	1.43	-3.26	-4.41	-1.93	-9.33	-8.49
57	3.58	-3.65	-8.17	6.63	-4.44	0.55
58	6.18	0.87	1.77	-0.39	-6.60	-8.26
59	2.31	2.05	2.55	2.07	-2.80	1.57
60	8.03	-0.42	1.02	2.39	-5.39	-9.96
61	9.42	-1.87	1.65	14.79	-0.56	7.69
62	-3.26	-3.11	1.18	3.23	-3.05	-0.47
63	8.21	2.02	0.93	9.15	-7.17	-2.91
64	4.04	-3.06	-5.18	-6.37	-6.24	-9.57
65	4.43	-2.52	-1.24	2.58	-1.72	4.58
66	3.58	-3.65	-4.41	-0.85	-9.03	-7.77
67	6.18	0.87	-8.17	-3.64	-9.33	0.51
68	2.31	2.05	1.77	7.42	-4.44	-7.60
69	8.03	-0.42	2.55	6.59	-6.60	-8.49
70	9.42	-1.87	1.02	7.27	-2.80	0.55
Median	4.09	-0.84	1.56	1.91	-2.93	-4.08

Finally, to assess whether NER gene expression were associated with each other, the Spearman's rank correlation coefficient (ρ; rho) was determined (Table 4). It was possible to infer that XPF and ERCC1 are co-expressed (0.437; p=0.009), and XPF is also co-expressed with XPA (0.2167; p=0.042) and XPG (0.2521; p=0.035).

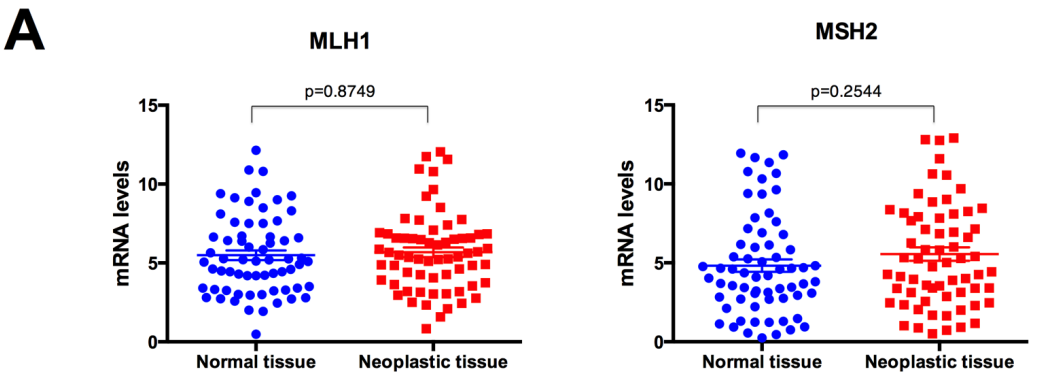
Table 4: Spearman rank correlation matrix of NER gene expression. p< 0.05. Significant p values are highlighted in bold font.

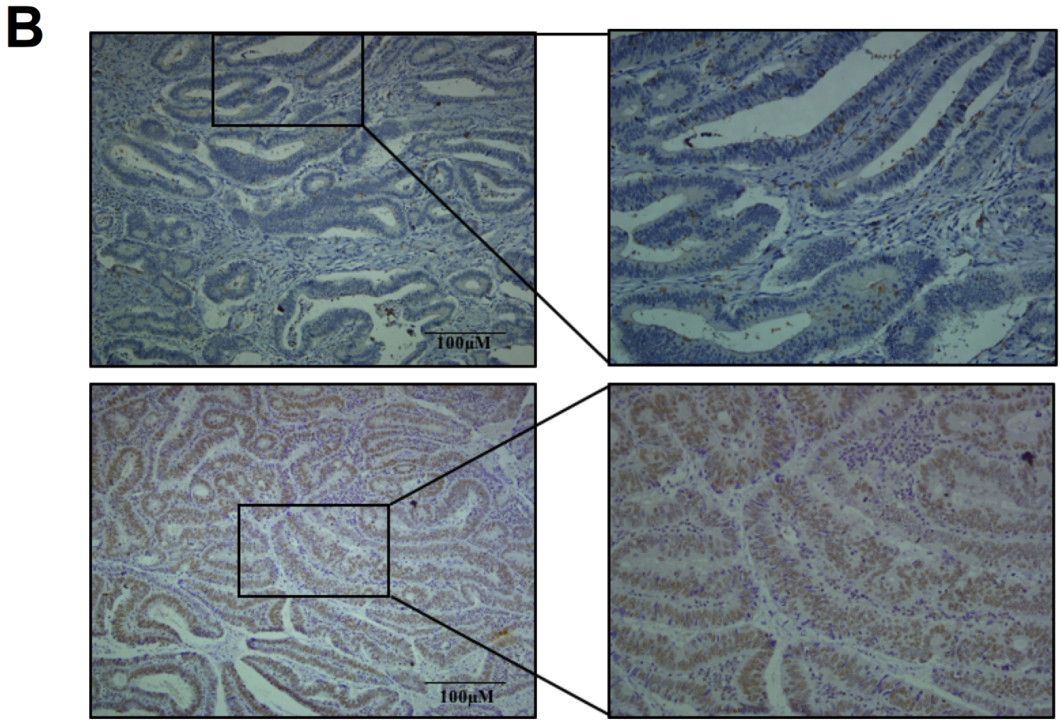
	ERCC1	**XPA**	**XPD**	**XPF**	**XPG**	**CSB**
ERCC1	1					
XPA	-0.1841 (p=0.127)	1				
XPD	0.1288 (p=0.288)	-0.1484 (p=0.220)	1			
XPF	**0.437 (p=0.009)**	**0.2167 (p=0.042)**	-0.0132 (p=0.914)	1		
XPG	-0.1761 (p=1.145)	0.1874 (p=0.120)	0.0231 (p=0.849)	**0.2521 (p=0.035)**	1	
CSB	0.0002 (p=0.999)	0.0268 (p=0.826)	-0.0402 (p=0.741)	-0.0472 (p=0.698)	0.0551 p=(0.651)	1

Mismatch repair status and NER gene expression levels are not associated in sporadic colorectal tumors

The patients' MMR status (i.e. proficient or deficient) was evaluated through assessment of gene expression by RT-qPCR of MLH1 and MSH2 and protein expression by immunohistochemistry of MLH1. There was no difference in gene expression between mucosal and tumors tissues for both MLH1 ($p=0.704$) and MSH2 ($p=0.2544$) (Fig.2A). Representative immunostaining profiles of MLH1 are shown in figure 2B. We found no association between the MMR status and the NER genes studied, as it follows: ERCC1 ($p=0.2482$), XPA ($p=0.4282$), XPD ($p=0.5448$), XPF ($p=0.5203$), XPG ($p=0.5573$) and ERCC1 ($p=0.3623$).

To date, previous studies have established that immunohistochemistry is a consistent method for MMR gene analysis (19, 20). The method has been shown to be cost effective, stable and with a high sensitivity and specificity (21), which means that the immunohistochemical method has been recommended as the chosen technique for MMR gene mutation analysis.


A
MLH1
p=0.8749
mRNA levels
15
10
5
0
Normal tissue
Neoplastic tissue
MSH2
p=0.2544
mRNA levels
15
10
5
0
Normal tissue
Neoplastic tissue


B
100μM
100μM

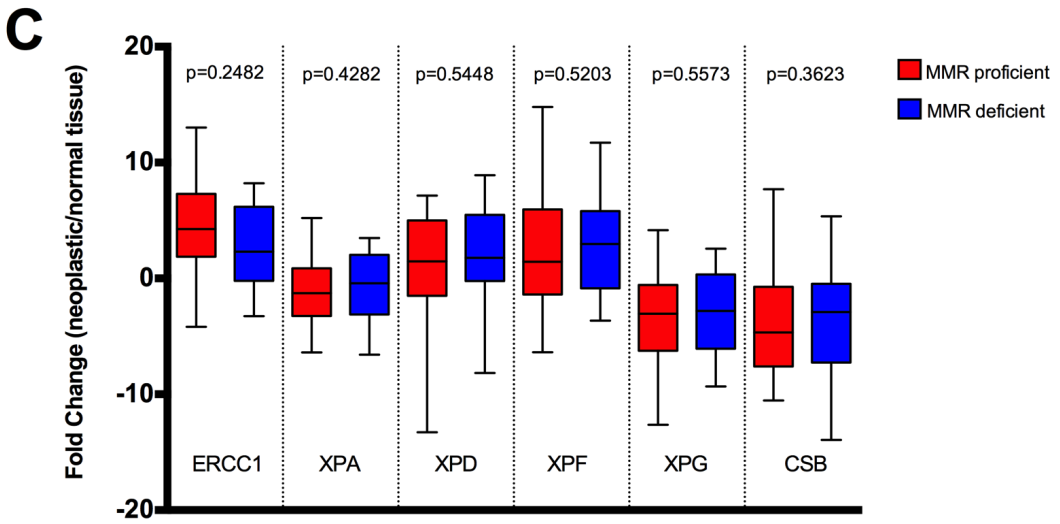

C
Fold Change (neoplastic/normal tissue)
20
10
0
-10
-20
p=0.2482
p=0.4282
p=0.5448
p=0.5203
p=0.5573
p=0.3623
ERCC1
XPA
XPD
XPF
XPG
CSB
MMR proficient
MMR deficient

Figure 3: MMR status is not associated with NER gene expression levels in sporadic colorectal tumors. A, Gene expression of MMR repair genes MLH1 and MSH2 by RT-qPCR analysis in neoplastic and normal mucosal tissues from 70 patients with sporadic colorectal cancer. **B,** Representative immunohistochemical staining of NER proteins in colorectal cancer tissues. A: ERCC1; B: XPD; C: XPG. Original magnification: 100x. **C,** MMR status (simultaneous low or high expression of MLH1 and MSH2) and its correlation with ERCC1, XPA, XPD, XPF, XPG, CSB.

Discussion

In this study, we analyzed the gene expression and the immunohistochemical staining of MMR (MLH1, MSH2) and NER (ERCC1, XPA, XPD, XPF, XPG and CSB) pathways key components in pre-treatment tumors and adjacent healthy paired tissues from CRC patients. We also explored if there were associations with a particular pathological outcome in CRC and therefore have prognostic value. Here, we report that NER genes are differentially expressed, which means that while TC-NER is downregulated (represented by the reduction of CSB levels), the common pathway is mainly upregulated (represented by overexpression of ERCC1 and XPF, but not XPG) in a majority of sporadic CRC. We also report the association between these individual repair gene expression levels and various poor outcome features in colorectal tumors. However, when we analyzed the individual expression of each NER gene in different MMR status (i.e. proficient or deficient), we noticed that there were no associations.

Colon cancer cells are known for their rapid division and have a high metabolic rate, which has been found as a potential factor that may be responsible for increased oxidation of DNA (22). It is believed that intestinal mucosa is constantly confronted with diet- and bacterial-derived oxidants and carcinogens. Moreover, as DNA is the primary cellular target for both chemotherapy- and radiation-induced damage, modulation of DNA repair competence could be both related with tumor aggressiveness and with regulation of therapeutic response. Numerous polymorphisms of NER genes have been identified and individually or in combination may adversely affect NER fidelity, which could contribute to the risk of colorectal cancer. An expressive number of studies have assessed whether there is an association between NER gene polymorphisms and colorectal cancer risk and prognosis. The results to date, nevertheless, still remain unconvincing and do not deliver any clear direction regarding their participation in CRC risk or prognosis (23-27).

Classically, the repair and removal of DNA containing oxidized bases in vivo is regulated by DNA glycosylases, mainly through the base excision repair (BER), even though MMR can also play a role in this this type of repair (28). Nevertheless, a large body of evidence additionally suggests that several proteins primarily involved in NER also play a role in BER, especially if the type and structure of the lesion present has oxidative origins, then NER proteins will involve either the NER or the BER pathway (29, 30). Transcription-coupled repair of oxidative DNA lesions requires functional CSA and CSB, and the CSB protein a rate limiting step of TC-NER (31). Thus, the absence or insufficiency in either of these proteins will result in a flawed TC-NER.

We found downregulation of *CSB* in colorectal tumors in comparison to normal healthy tissues and it was associated with advanced age, tumor location and tumor depth, all indicatives of poor outcomes. In humans, CSB has a regulatory effect on OGG1 expression for preserving OGG1 enzyme levels and function. Deficiency in CSB leads to incomplete transcription of the OGG1 gene and, subsequently, to deficient repair of 8-oxoguanine in DNA (32, 33). In addition, the CSB protein has been shown to physically interact with poly-ADP ribose-polymerase 1 (PARP1), a nuclear enzyme that binds with high affinity to and is activated by the presence of DNA single-strand breaks (SSBs) (34). In fact, the analysis of base excision repair pathway in these patients (Leguisamo et al., submitted) presented a pathway imbalance, characterized by the presence of at least three components (such as *MPG*, *OGG1*, *PARP1*, *APE1* and *XRCC1*) up or downregulated. This feature was also associated with several features of tumor aggressiveness. In case of decrease or absence of CSB, it could imbalance the repair of oxidative lesions by BER, allowing the formation of SSBs and other toxic intermediates, consequently leading to an accumulation of mutations and a more aggressive cellular profile. Moreover, previous studies had shown that CSB also plays a role in the evasion of the p53-

independent apoptosis (35), suggesting that overexpression of CSB may remain essential to escape apoptosis even later, when cells have eventually inactivated the p53 pathway.

Still exploring the NER role in the repair of oxidative lesions, it has been suggested a possible function for XPG has also been suggested in transcription-coupled repair of oxidative lesions (36). The underlying mechanism could be the interaction with CSB and TFIIH to ensure the recruitment of XPG. XPG is a critical component of the rate-limiting damage recognition/excision step of NER and is expressed at lower cellular protein levels than other NER factors (37). We also found reduction in both gene and protein expression levels of XPG and it was correlated with poorly differentiated tumors and higher TNM stages. Despite little is known about the putative role of XPG in oxidative DNA damage response, it has been demonstrated to stimulate the initial step of BER although BER activity is intact (38). This indicates that, similar to other repair enzymes such as CSB, XPG might also have purposes outside of NER.

