

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

Gustavo Andreazza Laporte

**Influência do reparo do DNA nos aspectos
clinicopatológicos e prognósticos do
câncer colorretal esporádico**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2019

Catálogo na Publicação

Andreazza Laporte, Gustavo

Influência do reparo do DNA nos aspectos clinicopatológicos e prognósticos do câncer colorretal esporádico / Gustavo Andreazza Laporte. -- 2019.

215 f. : 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

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

1. Câncer colorretal. 2. Resposta ao dano ao DNA. 3. Biomarcadores prognósticos. 4. Reparo do DNA. I. Título.

Gustavo Andreazza Laporte

Influência do reparo do DNA nos aspectos clinicopatológicos e prognósticos do câncer colorretal esporádico

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Nocchi Kalil

Coorientadora: Profa. Dra. Jenifer Saffi

Porto Alegre

2019

Dedicatória:

Dedico esta tese a todas as pessoas que são e serão vítimas “do imperador de todos os males”, o câncer.

Siddhartha Mukherjee

Agradecimentos:

Agradeço à minha família que forneceu a base para minha formação médica e acadêmica. À minha mãe, Elaine, e ao meu pai, Edgard, que sempre me guiaram pelo caminho do conhecimento e me incentivaram nos estudos, me dando conforto e base para minha vida. À minha irmã, Gisele, que foi acometida por um tumor e que hoje segue sua vida normalmente, sendo uma brava combatente frente a esta doença. *In memoriam*, ao meu vô Ary Andreazza, acometido pelo câncer e a sua fiel companheira, minha vó Catharina Villanova Andreazza que me incentivaram a seguir a academia durante a graduação e minha especialização.

À minha noiva, Cecília, pela compreensão e amor nesses mais de 10 anos juntos, me incentivando, dando tranquilidade e segurança em minha vida.

Ao Professor Antonio Nocchi Kalil que é minha referência pessoal, profissional e acadêmica desde a graduação em Medicina, como preceptor na especialidade de Cirurgia Oncológica e como orientador no Mestrado e nesse Doutorado.

À Professora Jenifer Saffi que orientou e ajudou no grande desafio que foi esta tese em uma área inovadora e desafiadora que é entender a genética do câncer.

À Natalia Motta Leguisamo Meirelles que foi minha grande norteadora desta tese, pela sua paciência e horas expendidas me ensinando sobre o tema, corrigindo e me aconselhando no caminho a trilhar.

À Helena de Castro e Gloria e o Gabriel e Silva Montenegro que foram fundamentais na parte experimental desta tese.

À toda equipe da Cirurgia Oncológica do Hospital Santa Rita da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, em especial a Bebety Albrecht, fiel anestesista que me acompanha desde minha formação, Luiz Antonio de Souza Serrano, pelo apoio prestado e Gunther Pereira Ayala, pela parceira no bloco cirúrgico e correções na lingua inglesa dessa tese.

Aos pacientes do estudo que colaboraram com seu material humano que engrandece a ciência humana.

Às instituições da Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre a que faço parte desde 1999, onde tenho uma história de quase 20 anos a qual sou muito grato e que me proporcionaram tantas conquistas.

Epígrafe:

“Disease is not an entity, but a fluctuating condition of the patient's body, a battle between the substance of disease and the natural self-healing tendency of the body.”

“A doença não é uma entidade, mas uma condição do corpo do paciente, uma batalha entre a doença e a tendência natural de cura do corpo.”

Hippocrates, 460 – 370 AC

Resumo:

Introdução: O câncer colorretal (CCR) é a terceira maior causa de mortes relacionadas à neoplasia no mundo. Seu manejo atual é dependente basicamente do sistema de estadiamento do TNM baseado em critérios histopatológicos. No entanto, muitos pacientes apresentam prognóstico de seu grupo de classificação, podendo haver outros fatores influenciadores como a modulação molecular como o reparo do DNA, sendo a via do reparo do mal pareamento (MMR) a mais estudada.

Objetivo: Avaliar a influência da modulação dos componentes das vias de reparo quebra dupla do DNA (*XRRC2* da HR – Recombinação Homóloga e *XRCC5* do NHEJ - união de extremidade não-homóloga), síntese translesão (*POLH*, *POLK* e *POLQ*) e ligação intercadeia (*DCLRE1A*) em relação a dados clinicopatológicos, sobrevida livre de doença e sobrevida geral de um grupo de pacientes intervistos cirurgicamente por câncer colorretal. Adicionalmente, revisar a literatura visando discutir o efeito da modulação de outras vias de reparo de DNA (reparo direto, excisão e reparo de quebra duplas) nos aspectos clinicopatológicos do câncer colorretal e seu potencial como biomarcadores prognósticos e preditivos.

Métodos: Revisão da literatura e análise de amostras de tumor e tecidos de mucosa colônica normal de 47 pacientes com CCR submetidos à cirurgia, quanto à expressão gênica de *XRCC2*, *XRCC5*, *POLH*, *POLK*, *POLQ* e *DCLRE1A* por qRT-PCR; expressão proteica dos componentes PolK, XRCC5/Ku80, p53, ki67, MLH1 e MSH2 avaliados por imunohistoquímica (IHQ) e metilação do promotor de ilhas CpG de *XRCC5*, *POLH*, *POLK*, *POLQ* e *DCLRE1A*.

Resultados: O capítulo I apresentou a revisão da literatura no artigo *Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer*. O capítulo II apresentou o artigo *The role of Double Strand Break Repair, Translesion Synthesis and Interstrand Crosslinks in Colorectal Cancer progression – clinicopathological data and survival* que demonstrou que os tecidos neoplásicos apresentaram aumento da expressão de *POLK* ($p < 0,001$) e *DCLRE1A* ($p < 0,001$) e baixa expressão de *POLH* ($p < 0,001$) e *POLQ* ($p < 0,001$) em comparação à mucosa normal pareada. A baixa expressão de *POLH* foi associada à histologia mucinosa e

tumores T1-T2 ($p = 0,038$); baixa expressão tumoral de *POLK* foi associada à metástases hematogênicas ($p = 0,042$). A metilação do promotor *POLK* foi associada aos estágios iniciais de CCR ($p = 0,011$) e metilação do promotor *POLH* a tumores de alto grau ($p = 0,023$). Pacientes com CCR com metilação do promotor *POLK* apresentaram maior sobrevida livre de doença (DFS) ($p = 0,005$) quando comparado a pacientes sem metilação do promotor.

Conclusão: O estadiamento do CCR ainda carece do uso de biomarcadores moleculares tanto para o prognóstico da doença quanto para a decisão terapêutica, o que leva à classificação molecular errônea da doença e ao tratamento incorreto. Nesse contexto, biomarcadores moleculares baseados em reparo de DNA podem ser uma ferramenta decisiva na abordagem diagnóstica e terapêutica do CCR. Atualmente, o status do mal pareamento MMR e o ERCC1 estão se tornando os biomarcadores preditivos e prognósticos mais relevantes dentro do reparo do DNA, podendo ser implementados na prática clínica para adequar os regimes de quimioterapia em pacientes com CCR. Adicionalmente, nosso estudo apresenta o *POLH* e o *POLK* como possíveis biomarcadores que podem ser agregados como fatores prognósticos e, no futuro, serem preditivos no tratamento adjuvante baseado no genótipo do indivíduo.

Palavras-chave:

Câncer colorretal, resposta ao dano ao DNA, biomarcadores prognósticos, reparo do DNA.

Abstract

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer-related deaths in the world. The current management is basically dependent on the TNM staging system based on histopathological criteria. However, many patients present a different prognosis of their classification group, and there may be other influencing factors such as molecular modulation such as DNA repair and the most studied is mismatch repair pathway (MMR).

Aim: Evaluate the influence of molecular modulation of double strand break (DSBR) - *XRCC2* and *XRCC5* - core components; DNA damage tolerance/translesion synthesis (DDT/TLS) - *POLH*, *POLK* and *POLQ* – and, finally, of interstrand crosslink repair (ICLR) - *DCLRE1A* – pathways in sporadic CRC in relation to the clinical pathological data, overall survival and disease free survival in patients submitted to surgical procedure. Also, review the literature to discuss the effect of the modulation of other DNA repair pathways (direct repair, excision and repair of double breaks) in the clinical aspects of colorectal cancer and its potential as prognostic and predictive biomarkers.

Methods: Literature review and analysis of tumour specimens and matched health mucosal tissues from 47 CRC patients who underwent surgery were assessed for gene expression of *XRCC2*, *XRCC5*, *POLH*, *POLK*, *POLQ* and *DCLRE1A* by qRT-PCR; protein expression of Pol k, *XRCC5/Ku80*, p53, ki67, MLH1 and MSH2 components were assessed by immunohistochemistry (IHC); CpG island promoter methylation of *XRCC5*, *POLH*, *POLK*, *POLQ* and *DCLRE1A* was performed.

Results: Chapter I presented a review of the literature in the article *Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer*. Chapter II presented the paper *The Role of Double Strand Break Repair, Translesion Synthesis and Interstrand Crosslinks in Colorectal Cancer progression - clinicopathological data and survival* which demonstrated that neoplastic tissues presented induction of *POLK* ($p < 0.001$) and *DCLRE1A* ($p < 0.001$) and low expression of *POLH* ($p < 0.001$) and *POLQ* ($p < 0.001$) in comparison to healthy paired mucosa. Low expression of *POLH* was associated to mucinous histology and T1-T2 tumors ($p = 0.038$); low tumour expression of *POLK* was associated to distant metastases ($p = 0.042$). *POLK* promoter methylation was associated to early stages CRC ($p = 0.011$) and *POLH* promoter methylation

to high grade tumors ($p=0.023$). CRC harbouring *POLK* promoter methylation presented better disease free survival (DFS) ($p=0.001$)

Conclusion: CRC staging still lacks the use of molecular biomarkers for both disease prognosis and therapeutic decision, which leads to disease misclassification and incorrect treatment. In this context, DNA repair-based molecular biomarkers may be a decisive tool in the diagnostic and therapeutic approach for colorectal cancer. Currently, the MMR pathway status and ERCC1 (NER) are turning into the most relevant predictive and prognostic biomarkers, which can be implemented in the clinical practice to tailor the chemotherapy regimens in CRC patients. In addition, our study presents POLH and POLK as possible biomarkers that may aggregate as prognostic factors and in the future be predictive of adjuvant treatment based on the individual's genotype.

Keywords:

Colorectal cancer, DNA damage response, prognostic biomarkers, DNA repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	INTRODUÇÃO	
Figura 1	The Hallmarks of Cancer (As marcas registradas do câncer)	20
Figura 2	Os dez tipos de câncer mais prevalentes no mundo	21
Figura 3	Descrição anatômica das partes do intestino grosso	22
Figura 4	Descrição anatômica das camadas da parede do intestino grosso	23
Figura 5	Gráfico de incidência por região - taxas padronizadas por idade por sexo para câncer de cólon em 2018	25
Figura 6	Gráfico de incidência por região - taxas padronizadas por idade por sexo para câncer de reto em 2018	25
Figura 7	Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasias de cólon e reto por 100 mil homens e mulheres, respectivamente, no Brasil	26
Figura 8	Taxa de mortalidade por CCR, ajustada por idade, de acordo com sexo, Brasil, 1990-2014	27
Figura 9	Modelo sequencial molecular e morfológico das etapas da carcinogênese colorretal	28
Figura 10	Modelo prognóstico do CCR com seus fatores e sua interrelação, demonstrando a heterogeneidade desta patologia	38
Figura 11	Taxonomia do CCR de acordo com o consenso de subtipos moleculares (CMS)	58
Figura 12	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	63
Figura 13	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.	66
Figura 14	Representação esquemática das proteínas envolvidas em cada fase reparo direto mediado pela MGMT	67
Figura 15	Representação esquemática das proteínas envolvidas em cada fase do BER, desde o seu reconhecimento até a religação do fragmento recém-sintetizado à fita original	70
Figura 16	Representação esquemática da via de reparo por excisão de nucleotídeos	72
Figura 17	Representação esquemática da via de reparo de quebra dupla, sendo representada as duas vias, a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) e a recombinação homóloga (HR)	73
Figura 18	Via de reparo de quebra dupla detalhada	76
Figura 19	Esquema ilustrativo de Síntese Translesão com a DNA Polimerase η	78
	CAPÍTULO I	
Figure 1	The main DNA repair genes involved in colorectal cancer as prognostic or predictive biomarkers	103

	CAPÍTULO II	
Figure 1	Molecular changes in DSB, ICLR and DDT/TLS compared colonic normal tissue and CRC tumors	119
Figure 2	Overall and disease free-survival for <i>POLQ</i> gene expression, <i>POLK</i> methylation and IHC for <i>XRCC5</i> . The data were evaluated with Kaplan-Meier test	128
Supplementary Figure S1	Associations of overall survival of DNA repair gene expression of <i>POLH</i> , <i>POLK</i> , <i>POLQ</i> , <i>XRCC2</i> , <i>XRCC5</i> and <i>DCRLE1A</i> utilizing Kaplan-Meier curve	129
Supplementary Figure S2	Associations of disease free survival of DNA repair gene expression of <i>POLH</i> , <i>POLK</i> , <i>POLQ</i> , <i>XRCC2</i> , <i>XRCC5</i> and <i>DCRLE1A</i> utilizing Kaplan-Meier curve	130
Supplementary Figure S3	Associations of overall survival of DNA repair gene methylation of <i>POLH</i> , <i>POLK</i> , <i>XRCC5</i> and <i>DCRLE1A</i> utilizing Kaplan-Meier curve	131
Supplementary Figure S4	Associations of disease free survival of DNA repair gene methylation of <i>POLH</i> , <i>POLK</i> , <i>XRCC5</i> and <i>DCRLE1A</i> utilizing Kaplan-Meier curve	132
Supplementary Figure S5	Associations of overall survival of IHC scores of Pol k, <i>XRCC5</i> /Ku80, MLH1, MSH2, p53 and Ki67 utilizing Kaplan-Meier curve	133
Supplementary Figure S6	Associations of disease free survival of IHC scores of Pol k, <i>XRCC5</i> /Ku80, MLH1, MSH2, p53 and Ki67 utilizing Kaplan-Meier curve	134
	DISCUSSÃO	
Figura 1	Diagrama que demonstra o resumo dos dados clinicopatológicos e sobrevida dos pacientes com CCR em relação aos genes pesquisados	152
Figura 2	Sobrevida dos pacientes do <i>GDC TCGA Colon Cancer Data</i> , onde verificou-se semelhança nos resultados em relação a sobrevida geral, exceto o <i>DCLRE1A</i>	158