While cells with deficiencies in GG-NER-specific factors, such as XPC, display normal resistance to cisplatin, cells with deficiencies in TC-NER specific ones (CSA, CSB) or common pathway proteins (XPA, XPD, ERCC1/XPF, XPG) are markedly hypersensitive to cisplatin. The complex XPF/ERCC1 is the main candidate of all NER components to become a predictive biomarker. ERCC1 has been implicated in resistance to platinum based chemotherapy in a variety of cancer types and there is currently considerable interest in using ERCC1 status as a predictive marker for chemotherapeutic outcome (39-41). In consonance to our results (ERCC1 and XPF gene and protein overexpression and correlation with rectal, poorly differentiated and more invasive tumors and presence of perineural invasion) high ERCC1/XPF mRNA and protein levels seem to correlate with unfavorable prognosis (42). In addition, many studies in different types of cancer also show that high ERCC1/XPF levels in cancer patients can be counterproductive in a chemotherapy scheme, often leading to

chemoresistance to cisplatin-derived agents. In counterpart, the relationship of XPA and XPD expression to cisplatin resistance and clinical prognosis of patients treated with platinum-based chemotherapy is still controversial according to previous reports (43-45).

Finally, since MMR status seems to be determinant in both survival and response to chemotherapy in CCR and has been associated with cisplatin resistance, we evaluated the NER components expression profile in MMR deficient and proficient patients. Despite we did not find any correlation, the literature shows that the absence CSB and XPA results in a significant increase in the sensitivity of cells to cisplatin-induced cell death, although it is independent of MMR status (46). This clearly makes TC-NER an appealing target for combined cancer therapy.

Our study provides evidence on alterations of NER pathway among sporadic CRC tumors and healthy intestinal tissues, and because of the correlation with pathological features, it may indicate the role of NER in this disease's prognosis. While enhancing NER may enhance protection against the accumulation of DNA lesions and preserves genome integrity, decreasing the NER level may be advantageous for cancer patients experiencing chemotherapy to guarantee the efficient action of DNA damage-inducing medications. In addition, the alterations in the ability to repair DNA damage may increase the risk of colorectal cancer by allowing more somatic DNA mutations or alterations to occur.

Conclusions

The colorectal tumors present a heterogeneous pattern of NER expression and because of the individual associations between the pathway components and the clinical features, our findings indicate that specially the deficiencies in this pathway could play a role in the aggressiveness of colorectal cancer. We believe that the reduction in NER activity is related to

the detrimental repair of oxidative lesions, leading to an accumulation of mutagenic intermediates in colorectal tissue. In addition, the lower levels of NER protein content may be also interfering with its regulatory activity over BER key components, leading to an insufficiency of this pathway and an even more mutagenic environment. Nevertheless, to propose these proteins as prognostic biomarkers, it is imperative to understand if they are part of colorectal cancer's etiology or a side effect of its development.

Abbreviations

CRC: colorectal cancer. NER: Nucleotide Excision Repair. TNM: tumor-node-metastasis. BER: base excision repair. MPG: N-methylpurine DNA glycosylase. Fen1: flap endonuclease. Polβ: DNA polymerase beta. XRCC1:X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells. AJCC: American Joint Committee on Cancer. UICC: International Union Against Cancer. MMR: mismatch repair. MSI: microsatellite instability. MLH1: mutL homolog 1. MSH2: mutS homolog 2. MSH6: mutS homolog 6. PMS2: PMS1 homolog 2.5-FU: 5-fluorouracil. GG-NER: global genome-nucleotide excision repair. TC-NER: transcription-coupled-nucleotide excision repair. ERCC1: ERCC excision repair 1. CSB: Cockayne syndrome B hortolog. BSA: bovine serum albumine. DAB: diaminobenzidin. QS: multiplicative quick score method. CEA: carcinoembryonic antigen. OGG1: 8-oxoguanine DNA glycosylase. PARP1: poly-ADP-ribose-polymerase1. SSB: single strand breaks.

Author's Contribution

NML: study design and conception, clinical data collection, qPCR, IHQ, interpretation of the data and writing the manuscript. HCG: IHQ, qPCR, analysis, writing the manuscript. TVM and DBA: material (operated all the patients) and clinical data collection. ANK: clinical data collection, interpretation of data and supervision. JS: supervision, interpretation of data and writing the manuscript.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Grant support

This research was supported by the Brazilian Founding Agencies Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul – FAPERGS (no. 1313-2551/13-8), Coordenação de Apefeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES and Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq.

Acknowledgements

We strongly thank to Keli Reiter, Rosalva Meurer and Grasiela Agnes for their valuable technical assistance.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. Int J Cancer. 2014;136:359-86.
2. Haggar F, Boushey R. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival and risk factors. Clin Colon Rectal Surg. 2009;22:191-7.
3. Lin M, Gu J, Eng C, Ellis LM, Hildebrandt MA, Lin J, et al. Genetic polymorphisms in microRNA-related genes as predictors of clinical outcomes in colorectal adenocarcinoma patients. *Clin Cancer Res. 2012;*18*:*3982–91.
4. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. International Union Against Cancer (UICC). 7th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2009.
5. Puppa G, Sonzogni A, Colombari R, Pelosi G. TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. Arch Pathol Lab Med. 2010;134:837–52.
6. Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, Lardon F, Vermoken JB. A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: One step closer to targeted therapy. Oncologist. 2010;15:699–731.
7. George B, Kopetz S. Predictive and prognostic markers in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep.* 2011*;*13*:*206–15.
8. *Fearon ER. Molecular Genetics of colorectal cancer. Annu Rev Pathol. 2011;6:479-507.*
9. Moghaddam A, Woodward M, Huxley R. Obesity and risk of colorectal cancer: A meta-analysis of 31 studies with 70,000 events**.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;16:2533-47.

10. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med. 2015;21:1350–6.
11. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. Gastroenterology 2010;138:2073-87.
12. Spivak G. Transcription-coupled repair: an update. Arch Toxicol. 2016. Epub ahead of print.
13. Spivak G. Nucleotide excision repair in humans. DNA Repair (Amst). 2015;36:13-8.
14. Wang F, Zhang SD, Xu HM, Zhu JH, Hua RX, Xue WQ, et al. XPG rs2296147 T>C polymorphism predicted clinical outcome in colorectal cancer. Oncotarget. 2016;7:11724-32.
15. Gil J, Ramsey D, Stembalska A, Karpinski P, Pesz KA, Laczmanska I, et al. The C/A polymorphism in intron 11 of the XPC gene plays a crucial role in the modulation of an individual's susceptibility to sporadic colorectal cancer. Mol Biol Rep. 2012;39:527-34.
16. Kap EJ, Popanda O, Chang-Claude J. Nucleotide excision repair and response and survival to chemotherapy in colorectal cancer patients. Pharmacogenomics. 2016;17:755-94.
17. Choueiri MB, Shen JP, Gross AM, Huang JK, Ideker T, Fanta P. ERCC1 and TS expression as prognostic and predictive biomarkers in metastatic colon cancer. PLoS One. 2015;10: e0126898.
18. Zhang Y, Ma J, Zhang S, Deng G, Wu X, He J, et al. A prognostic analysis of 895 cases of stage III colon cancer in different colon subsites. Int J Colorectal Dis. 2015;30:1173-83.
19. Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ, et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. Am J Surg Pathol. 2005;29:96–104.
20. Joost P, Veurink N, Holck S, Klarskov L, Bojesen A, Harbo M, et al. Heterogenous mismatch-repair status in colorectal cancer. Diagn Pathol. 2014;9:126.

21. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunnigham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. J Clin Oncol. 2002;20:1043–8.
22. Oberreuther-Moschner DL, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Basal colon crypt cells are more sensitive than surface cells toward hydrogen peroxide, a factor of oxidative stress. Toxicology Letters. 2005;159:212-8.
23. Mort R, Mo L, McEwan C, Melton DW. Lack of involvement of nucleotide excision repair gene polymorphisms in colorectal cancer. Br J Cancer. 2003;89:333–7.
24. Moreno V, Gemignani F, Landi S, Gioia-Patricola L, Chabrier A, Blanco I, et al. Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2006;12:2101–8.
25. Zhang Y, Ding D, Wang X, Zhu Z, Huang M, He X. Lack of association between XPD Lys751Gln and Asp312Asn polymorphisms and colorectal cancer risk: a meta-analysis of case-control studies. Int J Colorectal Dis. 2011;26:1257–64.
26. Gil J, Ramsey D, Stembalska A, Karpiński P, Pesz KA, Laczmańska I, et al. The C/A polymorphism in intron 11 of the XPC gene play a crucial role in the modulation of an individual's susceptibility to sporadic colorectal cancer. Mol Biol Rep. 2012;39:527–34.
27. Qian YY, Liu XY, Wu Q, Song X, Chen XF, Liu YQ, et al. The ERCC1 C118T polymorphism predicts clinical outcomes of colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy: a meta-analysis based on 22 studies. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15:8383–90.
28. Henderson PT, Evans MD, Cooke MS. Salvage of oxidized guanine derivatives in the (2'-deoxy)ribonucleotide pool as source of mutations in DNA. Mutat Res. 2010;703:11–7.

29. Khobta A, Kitsera N, Speckmann B, Epe B. 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) causes a transcriptional inactivation of damaged DNA in the absence of functional Cockayne syndrome B (Csb) protein. DNA Repair (Amst). 2009;8:309-17.
30. Parlanti E, D'Errico M, Degan P, Calcagnile A, Zijno A, van der Pluijm I, et al. The crosstalk between pathways in the repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mouse and human cells. Free Radic Biol Med. 2012;53:2171-7
31. Liu L, Lee J, Zhou P. Navigating the Nucleotide Excision Repair Threshold. Journal of Cellular Physiology. 2010;224:585-9.
32. Dianov G, Bischoff C, Sunesen M, Bohr VA. Repair of 8-oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. Nucleic Acids Res. 1999;27:1365–8.
33. Javeri A, Lyons JG, Huang XX, Halliday GM. Downregulation of Cockayne syndrome B protein reduces human 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 expression and repair of UV radiation-induced 8-oxo-7,8-dihydro-2′-deoxyguanine. Cancer Sci. 2011;102:1651–8.
34. Thorslund T, Von Kobbe C, Harrigan JA, Indig FE, Christiansen M, Stevnsner T, et al. Cooperation of the Cockayne syndrome group B protein and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in the response to oxidative stress. Mol Cell Biol. 2005;25:7625–36.
35. Caputo M, Frontini M, Velez-Cruz R, Nicolai S, Prantera G, Proietti-De-Santis L. The CSB repair factor is overexpressed in cancer cells, increases apoptotic resistance, and promotes tumor growth. DNA Repair. 2013;12:293-9.
36. Melis JP, Van Steeg H, Luijten M. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. Antioxidants & Redox Signaling. 2013;18:2409-19.
37. Graf N, Ang WH, Zhu G, Myint M, Lippard SJ. Role of endonucleases XPF and XPG in nucleotide excision repair of platinated DNA and cisplatin/oxaliplatin cytotoxicity. Chembiochem. 2011;12:1115-23.

38. Klungland A, Hoss M, Gunz D, Constantinou A, Clarkson SG, Doetsch PW, et al. Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. Mol Cell. 1999;3:33–42.

39. Noda E, Maeda K, Inoue T, Fukunaga S, Nagahara H, Shibutani M, et al. Predictive value of expression of ERCC 1 and for 5-fluorouracil/ oxaliplatin chemotherapy in advanced colorectal cancer. Hepatogastroenterology. 2012;59:130–3.

40. 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;108:457–64.

41. Li S, Zhu L, Yao L, Xia L, Pan L. Association between ERCC1 and TS mRNA levels and disease free survival in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin and fluorouracil (5-FU) adjuvant chemotherapy. BMC Gastroenterol. 2014;14:154.

42. Grimminger PP, Shi M, Barrett C, Lebwohl D, Danenberg KD, Brabender J, et al. TS and ERCC-1 mRNA expressions and clinical outcome in patients with metastatic colon cancer in CONFIRM-1 and -2 clinical trials. Pharmacogenomics J. 2012;12:404–11.

43. Stevens EV, Raffeld M, Espina V, Kristensen GB, Trope CG, Kohn EC, et al. Expression of xeroderma pigmentosum A protein predicts improved outcome in metastatic ovarian carcinoma. Cancer. 2005;103:2313–9.

44. Köberle B, Roginskaya V, Zima KS, Masters JRW, Wood RD. Elevation of XPA protein level in testis tumor cells without increasing resistance to cisplatin or UV radiation. Mol Carcinog. 2008;47:580–6.

45. Bowden NA. Nucleotide excision repair: why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy? Cancer lett. 2014;346:163–71.

46. Stubbert LJ, Smith JM, McKay BC. Decreased transcription-coupled nucleotide excision repair capacity is associated with increased p53- and MLH1-independent apoptosis in response to cisplatin. BMC Cancer. 2010;10:207.

5. DISCUSSÃO GERAL

O câncer colorretal é o terceiro tumor em frequência e o segundo em mortalidade nos países desenvolvidos. Sua etiologia é multifatorial e complexa, visto que se origina da interação entre fatores ambientais e genéticos (MALEKZADEH et al., 2009), e sua evolução entre a primeira mutação e a detecção clínica pode levar cerca de 10 anos (BARDHAN e LIU, 2013). No Brasil, de acordo com o INCA, foram registradas 15.415, e o mesmo instituto prevê, ainda, 34.280 novos casos da doença em 2016. As estimativas de 2016 são que as regiões Sul e Sudeste continuem apresentando as maiores incidências da doença tanto para homens quanto para mulheres (INCA, 2016). O esquema de tratamento do CCR parte da localização da lesão primária. Todavia, a cirurgia sempre é o seu tratamento primordial, na qual se procede a ressecção da porção afetada do intestino, bem como da cadeia linfonodal desta região. Juntamente, o paciente é submetido, seja em neoadjuvância ou adjuvância, à quimioterapia associada ou não à radioterapia (RÖDEL et al., 2015; XYNOS et al, 2016).

A literatura está repleta de estudos sobre os diversos fatores clínicos, patológicos e moleculares que afetam o prognóstico do CCR. Alguns fatores são prognosticamente independentes, enquanto vários são interdependentes. Um marcador prognóstico identifica pacientes com elevado risco de recorrência, independentemente do tratamento, e são úteis para selecionar pacientes que deveriam receber tratamento adjuvante (KERR e MIDGLEY, 2010). Enquanto o estágio tumoral permanece o fator prognóstico mais importante, cada vez mais tem sido reconhecido que o CCR não é uma doença homogênea para que possa ser respaldada em apenas um critério histopatológico. A isto deve-se ao fato de que pacientes individuais apresentando o mesmo estágio tumoral acabam por apresentar diferentes prognósticos e resposta à quimioterapia em longo termo. Além disto, algumas variáveis prognósticas também

não possuem a mesma relevância para a determinação do prognóstico, o que leva a uma série de estudos, por exemplo, para a identificação de pacientes que possuem maior risco de desenvolverem desfechos desfavoráveis ou se beneficiarem de terapias mais agressivas.