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1	Tabela de prevalência, eventos moleculares e implicância clínica nas três vias moleculares no CCR	30
Tabela 2	Definições para o estadiamento TNM	34
Tabela 3	Estadiamento anatômico e grupos prognósticos	36
Tabela 4	Dados histopatológicos como fatores prognósticos	42
Tabela 5	Drogas quimioterápicas utilizadas no tratamento do CCR	45
Tabela 6	Combinações de drogas quimioterápicas no CCR	46
Tabela 7	Descrição das Polimerases, discriminando a família, nome de gene, nome da polimerase (Pol), função molecular e sua implicância no câncer em relação a sua expressão	79

CAPÍTULO I

Table 1	Studies reporting the prognostic value of MGMT promoter methylation or MGMT loss/low protein expression in CRC patients	94
Table 2	Studies evaluating the predictive value of MGMT promoter methylation or MGMT loss/low protein expression in metastatic CRC	95
Table 3	BER components expression in CRC neoplasms as prognostic and predictive biomarkers: recent discoveries	96
Table 4	Prognostic value of ERCC1 low and ERCC2 high gene/protein expression in colorectal câncer. All patients were treated with oxaplatin based therapy	98
Table 5	Studies evaluating the predictive value of low ERCC1 and high ERCC2 gene/protein expression in CRC patients	99
Table 6	Double Strand Break Repair components as prognostic biomarkers in CRC patients	100
Table 7	Double strand break repair components and its influence in CRC response to treatment	101
Table 8	Summarized role of the main DNA repair components expression with potential value as prognostic and/or predictive biomarkers in sporadic CRC	103

CAPÍTULO II

Table 1	Clinicopathological features of CRC patients	118
Table 2	Protein levels (Pol k, Ku80, MLH1, MSH2, Ki67 and p53), methylation (<i>POLH</i> , <i>POLK</i> , <i>XRCC5</i> and <i>DCLRE1A</i>) and BRAF mutation in neoplastic tissue	120
Supplementary Table S1	Association between gene expression of <i>POLK</i> and <i>XRCC5/Ku80</i> with methylation and IHC	121
Table 3	Correlations between DNA gene repair expression of <i>POLH</i> , <i>POLK</i> , <i>POLQ</i> , <i>XRCC</i> and <i>XRCC5</i> , methylation of <i>POLH</i> , <i>POLK</i> , <i>XRCC5</i> and <i>DCLRE1A</i> and IHC of <i>XRCC5</i> , Pol k, MLH1, MSH2, p53 and Ki67 scores with clinical parameters.	122
Supplementary Table S2	Association between DNA repair gene expression with BRAF mutation, IHC scores of MLH1, MSH2, p53 and Ki67	122
Supplementary Table S3	Association between DNA repair gene methylation with BRAF mutation, IHC scores of MLH1, MSH2, p53 and Ki67	123
Supplementary Table S4	Associations of protein expression by IHC scores with BRAF mutation, IHC scores of MLH1, MSH2, p53 and Ki67	123

Table 4	Correlations between DNA repair gene expression, methylation and IHC with BRAF mutation and IHC for MLH1, MSH2, p53 and Ki67	124
Supplementary Table S5	Associations of DNA repair gene expression with clinical parameters	125
Supplementary Table S6	Association between DNA repair gene methylation with clinical parameters	126
Supplementary Table S7	Association between IHC scores with clinical parameters	127
Table 5	Overall survival calculated with univariate and multivariate tests	136
Table 6	Disease free survival calculated with univariate and multivariate tests	137

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU: 5-Fluorouracil
ACS: *American Cancer Society*
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
APC: do inglês, *Adenomatous Polyposis Coli*
APE1: do inglês, *apurinic/aprimidinic (AP) endoDNAase*
ASCO: *American Society of Clinical Oncology*
BER: do inglês, *Base Excision Repair*
BRAF: do inglês, *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*
BRCA, do inglês, *Breast Cancer Gene*
CCR: câncer colorretal
CEA: do inglês, *carcinoembryonic antigen*
CIMP: do inglês, *CpG island methylator phenotype*
CIN: do inglês, *chromosomal instability*
CMS: do inglês, *Colorectal Molecular Subtypes*
CPDs: do inglês, *pyrimidine dimers*
CSA: do inglês, *Cockayne Syndrome Complementation Group A*
CSB: do inglês, *Cockayne Syndrome Complementation Group B*
CtIP: do inglês, *carboxy-terminal binding protein (CtBP) - interacting protein*
DCC: do inglês, *deleted in colorectal carcinoma*
DCLRE1A: do inglês, *DNA cross-link repair 1A protein*
DCLRE1B: do inglês, *DNA cross-link repair 1B protein*
DCLRE1C: do inglês, *DNA cross-link repair 1C protein*
DDR: do inglês, *DNA damage response*
DNA-PK, do inglês, *DNA-dependent protein kinase*
DNA: do inglês, *deoxyribonucleic acid*
DNTT: do inglês: *Deoxynucleotidyltransferase, Terminal*
Drp-lyase: do inglês, *5'-deoxyribose-5-phosphate lyase*
DSB: do inglês, *double strand breaks*
DSBR: do inglês, *double-strand breaks repair*
EGFR: do inglês, *epidermal growth factor receptor*
EMT: transição epitélio-mesenquimal
ERK: do inglês, *Extracellular Signal-Regulated Kinase*
ERO: espécies reativas de oxigênio
ESMO: *European Society for Medical Oncology*
Exo1: *Exonuclease 1*
FAP: do inglês, *Familial Adenomatous Polyposis*
FEN1: do inglês, *flap endonuclease 1*
FOLFIRI: leucovorin, 5-Fluorouracil, irinotecano
FOLFOX: leucovorin, 5-Fluorouracil, oxaplatina
FOLFOXIRI: leucovorin, 5-Fluoracil, oxaplatina, irinotecano
GDC TCGA: do ingles, *Genomic Data Commons The Câncer Genome Atlas*