Atualmente, os fatores prognósticos para o CCR podem ser classificados em: (1) clínicos (CEA elevado, presença de doença metastática, tumores obstrutivos, perfuração intestinal, entre outros); (2) patológicos (por exemplo, presença de linfonodos metastáticos, graus de invasividade e diferenciação celular, invasão linfática e perineural, status cirúrgico da ressecção das margens, variantes histológicas, infiltração linfocitária); (3) marcadores moleculares (ativação mutacional de KRAS, presença de MSI, mutação em BRAF, presença de CIMP, perda de heterozigosidade); e (4) impacto das terapias neoadjuvantes e adjuvantes (grau de obtenção de resposta). (MARZOUK e SCHOFIELD, 2011). Embora o estadiamento feito através dos fatores prognósticos clínicos e patológicos ainda sejam os mais reconhecidos para guiar a estratégia terapêutica do CCR, é inegável que os fatores moleculares abrem uma nova frente para a estratificação dos tipos moleculares desta doença e, portanto, para a personalização do seu tratamento.

Neste sentido, a instabilidade de microssatélites vem sendo um grande assunto de interesse nas duas últimas décadas. Embora a maior parte do CCR se desenvolva através de uma via marcada pela instabilidade cromossômica, uma minoria importante (15%) é caracterizada pela deficiência na via de reparo de malpareamento (DE LA CHAPELLE, 2003). Classicamente, isto tem sido demonstrado pela presença de MSI ou pela perda de proteínas envolvidas nesta via (confirmado por imunohistoquímica), como MLH1, MSH2 e PMS2 (LANZA et al, 2006; YUAN et al, 2015). Tumores colorretais deficientes em MMR acumulam mutações no DNA em uma taxa muito mais alta do que os seus pares proficientes o fazem, resultando em um fenótipo mutante. Além disto, tumores com esta característica tendem

frequentemente a apresentar características histopatológicas associadas com um melhor prognóstico (presença de infiltração linfocitária, ausência de linfonodos metastáticos, elevado grau de diferenciação celular), bem como uma resposta diferenciada à quimioterapia convencional (POPAT et al, 2005; SINICROPE et al, 2011). Estudos pré-clínicos e clínicos demonstram que a deficiência de MMR traz resistência ao tratamento com 5-FU e maiores sensibilidades à oxaliplatina e ao irinotecano, pilares dos esquemas quimioterápicos de primeira linha no tratamento do CCR nos esquemas FOLFOX e FOLFIRI (RIBIC et al, 2003; JOVER et al, 2009; SARGENT et al, 2010; ZAANAN et al, 2011; LI et al, 2013).

Conquanto a relevância clássica do envolvimento do sistema de reparo do DNA na patogênese e no prognóstico do CCR recaia quase que exclusivamente sobre o MMR, são inegáveis as evidências do envolvimento de outras vias, como a do reparo por excisão de bases. O BER é uma via que remove a maioria dos danos endógenos ao DNA, incluindo uma série de danos oxidativos, aos quais o epitélio colorretal está constantemente exposto (OBTULOWICZ et al, 2010; WALLACE, 2014). Além disto, esta via é também responsável, juntamente com o MMR, pelo reparo das lesões causadas por 5-FU (WYATT E WILSON, 2009), o que nos leva a crer que a existência de um *crosstalk* entre elas pode ser capaz de delinear um perfil molecular tumoral mais acurado e ajudar a definir um esquema terapêutico no câncer colorretal.

Nossos resultados - apresentados no capítulo I - demonstram que a via do BER de forma alguma pode ser considerada sob um aspecto único de sua expressão, uma vez que, à exceção de Polβ, todos os demais componentes desta via (MPG, OGG1, APE1, Fen1, PARP1, XRCC1) apresentaram alterações no tecido tumoral, porém nunca simultaneamente em um mesmo paciente. Nossa coorte contém apenas 5 pacientes (7%) que apresentaram um aumento consistente da expressão de todos os genes, o que nos levou a concluir que a via do BER, na verdade, apresenta-se desequilibrada nos tumores colorretais. Além disto, a superexpressão

individual dos seus componentes foi associada a diversas variáveis que indicam pior prognóstico, como presença de invasão linfática e perineural, baixo grau de diferenciação celular, tumores localizados no reto, níveis elevados de CEA, maior invasividade tumoral e estágios TNM mais avançados.

Enquanto a funcionalidade completa da via do BER impede a formação excessiva de intermediários tóxicos (i.e., bases alquiladas não processadas, sítios abásicos, quebras simples, lesões contendo grupamentos 5`-dRP), contribuindo para a agressividade tumoral e, portanto, para desfechos clínicos desfavoráveis (MAYNARD et al, 2009), o desequilíbrio nesta via, dependendo do ponto em que ela ocorre, leva as células a diferentes destinos, ao permitir o acúmulo tanto de lesões citotóxicas como mutagênicas (SOBOL et al, 2002; PAIK et al, 2005), as últimas contribuindo para a disfunção celular. Por exemplo, enquanto a inibição de uma DNA glicosilase (componente *upstream*) prejudica o início da via do BER e resulta em acúmulo de lesões, a superexpressão de Polβ (componente intermediário) aumenta os níveis de mutagênese espontânea (TANG et al, 2010). Na ausência de XRCC1 (componente *downstream*), por sua vez, as células ficam impedidas de reparar quebras simples adequadamente, pois não conseguem realizar a limpeza final do local e a ligação (HORTON et al, 2008). Diante disto, entendemos o desequilíbrio nos tumores colorretais como um fator de pior prognóstico, visto que o acúmulo destes intermediários não reparados são altamente mutagênicos (SIMONELLI et al, 2005; FU et al, 2012). Desta forma, é na compreensão dos mecanismos e do ponto específico de manipulação desta via que reside o potencial de desequilibrar desde reparo das lesões até o processo de apoptose, de modo a desfavorecer o destino das células tumorais.

Partindo deste conceito, nossos resultados obtidos em tumores colorretais oriundos de pacientes foram mimetizados em um modelo *in vitro* de câncer colorretal. Para tanto, dois

componentes-chave da via do BER, MPG e XRCC1, foram modulados de modo a desequilibrar a via no seu início ou no seu fim, e avaliou-se, em um modelo deficiente na via de reparo de malpareamento, os possíveis efeitos desta modulação sobre a citotoxicidade de 5-FU (pilar do tratamento quimioterápico do CCR) e temozolomida (anova abordagem terapêutica). Conforme dados apresentados no capítulo I, células que superexpressam MPG são mais sensíveis 5-FU, mas mais suscetíveis ainda à ação da TMZ, fato que não ocorre durante a superexpressão de XRCC1.

Para o reparo de danos gerados por alquilação, por sua vez, como aqueles induzidos pela TMZ, os genes MPG, APE1, Polβ e XRCC1 foram até o momento considerados essenciais, com poucas evidências de uma capacidade reparatória complementar efetiva (ALMEIDA e SOBOL, 2007). Isto, em tese, sugere que a inibição ou a deficiência em uma destas proteínas essenciais do BER levariam à formação de intermediários tóxicos em níveis excessivos, a ponto de induzirem a morte celular. Corroborando este fato, pequenas moléculas para a inibição do BER (através do bloqueio de Polβ, por exemplo) têm surgido como formas atraentes de aumentar a alquilação induzida pela TMZ através do acúmulo de intermediários tóxicos (TRIVEDI et al, 2008; TANG et al, 2010). Alternativamente, bloquear o sítio abásico formado durante a execução do BER também aumenta a sensibilidade celular à alquilação independentemente da lesão de O^6-metilguanina (TAVERNA et al, 2001; FISCHEL et al, 2007). Ou seja, a estratégia de focar no BER pode aumentar a eficácia dos agentes alquilantes independentemente da funcionalidade de MGMT ou do status da via MMR.

Acontece que, tanto o *knockdown* de MPG (PAIK et al, 2005) como o aumento da sua expressão (FISCHEL et al, 2007; TRIVEDI et al, 2008) foram considerados responsáveis por sensibilizar diversos tipos celulares aos agentes alquilantes. Assim, para que se evite mutações induzidas por estes agentes na ausência da expressão de MPG, a superexpressão forçada pode

ser uma estratégia para sensibilizar as células aos efeitos da TMZ.

O desequilíbrio do BER leva ao processamento incompleto das lesões, o que fomenta o acúmulo de intermediários tóxicos. Todavia, este acúmulo, em um certo nível age como uma agente mutagênico, transformando uma célula normal em neoplásica e, provavelmente, garantindo-lhe vantagens para sua replicação. Ao identificar este desequilíbrio e agir através da adição de quimioterápicos que o extrapolem (ao induzir a superexpressão de um componente ou inibindo outro, por exemplo), imaginamos que os níveis de dano conferidos à célula tumoral seriam inviáveis de serem reparados, bloqueando a via do BER por completo e induzindo a morte celular. Daí o ponto crucial para superar a resistência ao 5-FU, por exemplo, ser identificar a presença do desequilíbrio e o ponto em que ele ocorre (i.e., se em etapas iniciais ou finais da via) para, então, manejá-lo em favor do paciente.

Tendo em mente que o microambiente de tumores sólidos é um meio complexo para o crescimento e sobrevivência das células tumorais, sendo metabolicamente caracterizado por apresentar baixo pH, níveis de nutrientes escassos, fatores de crescimento e oscilações nos níveis de oxigênio, espera-se uma reprogramação metabólica das células para que sobrevivam (LUNT et al., 2009; WARD E THOMPSON, 2012). Portanto, os tumores com estas propriedades, como o colorretal, por evoluírem em um ambiente metabolicamente hostil, tendem a apresentar resistência ao tratamento quimioterápico.

Para averiguar o mecanismo envolvido com a maior sensibilidade das células de câncer colorretal que superexpressavam MPG, mas não XRCC1, ao 5-FU e à TMZ, decidiu-se investigar as possíveis alterações no metabolismo energético. É notório e bem estabelecido o conceito de que as células tumorais apresentam uma capacidade glicolítica aumentada através da dominância da glicólise em relação à fosforilação oxidativa, convertendo glicose em lactato, mesmo na presença de altas concentrações de O_2 (WARBURG, 1956; ZHOU et al., 2010). As

células tumorais geram ATP em condições aeróbicas (efeito Warburg) através do uso da glicólise em vez da fosforilação oxidativa mitocondrial para oxidar glicose. Este mecanismo permite que elas produzam ATP aproximadamente 100 vezes mais rápido do que pela fosforilação oxidativa, atendendo assim, a sua demanda, já que se proliferam em passo acelerado (GATENBY e GILLIES, 2004; HSU e SABATINI, 2008; WARD E THOMPSON, 2012). Aliado a isto, sabe-se que o consumo de glicose pelas células tumorais é superior aos tecidos normais (FERREIRA, 2010), conferindo vantagens adaptativas diante do ambiente ácido e não raramente em condições de hipóxia (RESENDES-ANTONIO et al., 2010). Este cenário é tão importante para o triunfo das células neoplásicas, que o bloqueio da glicólise anaeróbica serve como ferramenta para a terapia antineoplásica na chamada terapia metabólica (MORENO-SÁNCHEZ et al., 2007; SEYFRIED et al, 2014).

Ao medir o conteúdo basal de ATP citosólicos das células transfectadas, foi observado que as células que superexpressavam MPG tinham o dobro do conteúdo de ATP do que as células não transfectadas – as quais, por sua vez, eram iguais às que expressavam XRCC1. Em seguida, foi notado também que as células que superexpressavam MPG quando tratadas com 5-FU e TMZ tinham uma depleção importante dos conteúdos de ATP juntamente com um acúmulo de lactato, quadro este compatível com acidose lática, visto em situações de hipóxia, como diabetes, isquemia e mesmo em tecidos colorretais durante a transição adenoma-carcinoma (SIMIANTONAKI et al, 2008; ROBBINS et al, 2014).

A modulação da expressão gênica através da hipóxia já foi descrita anteriormente e pode alterar dramaticamente a expressão gênica individual (HARDING et al, 2000; CAMPS et al, 2014). Tanto a expressão de proteínas da via do BER como a sua funcionalidade parecem estar suprimidas em quadros de hipóxia no CCR, embora os níveis de mRNA estejam intactos (CHAN et al, 2014). O MMR também mostrou estar prejudicado ou inibido sob condições de hipóxia (RODRIGUEZ-JIMENEZ et al, 2008; SCANLON E GLAZER, 2015), assim como a

recombinação homóloga (BINDRA et al, 2004; SCANLON E GLAZER, 2015) e, como dito anteriormente, também o BER, todos envolvidos no risco e na progressão do CCR. Todavia, o efeito da hipóxia na supressão das proteínas do BER não é tão pronunciado como aquele demonstrado na recombinação homóloga e no MMR. Isto deve-se ao fato de que as proteínas do BER apresentam uma meia-vida relativamente mais longa do que as proteínas destas outras vias (CHAN et al, 2014).

Em contrapartida, considerando-se a disrupção metabólica como consequência da falência do BER (causada por desequilíbrio por perda, inibição ou superexpressão de um dos seus componentes), já se sabe que uma das principais respostas é a depleção energética e, a partir da redução de NAD^+, a morte celular mediada pela depleção de ATP torna-se um evento-chave na injúria dos tecidos neoplásicos (TANG et al, 2010). Porém, de acordo com nossos resultados, apenas o desequilíbrio da via causado pela superexpressão de um componente *upstream* aliado ao tratamento seria capaz de desencadear este evento. Além disto o acúmulo de lactato nas células de CCR ocorre principalmente em razão do aumento da taxa glicolítica característica das células neoplásicas, o que também está relacionado clinicamente com a presença de metástases e menores sobrevida livre de doença e sobrevida global (KENNEDY et al, 2013). Apesar disto, a morte celular pode também ser mediada pela repressão de genes envolvidos com a glicólise como uma resposta celular ao acúmulo de lactato (CHEN et al, 2008).

Importante neste quadro é também considerar a função de MGMT, visto que 73% dos nossos pacientes apresentaram redução na expressão deste gene no tecido tumoral e sua atividade está intrinsecamente ligada à modulação da citotoxicidade de TMZ. A temozolomida exerce sua atividade citotóxica através da metilação do DNA na posição N3 da adenina e nas posições N7 e O6 da guanina, o que leva à formação de quebras simples e à subsequente inibição da replicação celular e apoptose. Um dos mecanismos responsáveis pela resistência à

TMZ está relacionado à expressão de MGMT. A metilação do promotor de MGMT é um evento frequente e relevante na carcinogênese colorretal, na qual a baixa expressão de MGMT em consequência ao silenciamento gênico é observada em 27-40% dos cânceres colorretais metastáticos e quimiorrefratários (ESTELLER E HERMAN, 2004). Todavia, já foi demonstrado também que a perda de MGMT também ocorre no tecido intestinal saudável, sugerindo que o silenciamento do gene MGMT é apenas um dos vários passos necessários para o acúmulo de danos ao DNA e para o processo de malignização celular. A perda de MGMT tem sido, portanto, definida como "*field deffect*", ou seja, não é completamente necessária nem suficiente para a progressão do câncer, representando um dos vários passos (provavelmente inicial) que levam à carcinogênese. De fato, um segundo nível de defesa contra os danos ao DNA é representado pela via MMR, a qual leva a célula à apoptose na presença de alterações genômicas sérias (ALLAN et al, 2005). A perda da expressão de MGMT é mais frequente no CCR com instabilidade de microssatélites, sugerindo que a metilação do promotor do gene MGMT seleciona clones com deficiência em MMR (SVRCEK et al, 2010).

A TMZ mostrou, *in vitro*, ter atividade contra diversas neoplasias humanas, incluindo o CCR. Estudos clínicos (KHAN et al, 2008; SCHACHAM-SCHMUELI et al, 2011; HOCCHAUSER et al, 2013) têm demonstrado que há uma evidência crescente de que o status da metilação de MGMT ou mesmo seu nível de expressão gênica possa servir como marcador preditivo de resposta ao uso de TMZ em pacientes com CCR, especialmente se metastático. Além disto, a combinação de TMZ com fluoropirimidina está baseada em um sólido racional, assim como o uso da combinação de TMZ com irinotecano (REYNÉS et al, 2014), demonstrando como a TMZ pode compor a base dos esquemas terapêuticos para o CCR. Atualmente, outros estudos clínicos que testem o valor terapêutico da TMZ no CCR estão em andamento, especialmente para investigar o papel desta droga como agente único e os biomarcadores preditores em pacientes com tumores colorretais e MGMT metilado.

Outra droga frequentemente usada no tratamento do CCR em combinação com o 5-FU é a oxaliplatina, especialmente em tumores em estágios III ou IV (HALLER et al, 2011). Estudos pré-clínicos demonstraram que células tumorais deficientes em MMR, apesar de resistentes ao 5-FU, são suscetíveis à oxaliplatina. Na verdade, os dados sobre o impacto preditivo do tratamento com oxaliplatina de acordo com o status de MMR é extremamente limitado (DES GUETZ et al, 2010; ZAANAN et al, 2010). Em um estudo retrospectivo com pacientes com CCR em estágio III que receberam como quimioterapia adjuvante o esquema FOLFOX, o status da via MMR foi um fator prognóstico que conferiu maior sobrevida livre de doença para aqueles pacientes deficientes nesta via (ZAANAN et al, 2011). Outro estudo (GAVIN et al, 2013), com pacientes com CCR em estágios II e III, reportou que a deficiência da via MMR foi associada a melhor prognóstico para recorrência naqueles pacientes tratados também com FOLFOX. Juntos, estes dados sugerem um potencial benefício do uso da oxaliplatina em pacientes com tumores colorretais deficientes em MMR, mas ainda não são suficientes para respaldar mudanças nas diretrizes de tratamento atuais.

Entretanto, como os adutos formados por agente platinados são reparados pela via do NER, vários estudos têm se voltado para determinação da influência de polimorfismos de um único nucleotídeo de genes envolvidos nesta via, especialmente o ERCC1 (YIN et al, 2011), o qual pode prever o resultado clínico em pacientes que recebem quimioterapia baseada em oxaliplatina durante o tratamento do CCR. Chua e colaboradores (2009) reportaram que uma mutação no códon 118 de ERCC1 embora tivesse associação com uma pior progressão livre de doença, não tinha associação alguma com a toxicidade de FOLFOX. Em um estudo Huang e colaboradores (2013), não apenas o valor preditivo de ERCC1 como de ERCC2 (XPD) foi avaliado em pacientes com estágio III de CCR que tinham recebido FOLFOX em regime de adjuvância. A superexpressão de ERCC1 foi considerada um importante preditor de falência precoce do tratamento com FOLFOX, e foi considerado um biomarcador de sensibilidade ao

esquema. Em contrapartida, Baba e colaboradores (2012) relataram, embora em apenas 21 pacientes, o aumento da expressão gênica e proteica de ERCC1 em pacientes com CCR após o tratamento com FOLFOX, demonstrando o aumento da atividade de NER nos tumores. Por último, o trabalho mais recente sobre o assunto (KIM et al, 2015) mostrou que a expressão de ERCC1 não está correlacionada com sobrevida livre de doença em 5 anos de pacientes com CCR em estágios que haviam sido tratados com FOLFOX.

Como mencionado anteriormente, os adutos induzidos pela oxaliplatina não são reconhecidos pelo MMR, mas são reparados majoritariamente pela via do NER (ZAANAN et al, 2011). Um aumento da eficiência do reparo do DNA nestas vias pode contribuir para uma resistência a diversos quimioterápicos à base de platina. Nos resultados apresentados no capítulo II, descreve-se a presença de redução do reparo acoplado à transcrição através da redução da expressão gênica de CSB, o que está também associado a um pior prognóstico. Em contrapartida, a superexpressão de componentes da via comum (ERCC1 e XPF) também atua como indicativo de desfechos patológicos desfavoráveis.

O valor prognóstico do NER é muito pouco estudado em comparação ao valor preditivo desta via no câncer colorretal. De qualquer forma, sabe-se que um papel do NER ao menos na carcinogênese colorretal é totalmente plausível, visto que seus principais fatores de risco exógenos (tabagismo, etilismo, consumo elevado de carne vermelha processada e de gordura saturada) geram uma série de compostos que reagem com o DNA, alterando a sua estrutura. Já foi relatado que há um aumento na capacidade de reparo do DNA NER-específica em tumores colorretais em comparação ao tecido normal (HERRERA et al, 2009; SLYSKOVA et al, 2012), o que aponta para uma redução na quantidade de danos nestes tecidos (JONSSON et al, 2010). Até o momento, nenhum estudo encontrou evidências de deficiência desta via no CCR, o que pode indicar que o NER não é um fator que contribua para a transformação maligna, mas que garanta alguma vantagem de crescimento no tumor existente, reduzindo a

sua vulnerabilidade ao acúmulo de danos ao DNA que precede a morte celular. Neste sentido, é possível que a estabilidade genética tumoral dada pelo aumento da atividade de efetores do reparo do DNA esteja associada com o processo metastático (SARASIN e KAUFFMANN, 2008), daí a superexpressão de ERCC1 e XPF que encontramos estar relacionada a um pior prognóstico. Outro aspecto é a redução dos níveis de CSB e a sua associação a características de pior prognóstico (idade mais avançada, localização do tumor no reto e maior grau de invasividade). Embora tenhamos encontrado redução na expressão gênica de CSB, esta já foi relatada como superexpressa em diversos tipos de cânceres (CAPUTO et al, 2013). Em contrapartida, como a supressão de CSB está ligada ao controle da atividade de p53 antes de que as células tumorais adquiram mutações que permanentemente inativem a via supressora tumoral (FRONTINI et al, 2012), é possível que o pior prognóstico associado a esta característica seja decorrente de um estágio mais inicial do desenvolvimento tumoral.

Outro papel importante desta via a se considerar é a sua capacidade de reparar lesões oxidativas, tão frequentes no tecido colorretal. Por exemplo, as proteínas CSA e CSB possuem um papel regulatório no BER, especialmente através do seu efeito direto sobre OGG1 e PARP1 (DIANOV et al, 1998; DIANOV et al, 1999; THORSLUND et al, 2005; MELIS et al, 2013). XPG, por sua vez, também parece ter um papel no reparo de lesões oxidativas acoplado à transcrição: ela funciona como um cofator ligando-se a glicosilases que atuam na remoção de lesões causadas por radicais livres (e possivelmente outras glicosilases) (MELIS et al, 2013). Em relação ao GG-NER, XPC atua no reconhecimento de lesões oxidativas que distorcem a dupla hélice, e a sua deficiência deixa lesões na fita não transcrita, aumentando a suscetibilidade ao câncer. Finalmente, XPC também interage também com várias glicosilases, estando envolvida nas duas subvias do BER (MELIS et al, 2013).

Embora tenha sido encontrado, na média, uma maior expressão da maioria dos componentes das vias BER e NER e que isto esteja associado a características de pior

prognóstico, é inegável que o panorama geral demonstra um desequilíbrio destas vias nos tumores colorretais. Este dado aponta, de fato, para o estudo individualizado dos pacientes, pois, especialmente como foi demonstrado no Capítulo I, esta informação pode determinar o destino das células tumorais e, portanto, influenciar os desfechos clínicos. Outro ponto importante a se considerar, é que as vias de excisão, como discutido anteriormente, se sobrepõem e se intercomunicam, especialmente no que tange ao reparo de lesões oxidativas e seus desdobramentos, como as quebras simples. Tanto BER como NER são consideradas vias livres de erro, ou seja, durante o seu processo de reparo de uma lesão, utilizam-se da fita íntegra como molde, o que garante fidedignidade e manutenção da informação genética. Em um certo nível, o aumento da capacidade de reparo garantido pelo aumento da expressão de alguns de seus componentes, pode atuar, paradoxalmente, na manutenção da estabilidade genômica da célula tumoral, garantindo a perpetuação das mutações que lhe conferem o status neoplásico. Uma forma de usar esta característica a favor do paciente, seria provocar um desequilíbrio tamanho (seja pelo uso de agentes quimioterápicos, como os alquilantes, ou da terapia gênica), que se tornasse insuportável para a célula, obrigando-a a desencadear a apoptose. Um dos mecanismos envolvidos neste fim seria a perturbação do metabolismo, através da depleção brusca dos intermediários energéticos, por exemplo (Figura 8).

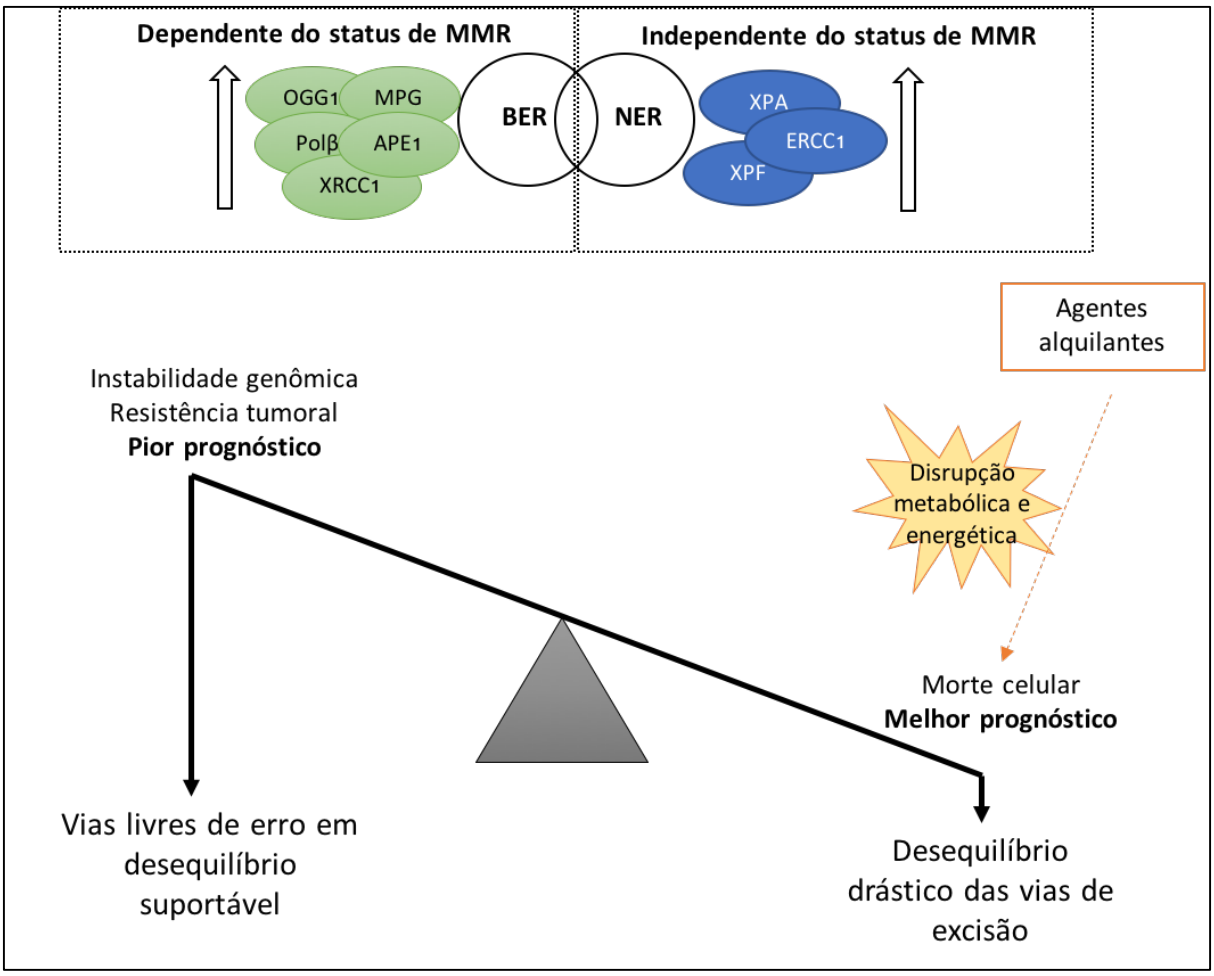


Figura 8: Modelo hipotético da influência das vias de reparo por excisão sobre a agressividade tumoral colorretal.