GGR: do inglês, *Global Genome Repair*
HNPC: do inglês, *Hereditary Non-Poliposis Colon Câncer*
HNSCC: do inglês, *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*
HR: do inglês, *homologous recombination*
ICAT/IDS: *International Comprehensive Anatomical Terminology International Documentation System*
ICLs: do inglês, *interstrand crosslinks*
IDH: Índice de desenvolvimento humano
IHC: do inglês, *imunohistochemistry*
IHQ: imuno-histoquímica
JSCCR: *Japanese Society for Câncer of the Colon and Rectum*
KRAS: do inglês, *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
LIG4: DNA ligase IV
LP-BER: do inglês, *long-patch BER*
LV: Leucovorin
MAP: do inglês, *MUTYH-Associated Polyposis*
MAP: do inglês: *Mitogen Activated Protein*
MEK: do inglês, *abbreviation of MAP (mitogen-activated protein) kinase*
MGMT: do inglês, *O6-methylguanine-DNA methyltransferase*
MLH1: do inglês, *MutL homolog 1*
MLH3: do inglês, *MutL homolog 3*
MMEJ: do inglês, *microhomology-mediated end-joining*
MMR: do inglês, *mismatch repair*
MMS: metil-metanossulfonato
MSH2: do inglês, *MutS homolog 2*
MSH3: do inglês, *MutS homolog 3*
MSH6: do inglês, *MutS homolog 6*
MSI: do inglês, *microsatellite instability*
MUTYH: do inglês, *mutY DNA glycosylase*
MYC: do inglês, *myelocytomatosis*
NAD: do inglês, *nicotinamide-adenine dinucleotide*
NBS1: do inglês, *Nijmegen Breakage Syndrome 1*
NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*
NEIL1: do inglês, *Endonuclease VIII-like 1*
NER: do inglês, *nucleotide excision repair*
NHEJ: do inglês, *non-homologous end joining*
NRAS: do inglês, *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*
NSCLC: do inglês, *Non Small Cell Lung Cancer*
NTH1: do inglês, *urine homolog of endonuclease III*
OGG1: do inglês, *8-Oxoguanine DNA Glycosylase*
PAP: do inglês, *Familial Adenomatous Polyposis*
PARP-1: do inglês, *Poly (ADP-ribose) Polymerase 1*
PCNA: do inglês, *proliferating Cell Nuclear Antigen*

PI3K: do inglês, *Phosphatidylinositol-3-Kinase*
PIK3CA: do inglês, *phosphatidylinositol-5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*
PMS1: do inglês, *post meiotic segregation increased 1*
PMS2: do inglês: *post meiotic segregation increased 2*
POL: polimerase ou do inglês, *polymerase*
PRIMPOL: do inglês, *primase-polymerase*
PTEN: do inglês, *Protein Tyrosine Phosphatase*
RAD51, do inglês, *RecA-like NTPases*
RAS: do inglês, *Reticular Activating System*
REV1: do inglês, *Protein reversionless 1*
REV3: do inglês, *Protein reversionless 3*
RFC: do inglês, *replication factor C*
RNA: do inglês, *ribonucleic acid*
ROS: do inglês, *reactive oxygen species*
RPA: do inglês, *replication protein A*
RS-SCUD: do inglês, *severe combined immunodeficiency with sensitivity to ionizing radiation*
RT-qPCR: do inglês, *reverse transcription- polymerase chain reaction quantitative real time*
SCNA: alteração do número de cópias somáticas
SEER: *Surveillance, Epidemiology, and End Results*
SMAD2: do inglês, *SMAD family member 2*
SMAD4: do inglês, *SMAD family member 4*
SNM1A: do inglês, *sensitive to nitrogen mustard 1A*
SNM1B: do inglês, *sensitive to nitrogen mustard 1B*
SNM1C: do inglês, *sensitive to nitrogen mustard 1C*
SP-BER: do inglês, *short-patch BER*
TCGA: do inglês, *The Câncer Genome Atlas*
TCR: do inglês, *transcription coupled repair*
TdT: do inglês, *terminal deoxynucleotidyl transferase*
TERT: do inglês, *Telomerase Reverse Transcriptase*
TGF- β : do inglês, *transforming growth factor*
TGFB2: do inglês, *transforming growth factor beta receptor 2*
TLS: do inglês, *translesion synthesis*
TMZ: temozolomida
TNM: do inglês, *tumor, node, metastases*
TP53: do inglês, *tumor protein 53*
UICC: *International Union Against Cancer*
UNG: do inglês, *uracil-DNA-glicosilase*
UV: ultra-violeta
VEGF: do inglês, *vascular endothelial growth factor*
WHO: do inglês, *World Health Organization*

WNT: do inglês, *Wingless/Integrated*
XELIRI: capecitabina, oxaplatina, irinotecano
XELOX: oxaplatina e capecitabina
XLF/XRCC4: do inglês, *X-Ray repair cross complementing protein 4*
XPA: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Group A*
XPG: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Group G*
XPB/ERCC3: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group B*
XPC/ERCC1: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C*
XPD/ERCC2: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group D*
XPV: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum*
XRCC1: do inglês, *X-ray repair cross-complementing protein 1*
XRCC2: do inglês, *X-Ray repair cross complementing protein 2*
XRCC5: do inglês, *X-Ray repair cross complementing protein 5*
 γ -H2AX: do inglês, *H2A histone family member X*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1.	Conceitos gerais em câncer	20
1.2.	Câncer colorretal	22
1.2.1.	Epidemiologia	24
1.2.2.	Etiologia clínica	28
1.2.3.	Etiologia molecular	30
1.2.4.	Diagnóstico e tratamento	33
1.2.5.	Fatores prognósticos e preditivos	37
1.2.5.1.	Fatores inerentes ao paciente	39
1.2.5.2	Fatores do tumor no momento do diagnóstico	41
1.2.5.3	Fatores inerentes ao tratamento	43
1.2.5.3.1	Tratamento cirúrgico	43
1.2.5.3.2	Radioterapia	44
1.2.5.3.3	Quimioterapia	45
1.2.5.4.	Fatores imunes	50
1.3.	Biomarcadores	51
1.3.1.	Antígeno carcinoembriônico (CEA)	53
1.3.2.	KRAS e NRAS	54
1.3.3.	BRAF	56
1.3.4.	Instabilidade microssatélite (MSI)	57
1.3.5.	Subtipos moleculares de consenso do CCR	58
1.3.6.	Importância do estadiamento e marcadores tumorais no CCR	60
1.4.	Sistema de reparo do DNA	62
1.4.1.	Reparo de malpareamento	65
1.4.2.	Reparo direto	67
1.4.3.	Reparo por excisão de bases	68
1.4.4.	Reparo por excisão de nucleotídeos	71
1.4.5.	Reparo de quebras duplas	73
1.4.6.	Síntese translesão	77
1.4.6.1.	Polimerases translesão e o câncer	81
1.4.7.	Reparo de crosslinks	83
1.4.8.	Importância do reparo do DNA no CCR (Hipótese do trabalho)	86
2	OBJETIVOS	88
2.1.	Objetivo geral	88
2.2.	Objetivos específicos	88
3.1.	CAPÍTULO I - ARTIGO: <i>Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer</i>	90
3.2.	CAPÍTULO II – ARTIGO: <i>The role of Double Strand Break Repair, Translesion Synthesis and Interstrand Crosslinks in Colorectal Cancer progression – clinicopathological data and survival.</i>	109