Em vista do exposto, almejou-se com este trabalho, encontrar características dentro das vias de reparo direto, por excisão de bases e nucleotídeos que pudessem refinar o estadiamento do câncer colorretal. Apesar de algumas associações entre a expressão de componentes do NER e características clínicas, os resultados mais promissores encontrados apontam para um papel mais palpável em termos preditivos e prognósticos do BER, especialmente se o status da via MMR for conhecido antes de iniciar o tratamento desta doença. Assim, reconhecer o ponto específico de desequilíbrio da via do BER nos tumores colorretais é uma forma de contornar a resistência ao 5-FU e que a TMZ, neste mesmo cenário, o que lhe cria maiores chances de se dispensar um tratamento deveras efetivo para este subgrupo de pacientes. Este trabalho,

obviamente, apresenta algumas limitações, especialmente em termos de acompanhamento da coorte para avaliação completa dos tratamentos utilizados, bem como de recidivas, metástases e sobrevida. Portanto, faz-se necessário um estudo diagnóstico, com análise de subgrupos e com tempo adequado de *follow up* para confirmar os resultados apresentados e efetivamente propor os componentes do BER – especialmente a expressão de MPG e XRCC1 - como biomarcadores de quimiossensibilidade. Não menos importantes, os estudos mecanísticos também devem ser continuados na busca por estratégias inovadoras que contornem a refratariedade à quimioterapia que impede a redução da mortalidade do câncer colorretal.

6. CONCLUSÕES

6.1 Conclusão Geral

Alterações nos níveis dos genes e das proteínas-chave das vias de reparo por excisão de bases (MPG, OGG1, APE1, PARP1, Polβ e XRCC1) e nucleotídeos (CSB, XPA, XPD, XPG, XPF e ERCC1) no tecido tumoral colorretal apresentam associações com diferentes aspectos clínicos e patológicos que compõem o estadiamento do câncer colorretal, como presença de invasões linfática e perineural, pouca diferenciação celular e invasividade. Enquanto há um perfil específico de expressão do BER – através da maior expressão OGG1, MPG e PARP1 – em pacientes com deficiência de MMR, não há diferenças quanto à expressão dos componentes do NER. A mimetização do desequilíbrio da via BER em células de câncer colorretal deficientes na via MMR - através da superexpressão de um componente *up*- (AAG) e outro *downstream* (XRCC1) da via - modula os níveis basais de ATP e lactato e a citotoxicidade do 5-fluoracil e da temozolomida, através do desequilíbrio do metabolismo.

6.2 Conclusões Específicas

- À exceção de Polβ, todos os demais componentes da via do reparo por excisão de bases (AAG, OGG1, APE1, Fen1, PARP1, XRCC1) estão alterados nos tumores colorretais em relação ao tecido saudável normal pareado. Todavia, como apenas 7% dos pacientes estudados apresentam superexpressão de todos os componentes desta via simultaneamente, o quadro geral encontrado é o de desequilíbrio da via. Além disto, a sua superexpressão está associada a características consideradas como indicativos de pior prognóstico, como tumores localizados no reto, estágio TNM mais avançado, pouca diferenciação celular e presença de invasões linfática e perineural.

- Em relação ao reparo por excisão de nucleotídeos, observa-se redução do reparo acoplado à transcrição através da redução da expressão de CSB, o que está também associado a um pior prognóstico. Em contrapartida, a superexpressão de componentes da via comum (ERCC1 e XPF) também atua como indicativo de desfechos patológicos desfavoráveis.
- Ao estratificar os pacientes de acordo com a proficiência da via de reparo de malpareamento, é possível concluir que há um perfil específico de expressão do BER (através da maior expressão OGG1, MPG e PARP1), mas isto não ocorre para o NER.
- A superexpressão de MPG confere às células de CCR maior sensibilidade tanto ao 5-FU como à TMZ, fato que ocorre através da redução drásticas dos níveis citosólicos de ATP e do acúmulo de lactato.
- A superexpressão de XRCC1, não aumenta a citotoxidade à TMZ, e a citotoxidade ao 5-FU só aumenta em doses mais elevadas, sem ocasionar desequilíbrio do metabolismo.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a presença de microssatélites em tumores de câncer colorretal para definir o status (proficiente ou deficiente) da via MMR;
- Avaliar a expressão gênica dos demais componentes das vias de reparo por excisão de bases (por exemplo, UDG, Fen1, PCNA, pol δ and pol ε) para caracterizar as duas subvias, longa e curta, em tumores e tecido intestinal normal de pacientes portadores de câncer colorretal;
- Avaliar o status mutacional de $BRAF^{V600E}$ e KRAS nos tumores colorretais e correlacionar com o perfil de expressão das vias BER;
- Correlacionar os dados moleculares com dados sobre resposta à quimioterapia e construir curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença de acordo com os dados moleculares encontrados.
- Através da superexpressão de MPG e XRCC1 em células de câncer colorretal HT29 (proficientes em MMR), avaliar a sensibilidade ao 5-FU e à TMZ, bem como os mecanismos envolvidos com morte celular, através do estudo de ciclo celular;
- Modular a expressão de componentes do NER em células de câncer colorretal deficientes e proficientes em MMR para avaliar sua resposta a agentes platinados como a oxaliplatina;
- Buscar estabelecer um possível modelo do mecanismo de ação sob o ponto de vista do funcionamento integrado das vias MMR e BER.

8. REFERÊNCIAS

AGHILI, M. et al. Clinical and pathological evaluation of patients with early and late recurrence of colorectal cancer. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 6, n. 1, p. 49-52, Mar. 2010.

AHLQUIST T, et al. Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. **Molecular Cancer**, v. 7, p. 94 Dez. 2008.

ALEXANDER DD, CUSHING CA. Red meat and colorectal cancer: a critical summary of prospective epidemiologic studies. **Obesity Reviews: an official journal of the International Association for the study of obesity,** v. 12, n. 5, p. 472- 93, Mai. 2011.

ALLAN JM, TRAVIS LB. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 12, p. 943–55, Dez. 2005.

ALLEGRA CJ, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for *KRAS* gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti- epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 2091-96, Abr. 2009.

ALMEIDA KH, SOBOL RW. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 6, p. 695-711, Jun. 2007.

ALTIERI F, et al. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, n. 5, p. 891-937, Mai. 2008.

AMADO RG, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 1626-34, Abr. 2008.

American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2014–2016. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003096-pdf> Acessado em: 01/08/2016.

AN, Q, et al. 5-Fluorouracil incorporated into DNA is excised by the smug1 DNA glycosylase to reduce drug cytotoxicity. **Cancer Research**, v. 67, p .940-5. Fev. 2007.

ANDEREGGEN E, et al. Outcome of surgery for rectal cancer in octogenarians. **Swiss Medical Weekly**, v. 136, p. 185-8, Mar. 2006.

ANDERSON, JC, et al. Prevalence of colorectal neoplasia in smokers. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, n. 12, p. 2777-83, Dec. 2003.

ANDRÉ T, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 19, p. 3109-16, Jul. 2009.

APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–99, 2004.

APRILE G, et al. The relevance of BRAF and extended RAS mutational analyses for metastatic colorectal cancer patients. ***OA Molecular Oncology***, v. 1, n. 1, p. 7, Dez. 2013.

ARAN, V. et al. Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 15, n. 3, p. 195-203, Set. 2016.

BABA H, et al. Upregulation of ERCC1 and DPD expressions after oxaliplatin-based first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer. **British Jornal of Cancer**, v. 107, n. 12, p. 1950-55, Dez. 2012

BALUSU R, et al. Structure/function analysis of the interaction of adenomatous polyposis coli with DNA polymerase beta and its implications for base excision repair. **Biochemistry**, v. 46, p. 13961-74, Dez. 2007.

BARDHAN K, LIU K. Epigenetics and Colorectal Cancer Pathogenesis. **Cancers**, v. 5, n. 2, p. 676–713, Jun. 2013.

BAYLIN SB, OHM JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nature Reviews. Cancer**, v. 6, n. 2, p. 107-16, Fev. 2006.

BELOV L, et al. Cell surface markers in colorectal cancer prognosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 78-113, Dez. 2010.

BENATTI P, et al. Microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. **Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research,** v. 11, n. 23, p. 8332–40, Dez. 2005.

BIAGI JJ, et al. Association Between Time to Initiation of Adjuvant Chemotherapy and Survival in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA**, v. 305, n. 22, p. 2335-42, Jun. 2011.

BINDRA RS, et al. Down-Regulation of Rad51 and Decreased Homologous Recombination in Hypoxic Cancer Cells. **Molecular and Cellular Biology,** v. 24, n. 19, p. 8504-18, Out. 2004.

BOLAND CR, GOEL A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2073-87, Jun. 2010.

BRENNER H, et al. Colorectal cancer. **Lancet**, v. 383, n. 9927, p. 1490–502, Abr. 2014.

BRIDGES BA. Error prone DNA repair and translesion synthesis: focus on the replication fork. **DNA Repair (Amst)**, v. 4, n. 5, p. 618–34, Mai. 2005.

BURT RW, et al. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. **Annual Review of Medicine**, v. 46, p. 371-9, 1995.

CAHILL DP, et al. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 300-3, Mar. 1998.

CALDECOTT KW. Single-strand break repair and genetic disease. **Nature Reviews. Genetics**, v. 9, n. 8, p. 619–31, Ago. 2008.

CALDECOTT KW. XRCC1 and DNA strand break repair. DNA Repair (Amst), v. 2, p. 955–69, Set. 2003.

CAMPS C, et al. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression and association with HIF binding reveals the complexity of microRNA expression regulation under hypoxia. **Molecular Cancer**, v.13, n. 28, 2014.

CAPUTO M, et al. The CSB repair factor is overexpressed in cancer cells, increases apoptotic resistance, and promotes tumor growth. **DNA Repair (Amst),** v. 12, n. 4, p. 293-9, Abr. 2013.

CASSIDY J, et al. Efficacy of capecitabine versus 5-fluorouracil in colorectal and gastric

cancers: a meta-analysis of individual data from 6171 patients. **Annals of Oncology: official journal of the European Society for medical Oncology/ESMO**, v. 22, n. 12, p. 2604-9, Dez. 2011.

CHAN N, et al. Hypoxia Provokes Base Excision Repair Changes and a Repair-deficient, Mutator Phenotype in Colorectal Cancer Cells. **Molecular Cancer Research: MCR,** v. 12, n. 10, p. 1407-15, Out. 2014.

CHANEY SG, et al. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 53, p. 3-11. Jan. 2005.

CHANG GJ, et al. Lymph node evaluation and survival after curative resection of colon cancer: systematic review. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 6, p. 433-41, Mar. 2007.

CHEN DL, et al. Identification of microRNA-214 as a negative regulator of colorectal cancer liver metastasis by way of regulation of fibroblast growth factor receptor 1 expression. **Hepatology: official journal of the American Association for the Study of Liver Diseases**, v. 60, p. 598-609, Ago. 2014.

CHEN JL, et al. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 12, Dez. 2008.

CHRISTMANN M, et al. Mechanisms of human DNA repair: na update. **Toxicology**, v. 193, p. 3-34, Nov. 2003.

CHUA W, et al. Molecular markers of response and toxicity to FOLFOX chemotherapy in metastatic colorectal cancer. British Journal of Cancer, v. 101, n. 6 p. 998-1004, Set. 2009.

CLEAVER JE, et al. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. **Nature Reviews. Genetics**, v. 10, p. 756-68, Nov. 2009.

CLEAVER JE, REVET I. Clinical implications of the basic defects in Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum and the DNA lesions responsible for cancer, neurodegereration and aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, p. 492-7, Jul-Ago. 2008.

COIMBRA FJF, et al. Avanços no tratamento cirúrgico das metástases hepáticas colorretais.

Revista da Associação Médica Brasileira, v. 57, n. 2, p. 220-7, Mar-Abr. 2011.

COLUSSI D, et al. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. **International journal of molecular sciences**, v. 14, p. 16365-85, Ago. 2013.

COMPTON C, et al. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group. **Cancer**, v. 88, n. 7, p. 1739-57, Abr. 2000.

COMPTON C. Prognostic factors in cancer. 3rd ed: John Wiley & Sons; 2006.

COMPTON C.C. Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer. 2012. Disponível em: http://www.uptodate.com/contents/pathology-and-prognostic-determinants-of-colorectal-cancer. Acesso em: 01/08/2016.

COMPTON CC, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 124, n. 7, p. 979-94, Jul. 2000.

COPPEDE F, et al. Gene promoter methylation in colorectal cancer and healthy adjacent mucosa specimens: correlation with physiological and pathological characteristics, and with biomarkers of one-carbon metabolism. **Epigenetics,** v. 9, p. 621–33, Abr. 2014.

CUNNINGHAM D, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan- refractory metastatic colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 4, p .337–45, Jul. 2004.

CURTIN NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. **Nature Reviews. Cancer**, v. 12, n. 12, p. 801-17, Dez. 2012.

DA SILVA FC, et al. Mismatch repair genes in Lynch Syndrome: a review. **Revista paulista de medicina**, v. 127, p. 46-51, Jan. 2009.

DAS D, et al. 5-Fluorouracil mediated anti-cancer activity in colon cancer cells is through the induction of Adenomatous Polyposis Coli: Implication of the long-patch base excision repair pathway. **DNA repair (Amst),** v. 24, p. 15-25, Dez.2014.

DAVIES H, et al., Mutations of the *BRAF* gene in human cancer, **Nature**, v. 417, n. 6892, p.

949–54, Jun. 2002.

DE BONT R, VAN LAREBEKE N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, v. 19, n. 3, p. 169–85, Mai. 2004.

DE GRAMONT A, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 16, p. 2938-47, Ago 2000.

DE LA CHAPELLE A. Microsatellite Instability. **New England Journal of Medicine,** v.349, n. 3, p. 209-10, Jul. 2003.

DERWING K, GUSTAVSSON B. A study of lymph node ratio in stage IV colorectal cancer. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 6, p 127, Dez. 2008.

DES GUETZ G, et al. Prognostic impact of microsatellite instability in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX. **Anticancer Research**, v. 30, p. 4297-301, Out. 2010.

DIANOV G, et al. Repair of 8- oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. **Nucleic Acids Research,** v.27, n. 5, p.1365-8, Mar. 1999.

DIANOV G, et al. Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 50, p. 33811–6, Dez. 1998.

DIANOV GL, HÜBSCHER U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 6, p. 3483-90, Abr. 2013.

DIETMAIER W, et al. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. **Cancer Research**, v. 57, n. 21, p. 4749-56, Nov. 1997.

DOMINGO E, et al. Use of multivariate analysis to suggest a new molecular classification of colorectal cancer. **Journal of Pathology**, v. 229, p. 441-8, Fev. 2013.

DOUILLARD JY, et al. Panitumumab- FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 11, p. 1023–34, Set. 2013.

DZIAMAN T, et al. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and uric acid as efficient predictors of survival in colon cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 2, p. 376-83, Jan. 2014.

ESTELLER M, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, p. 26-32, Jan. 2002.

ESTELLER M, HERMAN JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 1, p.1-8, Jan. 2004.

FAIVRE S, et al. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 225-37, Jul. 2003.

FAN L, et al. Lymph node retrieval from colorectal resection specimens for adenocarcinoma: is it worth the extra effort to find at least 12 nodes? **Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland**, v. 13, p. 1377-83, Dez. 2011.

FARHOUD S, et al. Variáveis clínicas e macroscópicas que influenciam o prognóstico do carcinoma colorretal. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 39, n. 3 p. 163-72, Jul-Set. 2002.

FEARON E R, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-67, Jun. 1990.

FEARON ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 479–507, 2011.

FEDIRKO V, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose- response meta-analysis of published studies. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 9, p. 1958-72, Set. 2011.

FERLAY J, et al. GLOBOCAN 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer Social Inequalities and Cancer, 2013.

FERREIRA, LM. Cancer metabolism: The Warburg effect. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 89, n. 3, p. 372-80, Dez. 2010.

FISCHER F, BAERENFALLER K, JIRICNY J. 5-Fluorouracil is efficiently removed from DNA by the base excision and mismatch repair systems. **Gastroenterology**, v. 133, p. 1858-

68, Dez. 2007.

FISHEL ML, et al. Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide. **Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 1, p. 260-67, Jan. 2007.

FRANSÉN K, et al. Mutation analysis of the *BRAF*, *ARAF* and *RAF-1* genes in human colorectal adenocarcinomas. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 4, p. 527–33, Abr. 2004.

FRIDMAN WH, et al. Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 344, p. 1-24. 2011.

FRIEDBERG EC, WALKER GC, SIEDE W, WOOD RD, SCHULTZ R.A, ELLENBERGER T. DNA repair and mutagenesis. Washington: ASM Press. 2006. p.1118.

FRONTINI M, PROIETTI-DE-SANTIS L. Interaction between the Cockayne syndrome B and p53 proteins: implications for aging. **Aging**, v. 4, n. 2, p. 89-97, Fev. 2012.

FU D, CALVO JA, SAMSON LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 2, p. 104-20, Jan. 2012.

FUKUI K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. **Jornal of Nucleic Acids,** Jul. 2010.

GATENBY, RA, GILLIES, RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature Reviews. Cancer**, v. 4, n. 11 p. 891-9, Nov. 2004.

GAVIN PG, et al. Colon cancer mutation: prognosis/prediction--response. **Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research,** v. 19, p. 1301, Mar. 2013.

GAVIN PG, et al. Colon cancer mutation: prognosis/prediction--response. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 5, p. 1301, Mar. 2013.

GENG L, et al. Checkpoint Signaling, Base Excision Repair, and PARP Promote Survival of Colon Cancer Cells Treated with 5-Fluorodeoxyuridine but Not 5-Fluorouracil. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12. 2011.

GILL S, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology,** v. 22, n. 10, p. 1797–806, Mai. 2004.

GOELLNER EM, et al. Overcoming temozolomide resistance in glioblastoma via dual inhibition of NAD^+ biosynthesis and base excision repair. **Cancer Research**, v. 71, n. 6, p. 2308-17, Mar. 2011.

GONZALEZ-PONS, CRUZ-CORREA M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? **BioMed Research International,** Mai. 2015.

Gordon PH, Nivatvongs S. Principles and practices of surgery for the Colon, Rectum, and Anus. Segunda Edição. Saint Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc. 1999.

GREGG SQ, ROBINSON AR, NIEDERNHOFER LJ. Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease. **DNA Repair (Amst),** v. 10, p. 781-91, Jul. 2011.

GREYSTOKE A, MULLAMITHA SA. How Many Diseases Are Colorectal Cancer? **Gastroenterology Research and Practice,** Sep. 2012.

GROTHEY A, et al. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. **Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 22, p. 1209-14, Abr. 2004.

GRYFE R, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 2, p. 69–77, Jan. 2000.

GUASTADISEGNI C, et al. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 15, p. 2788–98, Out. 2010.

HALF EE, BRESALIER RS. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. **Current Opinion in Gastroenterology,** v. 20, n. 1, p. 32-42, Jan. 2004.

HALLER DG, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. **Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology,** v. 29, p. 1465-71, Abr. 2011.

HANSEN RD, et al. Effects of smoking and antioxidant micronutrients on risk of colorectal cancer. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n .4, p. 406-15, Abr. 2013.

HARDING HP, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Molecular Cell**, v. 6, n. 5, p. 1099-108, Nov. 2000.

HARI DM, et al. AJCC cancer staging manual 7th edition criteria for colon cancer: Do the complex modifications improved prognostic assessment? **Journal of the American College of Surgeons**, v. 217, n. 2, p. 181–90, Ago. 2013.

HAYNES B, et al. Crosstalk between Translesion Synthesis, Fanconi Anemia Network, and Homologous Recombination Repair Pathways in Interstrand DNA Crosslink Repair and Development of Chemoresistance. **Mutation research. Reviews in mutation research,** v. 763, p. 258-66, Jan-Mar. 2015.

HEGI ME, et al. Correlation of O6 -methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. **Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, p. 4189–99, Set. 2008.

HEGI ME, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **The New England journal of medicine**, v. 352, p. 997-1003, Mar. 2005.

HERRERA M, et al. Differences in repair of DNA cross-links between lymphocytes and epithelial tumor cells from colon cancer patients measured *in vitro* with the comet assay. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 17, p. 5466-72, Set. 2009.

HIBI K, et al. Methylation of the MGMT gene is frequently detected in advanced gastric carcinoma. **Anticancer Research**, v. 29, p. 5053–5, Dez. 2009.

HITOMI K, IWAI S, TAINER JA. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair. **DNA Repair (Amst),** v. 6, n. 4, p. 410–28, Abr. 2007.

HOCHHAUSER D, et al. A phase II study of temozolomide in patients with advanced aerodigestive tract and colorectal cancers and methylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 5, p. 809-18, Mai.

2013.

HOEIJIMAKERS JH. DNA damage, aging, and cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 15, p. 1475–85, Out. 2009.

HORTON JK, et al. XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. **Cell Research,** v. 18, n. 1, p. 48–63, Jan. 2008.

HSIEH P, YAMANE K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development,** v. 129, n. 7-8, p. 391–407, Jul-Ago. 2008.

HSU PP, SABATINI DM. Cancer Cell Metabolisms: Warburg and Beyond. Cell, v. 134, n. 5, p. 703-7, Set. 2008.

HUANG MY, et al. Predictive value of ERCC1, ERCC2, and XRCC1 overexpression for stage III colorectal cancer patients receiving FOLFOX-4 adjuvant chemotherapy. **Journal of Surgical Oncology**, v. 108, n. 7, p. 457-64, Dez. 2013.

HUGHES LA, et al. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1825, p. 77-85, Jan. 2012.

IKENOUE T, et al. Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of BRaf in human colorectal tumors. **Cancer Research**, v. 63, n. 23, p. 8132–37, Dez. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. Estimativas 2014. Síntese de Resultados e Comentários. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em 27 de Julho de 2016.

IRIGARAY P, BELPOMME D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. **Carcinogenesis,** v. 31, n. 2, p. 135–48, Fev. 2010.

ISHIBASHI K, et al. Relationship between the size and metastasis of hepatic lymph nodes in patients with synchronous liver metastasis of colorectal cancer. **Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy**, v. 34, n. 12, p. 2035-7, Nov. 2007.

ISSA JP. Colon cancer: it's CIN or CIMP. **Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 19, p. 5939–40, Out. 2008.

IWATSUKI M, et al. A platinum agent resistance gene, POLB, is a prognostic indicator in colorectal cancer. **Journal of Surgical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology,** v. 100, n. 3, p. 261-66, Set. 2009.

JACOBS AL, SCHAR P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. **Chromosoma,** v. 121, n. 1, p. 1–20, Fev. 2012.

JAFARABADI MA, et al. Does the prognosis of colorectal cancer vary with tumor site? **Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench**, v. 4, n. 4, p. 199-209, 2011.

JAISWAL AS, NARAYAN S. Assembly of the base excision repair complex on abasic DNA and role of adenomatous polyposis coli on its functional activity. **Biochemistry,** v. 50, p. 1901-09, Mar. 2011.

JASS JR, et al. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 45, n. 1, p. 1-13, Jan. 2007.

JIANG Y, et al. Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **European Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 11, p. 863-76, Nov. 2011.

JONSSON C, et al. DNA adducts in normal colonic mucosa from healthy controls and patients with colon polyps and colorectal carcinomas. **Mutagenesis**, v. 25, n. 5, p. 499-504, Set. 2010.

JOVER R, et al. Defective mismatch- repair colorectal cancer: clinicopathologic characteristics and usefulness of immunohistochemical analysis for diagnosis. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 122, n. 3, p. 389–94, Set. 2004.

JOVER R, et al. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. **European journal of cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 45, n. 3, p. 365-73, Fev. 2009.

KAINA, B, et al. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 8, p. 1079-99, Ago. 2007.

KAWAKAMI H, ZAANAN A, SINICROPE FA. Implications of mismatch repair-deficient status on management of early stage colorectal cancer. **Journal of Gastrointestinal**

Oncolology, v. 6, n. 6, p. 676-84, Dez. 2015

KENNEDY KM, et al Catabolism of Exogenous Lactate Reveals It as a Legitimate Metabolic Substrate in Breast Cancer. **PLoS One**, v. 12, n. 8, Set. 2013.

KERR DJ, MIDGLEY R. Defective mismatch repair in colon cancer: a prognostic or predictive biomarker? **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 20, p. 3210-2, Jul. 2010.

KHAN OA, et al. A phase II trial of lomeguatrib and temozolomide in metastatic colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 98, n. 10, p. 1614-8, Mai. 2008.

KIM CY, et al. ERCC1 as a predictive marker for FOLFOX chemotherapy in an adjuvant setting. **Annals of Coloproctology**, v. 31, p. 92-7, Jun. 2015.

KIM YJ, WILSON DM. Overview of Base Excision Repair Biochemistry. **Current molecular pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 3-13, Jan. 2012.

KLOOR, M. Lymphocyte infiltration and prognosis in colorectal cancer. **The Lancet. Oncology**, v. 10, n. 9, p. 840-1, Set. 2009.

KNIJN N, et. al. Perineural Invasion is a Strong Prognostic Factor in Colorectal Cancer: A Systematic Review. **The American journal of surgical pathology,** v. 40, n. 1, p. 103-12, Set. 2016.

KOBAYASHI H, et al. Messenger RNA expression of TS and ERCC1 in colorectal cancer and matched liver metastasis. **International journal of oncology**, v. 33, n. 6, p. 1257-62, Dez. 2008.

KOBAYASHI J, et al. Current topics in DNA double-strand break repair. **Journal of radiation research**, v. 49, n. 2, p. 93-103, Mar. 2008.

KOOPMAN M, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 100, p. 266-73, Jan. 2009.

KOW YW. Repair of deaminated bases in DNA. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n.. 7, p. 886–93, Out. 2002.

KROKAN HE, et al. Uracil in DNA–occurrence, consequences and repair. **Oncogene**, v. 21, n. 58, p. 8935–48, Dez, 2002.

KUMAR MS, SARIN SK. Biomarkers of disease in medicine. **Current Trends in Science**, p. 403–17, 2009.

KUNZ C, et al. Base excision by thymine DNA glycosylase mediates DNA-directed cytotoxicity of 5-fluorouracil. **PLoS Biology**, v. 7, n. 4, Abr. 2009.

KUPER J, KISKER C. Damage recognition in nucleotide excision DNA repair. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 22, n. 1, p. 88-93, Fev. 2012.

LABIANCA R, et al. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology,** v.24, Suppl 6*,* Out. 2013.

LANZA G, et al. Immunohistochemical pattern of MLH1/MSH2 expression is related to clinical and pathological features in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology**, v. 15, p. 741-749, Jul. 2002.

LANZA G, et al. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. **Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 15, p. 2359-67, Mai. 2006.

LE PAGE F, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is required in murine cell lines for base excision repair of oxidative DNA damage in the absence of DNA polymerase beta. The Journal of Biological Chemistry, v. 278, n. 20, p. 18471–7, Mai. 2003.

LE VOYER TE, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT – 0089. **Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 21, n. 15, p. 2912-9, Ago. 2003.

LEE SI, et al. A survey on the impact of operation volume on rectal cancer management. **Journal of Korean medical Science**, v. 22, (Suppl):S86- 90, 2007.

LEGOLVAN MP, RESNICK M. Pathobiology of colorectal cancer hepatic metastases with an emphasis on prognostic factors. **Journal of Surgical Oncology**, v. 102, n. 8, p. 898-908, Dez. 2010.

LI GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 85–98, Jan. 2008.

LI LS, et al. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 679-92, Out. 2009.

LI P, et al. ERCC1, defective mismatch repair status as predictive biomarkers of survival for stage III colon cancer patients receiving oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. **Br J Cancer, v. 108, p.** 1238–44, 2013.

LI Y, et al. Prognostic value of MGMT methylation in colorectal cancer: a meta-analysis and literature review. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 36, n. 3, p. 1595-1601, Mar. 2015.

LIEVRE A, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. **Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 3, p. 374- 379, Jan. 2008.

LINDAHL T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v. 362, n. 6422, p. 709-15, Abr. 1993.

LINDHAL T. Supression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. **Mutation Research**, v. 462, n. 1-2, p. 129-35, Abr. 2000.

LINDOR NM, et al: Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. **Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 4, p. 1043-48, Fev. 2002.

LIPKIN SM, WANG V, STOLERETAL DL. Germline and somatic mutation analyses in the DNA mismatch repair gene *MLH3*: evidence for somatic mutation in colorectal cancers. **Human Mutation**, v. 17, n. 5, p. 389–96, Mai. 2001.

LIU B, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. **Nature Genetics**, v. 9, n. 1, p. 48-55, Jan. 1995.

LIU GH, et al. Serum *miR-21* and *miR-92a* as biomarkers in the diagnosis and prognosis of

colorectal cancer. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 34, n. 4, p. 2175-2181, Ago. 2013.