4.	DISCUSSÃO	147
5.	CONCLUSÃO	160
6.	PERSPECTIVAS	162
7.	REFERÊNCIAS	163
8.	ANEXOS	194
8.1.	Anexo I: Normas da revista: BMC Cancer	194
8.2.	Anexo II: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA para o projeto inicial	199
8.3.	Anexo III: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA para o projeto inicial.	202
8.4.	Anexo IV: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA	204
8.5.	Anexo V: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFSCPA	208
8.6.	Anexo VI: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	213

1. INTRODUÇÃO:

1.1. Conceitos gerais em câncer

O câncer é um termo genérico de um grande grupo de doenças malignas (tumores e neoplasias) que podem atingir qualquer parte de um organismo vivo (WHO, 2017). A célula tumoral possui marcas registradas como sinalização sustentada para proliferação celular, insensibilidade aos supressores de crescimento, inibição da apoptose (resistência a morte celular), angiogênese sustentada, potencial replicativo ilimitado, capacidade de invasão tecidual e metastatização. Também há a alteração dos mecanismos que evitam a destruição imune, alteração dos fatores inflamatórios que promovem o crescimento tumoral, alterações da biologia molecular do DNA (sigla do inglês: *deoxyribonucleic acid*) como instabilidade genômica e mutações, assim com uma desregulação do metabolismo energético (HANAHAN & WEINBERG, 2000, 2011) (Figura 1).



Figura 1. *The Hallmarks of Cancer* (As marcas registradas do câncer). Esta figura ilustra as dez características do câncer originalmente propostas por Hanahan 2000 e republicado em 2011 com a evolução dos estudos da década de 2000-2010. A carcinogênese é um somatório de fatores que envolvem o mecanismo intracelular desde o DNA até a membrana celular, assim como a interação da célula tumoral com o microambiente em que se encontra (Adaptado de Hanahan and Weinberg 2000, 2011).

Cada vez mais, em razão do aumento da expectativa de vida e da melhora dos métodos diagnósticos, o aumento dos casos de câncer vem sendo considerado um dos grandes problemas de saúde pública mundial. No ano de 2012, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), foram registrados cerca de 14 milhões de novos casos. Em 2018, foi estimado 18,1 milhões de novos casos de câncer no mundo e 9,6 milhões de mortes relacionadas a esta doença (BRAY et al., 2018). Em um cenário nada otimista, estima-se ainda, que este número deva crescer cerca de 70% nas próximas duas décadas (WHO, 2017).

No mundo, o câncer de pulmão é o mais frequente, seguido pelos tumores de mama e intestino grosso (Figura 2). Sendo a Ásia a região que registra a maior incidência de novos casos, assim como mortalidade (BRAY et al., 2018). No Brasil, a estimativa para 2018, é que sejam diagnosticados cerca de 600 mil casos, sendo o câncer de próstata o mais prevalente no homem, e o câncer de mama nas mulheres, seguido pelo câncer colorretal (CCR) para ambos os sexos (INCA, 2017).

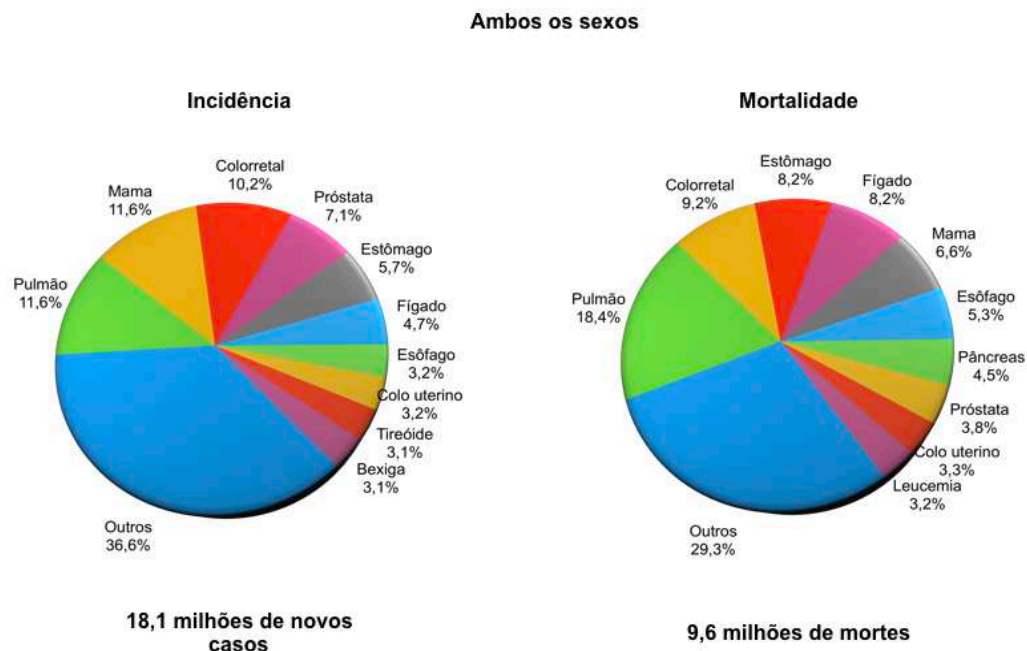


Figura 2. Os dez tipos de câncer mais prevalentes no mundo (Adaptado de Bray et al, 2018).

1.2. Câncer Colorretal

O cólon ou intestino grosso possui aproximadamente 1,5 metros e tem um diâmetro médio de 6,3 cm. Ele se estende desde o íleo (porção terminal do intestino delgado) até o ânus. O cólon é dividido anatomicamente na parte ascendente, sendo o ceco a primeira porção onde localiza-se a válvula ileocecal que mesmo não sendo um esfíncter natural, tem como função evitar que haja um refluxo de material fecal para o intestino delgado. Nesta parte também se localiza o apêndice cecal, um órgão considerado um vestígio embrionário envolvido em funções imunes. A porção seguinte é o cólon transverso, seguido pelo cólon descendente, sigmóide e pelo reto com cerca de 20 cm que termina no ânus. Clinicamente, a porção terminal do cólon é referida como reto (SANDERS & SCANLON, 2015) (Figura 3).