LONGATTO-FILHO A, et al. Lymphatic vessel density and epithelial D2-40 immunoreactivity in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. **Gynecologic Oncology**, v.107, n. 1, p. 45–51, Out. 2007.

LORD CJ, ASHWORTH A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v.481, n. 7381, p. 287–94, Jan. 2012.

LUNT SY, VANDER HEIDEN, MG. Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation, **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, p. 441-64, 2011.

LYNCH HT, DE LA CHAPELLE A. Genetic susceptibility to nonpolyposis colorectal cancer. **Journal of Medical Genetics**, v. 36, n. 11, p.801-18, Nov. 1999.

LYNCH HT, DE LA CHAPELLE, A. Hereditary colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 10, p. 919-932, Mar. 2003.

LYNCH HT, SMYRK T, LYNCH JF. Molecular genetics and clinical-pathology features of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome): historical journey from pedigree anecdote to molecular genetic confirmation. **Oncology**, v. 55, n. 2, p. 103-8, Mar – Abr. 1998.

MA R, et al. Diagnostic and prognostic markers in gliomas—an update. **British Journal of Neurosurgery**, v. 27, n. 3, p. 311-5, Jun. 2013.

MAGUIRE A, SHEAHAN K. Controversies in the pathological assessment of colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 29, p. 9850-61, Ago. 2014.

MALAQUIN N, et al. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. 6, p. 94, Mar. 2015.

MALEKZADEH R, et al. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in iran: a review. **Archives of Iranian medicine**, v. 12, n. 2, p. 161-9, Mar. 2009.

MARKOWITZ SD, BERTAGNOLLI MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of

colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 25, p.2449–60, Dez. 2009.

MARNETT LJ. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 361–70, Mar. 2000.

MARTEIJN JA, et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 7, p. 465-81, Jul. 2014.

MARZOUK O, SCHOFIELD J. Review of Histopathological and Molecular Prognostic Features in Colorectal Cancer. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 2767-2810, Jun. 2011.

MATSUDA T, et al. Size does not determine the grade of malignancy of early invasive colorectal. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 22, p. 2708 -13, Jun. 2009.

MATUO R, et al. DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP. **Biochemical Pharmacology***,* v. 79, n. 2, p. 147-153, Jan. 2010.

MAYNARD S, et al. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 1, p. 2-10, Jan. 2009.

MCCULLOCH SD, KUNKEL TA. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 148–161, Jan. 2008.

MEGUID RA, et al. Is there a difference in survival between right – versus left – sided colon cancers? **Annals of Surgical Oncology,** v. 15, n. 9, p.2388-94, Set. 2008.

MELIS JPM, VAN STEEG H, LUIJTEN M. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 18, p. 2409-19, Jun. 2013.

MENCK CF, MUNFORD V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? **Genetics and Molecular Biology**, v.37 (1 suppl), p. 220-33, Mar. 2014.

MENIGATTI M, et al. Normal colorectal mucosa exhibits sex- and segment-specific susceptibility to DNA methylation at the hMLH1 and MGMT promoters. **Oncogene**, v. 29, n. 6, p. 899-909, Fev. 2009.

MICHL J, ZIMMER J, TARSOUNAS M. Interplay between Fanconi anemia and homologous recombination pathways in genome integrity. **The EMBO Journal,** v.35, n.9, p.909-923, Mai. 2016.

MORENO-SÁNCHEZ R, et al. Energy metabolism in tumor cells. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 6, p. 1393-418, Mar. 2007.

NAGARIA P, et al. SMUG1 but not UNG DNA glycosylase contributes to the cellular response to recovery from 5-fluorouracil induced replication stress. **Mutation Research**, v. 743–744, p. 26–32, Mar-Abr. 2012.

NAGASAKA T, et al. Methylation pattern of the O6 -methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis. **International Journal of Cancer**, v. 122, n.11, p. 2429–36, Jun. 2008.

NAGEL ZD, et al. Inter-individual variation in DNA repair capacity: A need for multi-pathway functional assays to promote translational DNA repair research. **DNA Repair (Amst),** v. 19, p. 199–213, Jul. 2014.

NAMM J, et al. Quantitating the Impact of Stage Migration on Staging Accuracy in Colorectal Cancer. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 207, n. 6, p. 882–7, Dez. 2008.

NAY SL, O'CONNOR TR. Direct Repair in Mammalian Cells. In: Clark Chen. **New Research Directions in DNA Repair**. 22 de Maio de 2013, p. 123-62.

NAZEMALHOSSEINI MOJARAD E, et al. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 6, n. 3, p. 120-28. 2013.

NIELSEN M, et al. Colorectal carcinomas in MUTYH-associated polyposis display histopathological similarities to microsatellite unstable carcinomas. **BMC Cancer**, v. 9, p. 184-98, Jun. 2009.

NOLL DM, MASON TM, MILLER PS. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 2, p.277–301, Fev. 2006.

O'CONNEL MJ, et al. Survival following recurrence in stage II and III colon cancer: findings from the ACCENT data set. **Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 14, p. 2336-41, Mai. 2008.

OBTULOWICZ T, et al. Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. **Mutagenesis**, v. 25, n. 5, p. 463-71, Set. 2010.

OGINO S. et al. Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population- based sample. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 9, n. 3, p. 305–14, Jul. 2007.

PAIK J, et al. Sensitization of human carcinoma cells to alkylating agents by small interfering RNA suppression of 3-alkyladenine-DNA glycosylase. **Cancer Research**, v. 65, n. 22, p. 10472-7, Nov. 2005.

PARSONS JL, DIANOV GL. Co-ordination of base excision repair and genome stability. **DNA Repair (Amst)**, v. 12, n. 5, p. 326-33, Mai. 2013.

PEPPONE LJ, et al. Morrow Examining the association between cigarette smoking and colorectal cancer using historical case– control data. **Cancer Epidemiology**, v. 33, n. 3-4, p. 182-188, Out. 2009.

PEREZ RO, et al. Mucinous colorectal adenocarcinoma: influence of mucin expression (Muc1,2 and 5) on clinico-pathological features and prognosis. **International journal of colorectal disease***,* v. 23, n. 8, p. 757-65, Ago. 2008.

PETERMANN E, ZIEGLER M, OEI SL. ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. **DNA Repair (Amst)**, v. 2, n. 10, p. 1101–14, Out. 2003.

PETTERSEN HS, et al. UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 19, p. 8430–44, Out. 2011.

POPAT S., et al. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. **Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 3, p. 609–18, Jan 2005.

POULSEN MLM, BISGAARD ML. *MUTYH* Associated Polyposis (MAP). **Current Genomics**, v. 9, n. 6, p. 420-435, Set. 2008.

RAVANAT JL, et al. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 63, n. 1–3, p.:88–102, Out. 2001

Ravanat JL. Measuring oxidized DNA lesions as biomarkers of oxidative stress: an analytical challenge. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 2, p. 100–13, 2005.

RAYNER E, et al. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 16, n. 2, p. 71-81, Fev. 2016.

REIFENBERGER G, et al. Predictive impact of MGMT promoter methylation in glioblastoma of the elderly. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 6, p. 1342-50, Set. 2012.

RENEHAN AG, et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. **The Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 569-78, Fev. 2008.

RESENDIS-ANTONIO O, CHECA A, ENCARNACIÓN S. Modeling Core Metabolism in Cancer Cells: Surveying the Topology Underlying the Warburg Effect. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. 1-11, Ago. 2010.

REYNÉS G, et al. A phase I study of irinotecan in combination with metronomic temozolomide in patients with recurrent glioblastoma. **Anticancer Drugs**, v. 25, n. 6, p. 717-22, Jul. 2014.

RIBIC CM, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 3, p. 247-57, Jul. 2003.

RICH T, ALLEN RL, WYLLIE AH. Defying death after DNA damage. **Nature**, v. 407, n. 6805, p.777-83, Out. 2000.

RINNE M, CALDWELL D, KELLEY MR. Transient adenoviral N-methylpurine DNA glycosylase overexpression imparts chemotherapeutic sensitivity to human breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 8, p. 955–67, Ago. 2004.

ROBBINS NM, SWANSON RA. Opposing effects of glucose on stroke and reperfusion injury: acidosis, oxidative stress, and energy metabolism. **Stroke: a jornal of cerebral circulation**, v. 45, n. 6, p. 1881-6, Jun. 2014.

ROCHA JCC, DUQUE CG. Câncer colorretal. In: Eds: FERREIRA CG, ROCHA JC, Oncologia Molecular. Editora Atheneu, 2a Edição, 2010, 263-269.

RÖDEL C, et al. Oxaliplatin added to fluorouracil-based preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy of locally advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 study): final results of the multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncology**, v. 16, n. 8, p. 979-89, Ago. 2015.

RODRIGUEZ-JIMENEZ FJ, et al. Hypoxia causes downregulation of mismatch repair system and genomic instability in stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 8, 2052-62, Ago. 2008.

ROOCK W, et al. Effects of *KRAS, BRAF, NRAS*, and *PIK3CA* mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 8, p. 753–762, Jun. 2010.

ROOCK WD, et al. *KRAS, BRAF, PIK3CA*, and *PTEN* mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 6, p. 594–603, Jun. 2011.

ROOS WP, THOMAS AD, KAINA B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature Reviews.** Cancer, v. 16, n. 1, p. 20-33, Jan. 2016.

SAMOWITZ WS, et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention,** v. 10, n. 9, p. 917–23, Set. 2001.

SANTOS JC, et al. Effect of APE1 T2197G (Asp148Glu) Polymorphism on APE1, XRCC1, PARP1 and OGG1 Expression in Patients with Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n.10, p. 17333-43, Set. 2014.

SARASIN A, KAUFFMANN A. Overexpression of DNA repair genes is associated with metastasis: a new hypothesis. **Mutation Research**, v. 659, n. 1-2, p. 49-55, Jul-Ago. 2008.

SARGENT DJ, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 20, p.3219-26, Jul. 2010.

SCANLON SE, GLAZER PM. Multifaceted Control of DNA Repair Pathways by the Hypoxic Tumor Microenvironment. DNA repair, v. 32, p.180-189, 2015.

SCHARER, OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, *v.* 5, n. 10, Out. 2013.

SEDELNIKOVA OA. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. **Mutation research,** v. 704, n. 1-3, p. 152-9, Abr-Jun. 2010.

SEYFRIED TN, et al. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. **Carcinogenesis,** v. 35, n. 3, p. 515-527, 2014.

SHACHAM-SHMUELI E, et al. Response to temozolomide in patients with metastatic colorectal cancer with loss of MGMT expression: a new approach in the era of personalized medicine? **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 10, p. e262–e265, Abr. 2011.

SHEN L, et al. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.97, n. 18, p. 1330–8, Set. 2005.

SHEN SS, et al. Number of lymph nodes examined and associated clinicopatologic factors in colorectal carcinoma. **Archives of pathology and laboratory medicine**, v. 135, n. 5, p. 781-6, Mai. 2009.

SIMIANTONAKI N, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression. **BMC Cancer**, v. 8, p. 320, Nov. 2008.

SIMONELLI V, et al. Base excision repair intermediates are mutagenic in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(14):4404-4411.

SIMONELLI V, et al. Crosstalk between mismatch repair and base excision repair in human gastric cancer. **Oncotarget**, Jun. 2016.

SINICROPE FA, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 11, p. 863-75, Jun. 2011.

SINICROPE FA, et al. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. **Gastroenterology**, v. 131, n. 3, p. 729-37, Set. 2006.

SINICROPE FA, SARGENT DJ. Molecular pathways: Microsatellite instability in colorectal cancer, prognostic, predictive, and therapeutic implications. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 6, p. 1506-1512, Mar. 2012.

SLYSKOVA J, et al. Functional, genetic, and epigenetic aspects of base and nucleotide excision repair in colorectal carcinomas. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 21, p. 5878-5887, Nov. 2012.

SMITH LK, POPE C, BOTHA JL. Patients help seeking experiences and delay in cancer presentation: A qualitative synthesis. **Lancet**, v. 366, n. 9488, p. 825–31, Set. 2005.

SOBOL RW, et al. Mutations associated with base excision repair deficiency and methylation-induced genotoxic stress. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2002 May 14; 99(10):6860-

SPIVAK G, GANESAN AK. The complex choreography of transcription-coupled repair. **DNA Repair (Amst)**, v. 19, p. 64-70, Jul. 2014

SPIVAK G, HANAWALT PC. Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. **DNA Repair (Amst)**, v. 5, n. 1, p. 13-22, Jan. 2006.

STACKER SA, BALDWIN ME, ACHEN MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 9, p. 922-34, Jul. 2002.

STARESINCIC L, et al. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 8, p. 1111–1120, Abr. 2009.

STOFFEL E, et al. Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1621-7, Nov. 2009.

STORR SJ, et al. Redox environment, free radical, and oxidative DNA damage. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 18, p. 2399-2408, Jun. 2013.

SULZYC-BIELICKA V, et al. Colorectal cancers differ in respect of PARP-1 protein expression. **Polish journal of pathology: official journal of the Polish Society of Pathologists**, v. 63, n. 2, p. 87-92, Jun. 2012.

SUNG JS, DEMPLE B. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. **The Febs Journal**, v. 273, n. 8, p. 1620–1629, Abr. 2006.

SVRCEK M, et al. Methylation tolerance due to an O^6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. **Gut**, v. 59, n. 11, p. 1516-1526, Nov. 2010.

SWIDERSKA M, et al. The diagnostics of colorectal cancer. **Contemporary oncology Współczesna onkologia**, v. 18, n. 1, p. 1–6, Jan 2014.

TAIRA K, et al. Distinct pathways for repairing mutagenic lesions induced by methylating and ethylating agents. **Mutagenesis**, v. 28, n. 3, p. 341-50. Mai, 2013.

TANAKA T., TANAKA M, ISHIGAMORI R. Biomarkers for colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 9, p. 3209–25, Set 2010.

TANG J, et al. Bioenergetic metabolites regulate base excision repair dependent cell death in response to DNA damage. **Molecular cancer research: MCR**, v. 8, n. 1, p. 67-79, Jan. 2010.

TANG J, et al. N-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase β modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to temozolomide. **Neuro-Oncology**, v. 13, n. 5, p. 471-486, Mai. 2011.

TAVERNA P, et al. Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells. **Mutation Research**, v. 485, n. 4, p. 269-81, Mai. 2001.

TEIPAR S, PIESSEVAUX H. Personalized medicine in metastatic colorectal cancer treated with anti-epidermal growth factor receptor agents: a future opportunity? **Asia-Pacific journal of clinical oncology**, v.10, Suppl 1, p. 2-10, Mar. 2014.