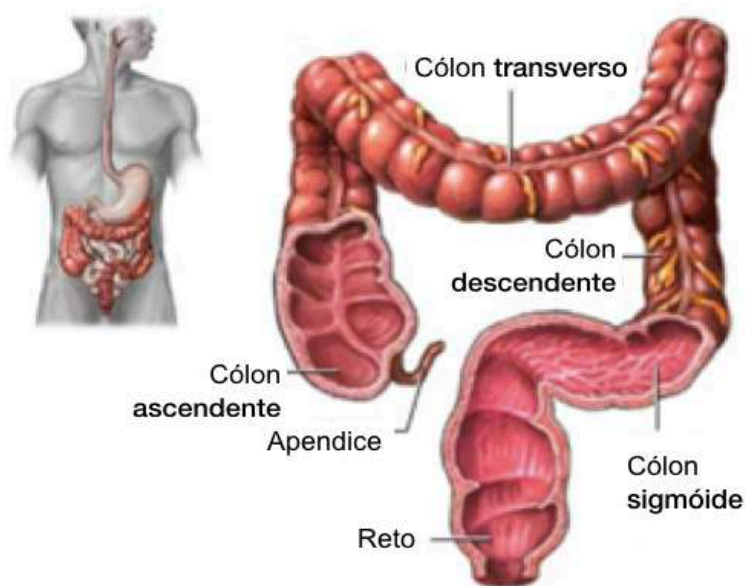


Figura 3. Descrição anatômica das partes do intestino grosso (Adaptado de: <http://cnaturalescritorey.files.wordpress.com/>).

A função do cólon e do reto é a reabsorção de água, minerais e nutrientes, assim como armazenamento e formação das fezes (SANDERS & SCANLON, 2015). Este órgão é formado por 5 camadas: a serosa; sub-serosa; a camada muscular (longitudinal - *taenia* - e circular (muscular da mucosa); submucosa (onde localizam-se vasos sanguíneos e linfáticos); e uma camada mais interna, a mucosa colônica, integrada por invaginações

tubulares denominadas criptas de *Lieberkuhn*, onde ocorre o papel fisiológico do órgão e a regeneração celular (KACHLIK; BACA & STINGL, 2010; MOORE, 2014) (Figura 4).

O cólon, devido à sua função, possui um alto índice de replicação celular, estando exposto a agentes físicos, químicos e biológicos, o que em muito aumenta a chance de alterações genéticas e moleculares envolvidas em processos neoplásicos (ARVELO; SOJO & COTTE, 2015). Assim, por conceito, o CCR compreende qualquer tumor que acomete o intestino grosso até a linha pectínea na junção do reto com o canal anal (INCA, 2017).

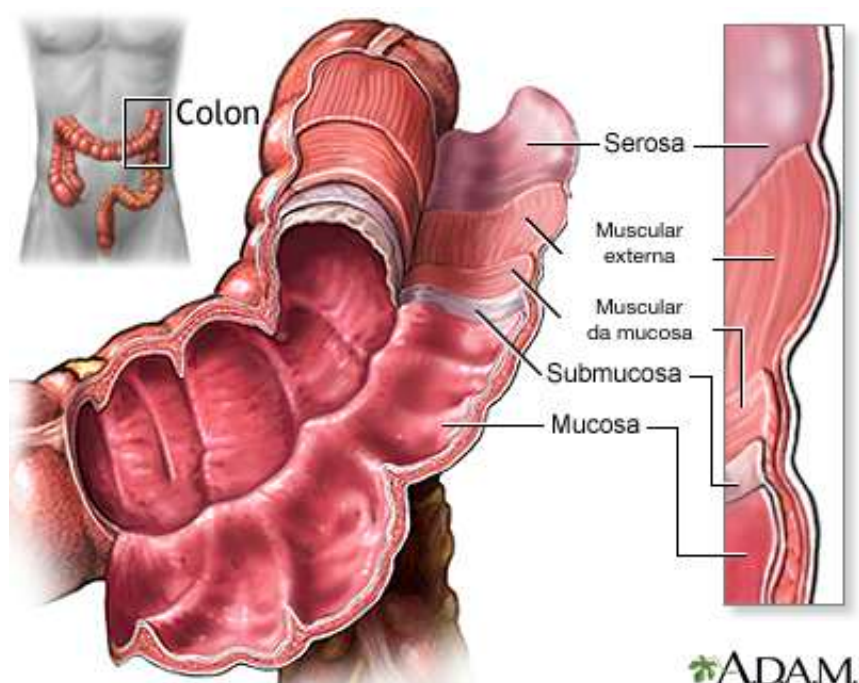


Figura 4. Descrição anatômica das camadas da parede do intestino grosso (Adaptado de: <http://cnaturalescritorey.files.wordpress.com/>).

1.2.1. Epidemiologia:

O CCR é o terceiro câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres. No ano de 2018, no mundo, estima-se que tenham havido 1.006.019 casos novos em homens (10,9% de todos os casos de câncer de incidentes em homens) e 794.958 novos casos em mulheres (9,5% de todos os casos de câncer de incidentes em mulheres). Quase 55% desses casos ocorreram em países mais desenvolvidos devido à melhores condições de acesso a saúde. A mortalidade é inferior à incidência, com 881.000 mortes por CCR em 2018 (9% de todas as mortes por câncer esse ano). As taxas de incidência do CCR são cerca de três vezes maiores nos países desenvolvidos que em países em desenvolvimento, não havendo variância nas taxas de mortalidade. As maiores taxas de incidência do CCR são encontradas em partes da Europa (Hungria, Eslovênia, Eslováquia, Holanda e Noruega), Austrália, Nova Zelândia, América do Norte e Leste da Ásia (Japão e República da Coreia, Uruguai e Cingapura (em mulheres). As taxas de incidência de câncer retal têm uma distribuição regional similar, embora as taxas mais altas sejam vistas na República da Coreia entre os homens e na Macedônia entre as mulheres. As taxas de incidência do CCR tendem a ser baixas na maioria das regiões da África e no sul da Ásia (BRAY et al., 2018).

As taxas de incidência de CCR variam amplamente, sendo que esta doença pode ser considerada um marcador de desenvolvimento socioeconômico e, em países em desenvolvimento importante, as taxas de incidência tendem a aumentar uniformemente com o aumento do IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) (BRAY et al., 2018; FIDLER; SOERJOMATARAM & BRAY, 2016). Avaliando as tendências de incidência e mortalidade, Arnold et al, identificaram três padrões temporais globais distintos ligados ao desenvolvimento do CCR: 1) aumento tanto na incidência quanto na mortalidade na década mais recente (incluindo os países bálticos, Rússia, China e Brasil); 2) aumento da incidência, mas diminuição da mortalidade (Canadá, Reino Unido, Dinamarca e Cingapura); e 3) diminuição da incidência e diminuição da mortalidade (Estados Unidos, Japão e França). Isso pode ser explicado pela influência dos padrões alimentares, obesidade e estilo de vida. A diminuição da mortalidade observadas em países mais desenvolvidos refletem melhorias na sobrevida através da adoção de melhores práticas no tratamento e manejo do câncer em países desenvolvidos (ARNOLD et al., 2017) (Figura 5 e 6).