THORSLUND T, et al. Cooperation of the Cockayne Syndrome Group B Protein and Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 in the Response to Oxidative Stress. **Molecular and Cellular Biology.** v. 25, n. 17, p. 7625-36, Set. 2005.

TOIYAMA Y, et al. Serum miRNA-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. **Annals of Surgery**, v. 259, n. 4, p. 735-743, Abr. 2014.

TOL J, NAGTEGAAL ID, PUNT CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer. **New England Journal of Medicine**, 2009; v.361, n. 1, p. 98-9, Jul. 2009.

TRIVEDI RN, et al. The Role of Base Excision Repair in the Sensitivity and Resistance to Temozolomide Mediated Cell Death. **Cancer Research**, v. 65, n. 14, p. 6394-400, Jul. 2005.

TRIVEDI RN, et al. Human methyl purine DNA glycosylase and DNA polymerase ß expression collectively predict sensitivity to temozolomide. **Molecular pharmacology**, v. 74, n. 2, p. 505-16, Ago. 2008.

TSODIKOV OV, et al. Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 22, p. 4768-76, Nov. 2007.

TWELVES C, et al. Capecitabine versus 5- fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results from the X-ACT trial with analysis by age and preliminary evidence of a pharmacodynamic marker of efficacy. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 5, p. 1190-7, Mai. 2012.

UMAR A, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 4, p. 261-8, Fev. 2004.

VAN CUTSEM E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer, **The New England journal of medicine**, v. 360, n. 14, p. 1408–17, Abr. 2009.

VAN CUTSEM E, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 7, p. 692-700, Mar. 2015.

VARELA-REY M, et al. Alcohol, DNA methylation, and cancer. **Alcohol research: current reviews**, v.35, n. 1, p. 25–35, 2013.

VASQUES ALR, PERES MA. Tendência temporal da mortalidade por câncer de cólon e reto em Santa Catarina no período entre 1980 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 19, n. 2, p. 91-100. Abr-Jun. 2010.

VERHULST J, et al. Mucinous subtype as prognostic factor in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Pathology**, v.65, n.5, p.381-388, Mai. 2012.

VILAR E, GRUBER SB. Microsatellite instability in colorectal cancer the stable evidence. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v.7, n. 3, p. 153-62, Mar. 2010.

VOGELSTEIN B, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 9, p. 525–32, Set. 1988.

VOGT S, et al. Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH associated polyposis. **Gastroenterology**, v. 137, n. 6, p. 1976–85, Dez. 2009.

VOLKER M, et al. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. **Molecular Cell**, v. 8, n.1, p. 213-24. Jul. 2001.

WALLACE SS. Base excision repair: A critical player in many games. **DNA repair (Amst)**, v. 19, p. 14-26, Jul. 2014.

WALTHER R, HOULSTON R, TOMLINSON I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. **Gut**, v. 57, n. 7, p. 941–50, Jul. 2008.

WANG MJ, et al. Down-regulation of microRNA- 124 is an independent prognostic factor in patients with colorectal cancer. **International journal of colorectal disease**, v. 28, n. 2, p. 2183-9, Fev. 2013.

WANG Y. Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species. **Chemical research in toxicology,** v. 21, n. 2, p. 276-81, Fev. 2008.

WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. **Science**, v. 124, n. 3215, p. 269-70, Ago. 1956.

WARD PS, THOMPSON CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell,** v.21, n. 3, p. 297-308, 2012.

WEITZ J, et al. Colorectal cancer. **The Lancet**, v. 365, n. 9454, p. 153-65, Jan. 2005.

WELSH SJ, et al. Expression of uracil DNA glycosylase (UDG) does not affect cellular sensitivity to thymidylate synthase (TS) inhibition. **European journal of cancer: official journal for European Organization for Research and Treatment of Cancer**, v. 39, n. 3, p.378–387, Fev. 2003.

WONG SKC, et al. Direct tumor invasion in colon cancer: correlation with tumor spread and survival. **Diseases of the Colon and Rectum,** v. 51, p. 1331-8, Set. 2008.

WYATT MD, WILSON 3RD DM. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. **Cellular and molecular life sciences: CMLS,** v. 66, n. 5, p. 788–99, Mar. 2009.

XU-WELLIVER M, PEGG AE. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine- DNA-alkyltransferase. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 5, p. 823-30, Mai. 2002.

XYNOS E, et al. Clinical practice guidelines for the surgical management of colon cancer: a consensus statement of the Hellenic and Cypriot Colorectal Cancer Study Group by the HeSMO. **Annals of Gastroenterology: Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology,** v. 29, n. 1, p. 3-17, 2016.

YANG CG, et al. Damage detection and base-flipping in direct DNA alkylation repair. **Chembiochem: a European journal of chemical biology**, v. 10, n. 3, p. 417-23, Fev. 2009.

YANG Y, et al. Prognostic Value of Perineural Invasion in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. **Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract**, 2015; v.19, n. 6, p. 1113-22, Jun. 2015.

YIN M, et al. ERCC1 and ERCC2 polymorphisms predict clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastric and colorectal cancer: a systemic review and meta-analysis. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research,** v. 17, p. 1632-40, Mar. 2011.

YONEKURA S, et al. Generation, biological con- sequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA. **Journal of radiation research**, v. 50, n. 1, p. 19–26, Jan. 2009.

YUAN L, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. *International* **Journal of Clinical and Experimental Medicine,** v.8, n.11, p. 20988-21000, 2015

ZAANAN A, et al. Defective mismatch repair status as a prognostic biomarker of disease-free survival in stage III colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, 2011, v. 17, n. 23, p. 7470-8, Dez. 2011.

ZAANAN A, et al. Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. **Annals of Oncology**, v. 21, n. 4, p. 772-80, Abr. 2010.

ZAANAN A. Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications. **Cellular oncology (Dordrecht)**, v. 34, n. 3, p. 155-76, Jun. 2011.

ZHARKOV DO Base excision DNA repair. **Cellular and molecular life sciences : CMLS,** v. 65, n. 10, p. 1544–65, Mai. 2008.

ZHENG CX, et al. The prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 7, n. 3, p. 431-4, Jun. 2001.

ZHOU BB, ELLEDGE SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 433–9, 2000.

ZHOU, ST et al. The metabolic switch and its regulation in cancer cells. **Science China. Life Sciences***,* v.53, n. 8, p. 942-58, Ago. 2010.

ZHUANG L, et al. Meta-analysis of chemotherapy with irinotecan or oxaliplatin-involved regimen for untreated metastatic advanced colorectal cancer. **Oncology Research**, v. 18, n. 9, p. 437-44, 2010.

ZLOBEC I, et al. Multimarker phenotype predicts adverse survival in patients with lymph node-negative colorectal cancer. **Cancer**, v. 112, n. 3, p. 495–502, Fev. 200

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação do Perfil de Reparo do DNA em Pacientes Portadores de Câncer Colorretal

Pesquisador: JENIFER SAFFI

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

Versão: 6

CAAE: 09761613.4.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO
Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 511.724

Data da Relatoria: 16/01/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto previamente aprovado por este CEP. Pesquisador encaminha emenda de modo a inserir documentos para a análise da instituição co-participe ISCMPA.

Objetivo da Pesquisa:

Projeto previamente aprovado por este CEP. Pesquisador encaminha emenda de modo a inserir documentos para a análise da instituição co-participe ISCMPA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Projeto previamente aprovado por este CEP. Pesquisador encaminha emenda de modo a inserir documentos para a análise da instituição co-participe ISCMPA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto previamente aprovado por este CEP. Pesquisador encaminha emenda de modo a inserir documentos para a análise da instituição co-participe ISCMPA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245
Bairro: **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (513)303 -8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto previamente aprovado por este CEP. Pesquisador encaminha emenda de modo a inserir documentos para a análise da instituição co-participe ISCMPA.

PORTO ALEGRE, 17 de Janeiro de 2014

Assinador por:
José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245
Bairro: **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (513)303 -8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

ANEXO II – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil de reparo do DNA em pacientes portadores de Câncer Colorretal

Pesquisador: JENIFER SAFFI

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

Versão: 2

CAAE: 34145614.9.0000.5335

Instituição Proponente: ISCMPA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 833.555

Data da Relatoria: 16/09/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional e transversal. O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor em frequência e o segundo em mortalidade nos países desenvolvidos. O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor em frequência e o segundo em mortalidade nos países desenvolvidos. No Brasil, o CCR está entre as seis neoplasias malignas mais encontradas e é a terceira em mortalidade. Dentre todos os casos de CCR, cerca de 85% são esporádicos. A avaliação prognóstica majoritariamente baseia-se em parâmetros clínico-patológicos e morfológicos, uma vez que o valor de marcadores moleculares para o prognóstico ainda precisa de melhor esclarecimento.Mutações em genes de reparo de malpareamento de DNA (MMR) estão associadas principalmente com CCR hereditário, em especial na Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipomatoso (HNPCC), porém, uma vez também presentes em alguns casos de CCR esporádico denota o envolvimento do sistema de reparo do DNA no desenvolvimento desta patologia. O sistema de reparo do DNA garantiria a estabilidade genômica, permitindo à célula a manutenção da sua informação genética. Alterações nestas vias estão classicamente envolvidas com a progressão do câncer. No entanto, como o sistema de reparo do DNA se comporta neste caso especial de tumorigênese, e se apresentam papel prognóstico, ainda não está esclarecido.

Endereço: R. Profº Annes Dias,285 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



PACIENTES E MÉTODOS: Amostras de carcinomas colorretais ressecadas após cirurgia de remoção do tumor de pacientes provenientes do
Serviço de Cirurgia Oncológica do Hospital Santa Rita da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre serão submetidas à extração de RNA,conversão de RNA a cDNA e quantificação do expressão gênica dos genes envolvidos com as vias de Reparo do DNA através de RT-PCR Array.
Genes com padrões de expressão alterados de modo superior ou inferior serão avaliados qualitativamente através da sua expressão proteica, medida por imunohistoquímica. A análise estatística será realizada no programa SPSS 16.0 de acordo com a variável em questão.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o perfil de expressão dos genes e das proteínas envolvidas nos processos de resposta a danos no DNA em amostras tumorais de adenocarcinomas colorretais primários ressecados durante o procedimento cirúrgico desta patologia.

Objetivo Secundário:

-Analisar padrões de expressão de genes envolvidos nas diferentes vias de reparo deDNA, entre elas BER,NER e RH, NHEJ;

-Avaliar qualitativamente os padrões de expressão de proteínas envolvidas nos processos de resposta a danos no DNA;

-Correlacionar os dados moleculares obtidos com os dados clínicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:Não há riscos envolvidos no desenvolvimento desta pesquisa que possam ser adicionados àqueles já previstos pela conduta cirúrgica prevista.

Benefícios:

Os benefícios desta pesquisa serão obtidos em longo prazo. A partir deste trabalho, serão propostos possíveis marcadores moleculares para prognóstico e sensibilidade ao tratamento quimioterápico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco.

Justificativa:

A alíquota removida da amostra tumoral será utilizada em parte. O restante será armazenado sob

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

Continuação do Parecer: 833.555

PORTO ALEGRE, 16 de Outubro de 2014

Assinado por:
Claudio Teloken
(Coordenador)

Endereço: R. Profº Annes Dias,285 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

ANEXO III – 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 colorretal é uma doença caracterizada pela presença de tumores malignos em qualquer parte do intestino ou do reto. Cada vez mais pessoas, sejam homens ou mulheres, apresentam esta doença e precisam de tratamentos adequados para tratá-la. Os motivos pelos quais ela 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.

Esta pesquisa consiste em fazer uma análise molecular de genes que fazem o reparo do DNA na busca por mutações que possam estar envolvidas com o processo de geração e evolução do câncer colorretal. Compreender estes mecanismos poderá ser uma forma de obter diagnósticos e tratamentos mais precisos e mais eficazes aos portadores desta doença. Portanto, ajudará a termos um melhor entendimento da doença.

Sendo assim, você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada ***"Avaliação do Perfil de Reparo do DNA em pacientes portadores de Câncer Colorretal"***, cujo objetivo é analisar a expressão de genes envolvidos com o reparo do DNA em tumores colorretais. Como muitas pessoas são acometidas por esta doença no nosso País, pesquisadores como nós que estudam as células defeituosas para melhor compreendê-las e buscar tratamentos cada vez melhores.

Para isto, será necessário ter acesso a uma pequena parte tumor que será removido durante a sua cirurgia e também a uma parte saudável da mucosa que reveste o seu intestino, mas que é retirada juntamente com o tumor. Quando o seu tumor for retirado pelo cirurgião, vamos remover uma pequena parte tanto do tumor como do intestino que foi retirado junto e para estudarmos as células. Nós 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).

Nenhum dano a você pode ser gerado por esta pesquisa, pois a necessidade da sua cirurgia (com a retirada do tumor) será indicada por seu médico e os resultados da nossa coleta não interferirão na conduta médica. A sua participação no estudo também não acarretará custos, já que todas as análises laboratoriais relacionadas à pesquisa são financiadas pelos pesquisadores e por órgãos do governo que apoiam este trabalho.

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 totalmente voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios, assim como não irá interferir no seu tratamento neste hospital.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos seus exames serão acessados por nós, mas sempre 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.

Eu, _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Minha participação é voluntária e não terei custos por fazer parte do estudo. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Os pesquisadores que entraram em contato comigo certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Em caso de dúvidas poderei chamar os pesquisadores Jenifer Saffi (51. 99977252) Antônio Kalil (51.99810098), Gustavo Laporte (51. 84013305) e Natalia Leguisamo Meirelles (51.81780053) ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – sob coordenação do Dr. Cláudio Telöken, telefone 3214.8571 – para questões sobre a pesquisa e sobre os direitos dos pacientes envolvidos ou sobre problemas decorrentes da pesquisa.

Ao assinar abaixo, você confirma que leu as afirmações contidas neste termo de consentimento, que foram explicados os procedimentos do estudo, que teve a oportunidade de fazer perguntas, que está satisfeito com as explicações fornecidas e que decidiu participar voluntariamente deste estudo. Uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido será entregue a você e outra cópia será arquivada pelo investigador principal.

Nome do sujeito de pesquisa: _____

Assinatura do sujeito de pesquisa:_____

Data:_____

Nome do representante legal:_____

Assinatura do representante legal: _____

Data:_____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do Pesquisador:_____

Data:_____