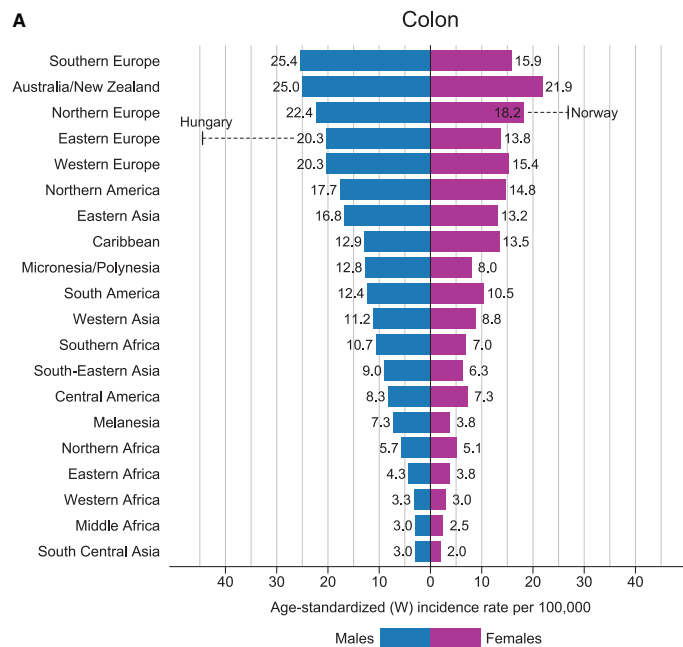


Figura 5: Gráfico de incidência por região - taxas padronizadas por idade por sexo para câncer de cólon em 2018. As taxas de câncer de cólon são mostradas em ordem decrescente do mundo (W) taxa padronizada por idade entre os homens, e as taxas nacionais mais altas entre homens e mulheres são sobrepostas (Fonte: Bray et al, 2018).

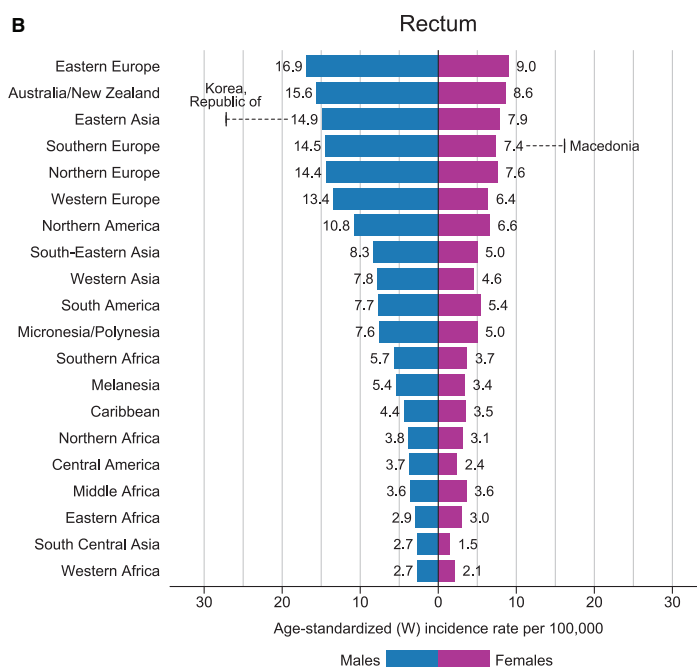


Figura 6: Gráfico de incidência por região - taxas padronizadas por idade por sexo para câncer de reto em 2018. As taxas de câncer de reto são mostradas em ordem decrescente do mundo (W) taxa padronizada por idade entre os homens, e as taxas nacionais mais altas entre homens e mulheres são sobrepostas (Fonte: Bray et al, 2018).

No Brasil, estimou-se para 2018, 36.360 casos. Estes valores correspondem a um risco estimado de 16,83 casos novos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres, sendo a mortalidade estimada de 15.415 casos. Comparando as regiões do Brasil, as regiões Sul e Sudeste são que as que possuem a maior incidência para ambos os sexos (INCA, 2017) (Figura 7). Foi observado, em termos de incidência bruta entre homens e mulheres, que Porto Alegre ocupa a terceira e quarta posições, respectivamente (INCA, 2017).

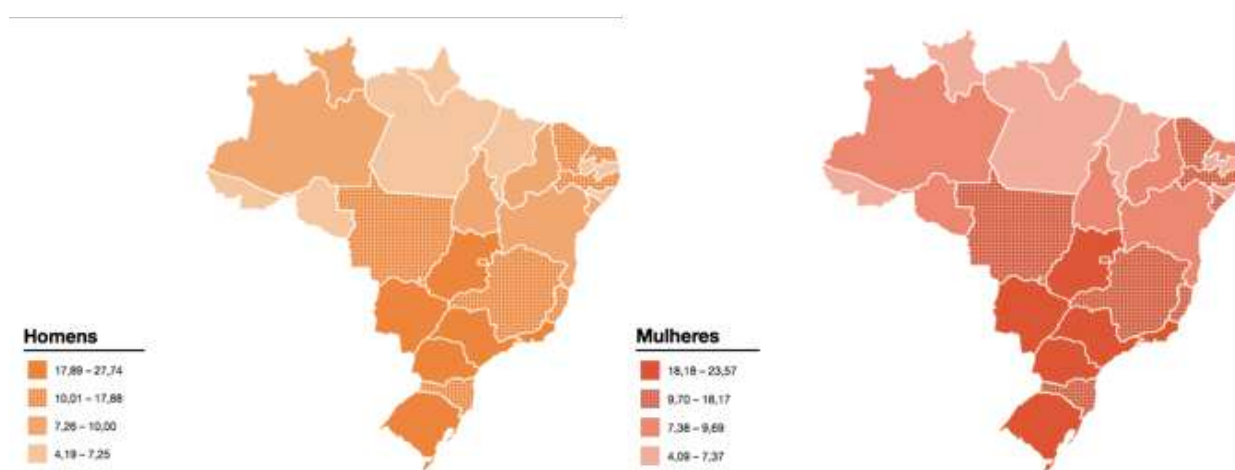


Figura 7. Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasias de cólon e reto por 100 mil homens e mulheres, respectivamente, estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade da Federação (Fonte: Estimativa do Câncer no Brasil, INCA, 2018).

Adicionalmente, foi observado um aumento das taxas de mortalidade entre 1990 e 2014 (Figura 8), sendo maior no sexo masculino e na região Sul, o que é atribuído ao maior nível de desenvolvimento e a presença de redes de atenção à saúde mais estruturadas, refletindo o melhor rastreamento e diagnóstico (AMORIM & MERCHÁN-HAMANN, 2013; BARROS et al., 2017; VINEIS & WILD, 2014). Contudo, o CCR em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste e o terceiro nas regiões Sul e Centro-Oeste. Na região Norte e Nordeste ocupa a quarta posição. Para as mulheres, é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste e Sul e o terceiro nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte (INCA, 2017).

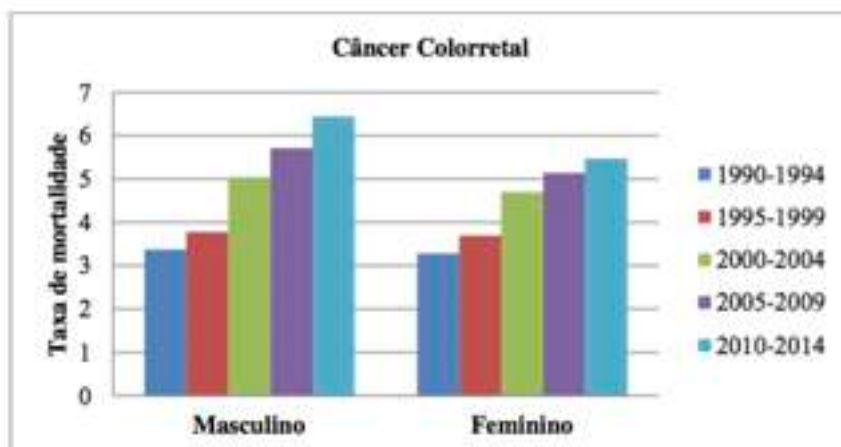


Figura 8. Taxa de Mortalidade por CCR, ajustada por idade, de acordo com sexo, Brasil, 1990-2014 (Adaptado de Barros et al, 2017).

Esta heterogeneidade regional pode ser explicada pelos diferentes hábitos culturais, socioeconômicos e alimentares presentes no território brasileiro (OLIVEIRA et al., 2018). Nas regiões Sul e Sudeste, os hábitos de vida estão associados a um maior risco de desenvolvimento de CCR, como o maior consumo de alimentos industrializado, de carne vermelha com gordura e consumo de álcool, aliado ao tabagismo e a baixa ingestão de verduras e frutas (BARROS et al., 2017).

1.2.2 . Etiologia clínica

A etiologia do CCR pode ser classificada em esporádica, hereditária e familiar. A patogênese molecular do CCR esporádico, responsável por cerca de 85% dos casos, é heterogênea e pode afetar diversos genes, seguindo uma sucessão mutagênica na maior parte das vezes, traduzida em uma sequência morfológica, iniciando pela formação do adenoma e terminando no adenocarcinoma (BOLAND & GOEL, 2010; FEARON & VOGELSTEIN, 1990; VOGELSTEIN et al., 1988). Por este modelo, a primeira mutação ocorre no gene *APC* (do inglês: *Adenomatous Polyposis Coli*), um supressor de gene tumoral, levando a formação de pólipos, também chamados de adenomas não malignos. Ao longo de um período de cerca de 10 anos, cerca de 15% desses pólipos, os quais acumularam mais mutações, incluindo no oncogene *KRAS* (do inglês: *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), no supressor tumoral *TP53* (do inglês, *tumor protein 53*), nos genes que codificam elementos da via de sinalização da via do TGF- β (do inglês, *transforming growth factor*), como *TGFBR2* (do inglês, *transforming growth factor beta receptor 2*), *SMAD4* (do inglês, *SMAD family member 4*) e finalmente *DCC* (do inglês, *deleted in colorectal carcinoma*), irão se transformar em um adenocarcinoma (BENSON & HAMILTON, 2011; FEARON, 2011; SAMOWITZ et al., 2000; VOGELSTEIN et al., 1988) (Figura 9).

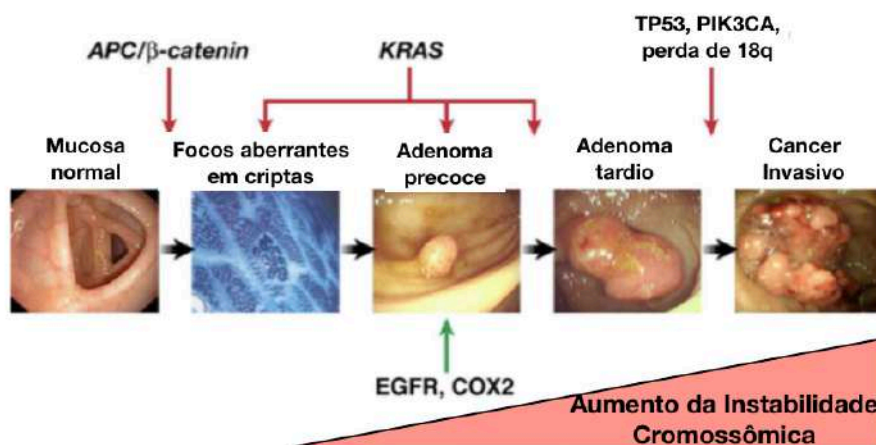


Figura 9. Modelo sequencial molecular e morfológico das etapas da carcinogênese colorretal. O passo inicial na carcinogênese colorretal é a formação de focos aberrantes tumorais em criptas. A ativação da via de sinalização *Wnt* (do inglês, *Wingless/Integrated*) pode ocorrer nesta fase como resultado de mutações no gene *APC*. A progressão para adenomas maiores e carcinomas precoces requer mutações ativadoras do proto-oncogene *KRAS*, mutações em *TP53* e perda de heterozigossidade no cromossomo 18q. A ativação mutacional de *PIK3CA* (do inglês, *phosphatidylinositol-5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) ocorre tardiamente na seqüência de adenoma-carcinoma em uma pequena proporção de cânceres colorretais. A instabilidade cromossômica é observada em adenomas benignos e aumenta em conjunto com a progressão do tumor (Adaptado de (PINO & CHUNG, 2010).

Os tumores hereditários, por sua vez, respondem por cerca de 5% de todos os casos de CCR e são originados um alelo mutado herdado, sendo necessária a mutação pontual no outro alelo para o desencadeamento do carcinoma. Estes tumores são classificados em dois grupos de acordo com a formação de pólipos: forma polipomatosa e não polipomatosa. A variante polipomatosa compreende, por exemplo a Polipomatose Adenomatosa Familiar (FAP, do inglês, *Familial Adenomatous Polyposis*), polipomatose associada ao MUTYH (MAP, do inglês: *MUTYH-Associated Polyposis*) e síndromes polipoides hamartomatosas, caracterizadas por múltiplos pólipos com potencial maligno no cólon (GUTTMACHER et al., 2003; HALF & BRESALIER, 2004). Por outro lado, a forma não polipomatosa, é o HNPCC (do inglês: *Hereditary Non-Poliposis Colon Câncer*) que está relacionado a mutações em um dos alelos dos genes de reparo de DNA. A grande etiologia do HNPCC é a Síndrome de Lynch, que é causada pela mutação herdada de um dos alelos que codificam proteínas da via do reparo de malpareamento (MMR, do inglês, *mismatch repair*). Esta síndrome pode ser responsável por até 5% dos CCR (UMAR et al., 2014). Importante salientar que 39%–80% dos pacientes são diagnosticados com Síndrome de Lynch na América Latina (VACCARO et al., 2018), devido a dificuldade da realização de testes genéticos em algumas regiões (ROSSI et al., 2017).

Finalmente, o tipo familiar, responsável por cerca de 25% dos casos de CCR, também é causado por mutações hereditárias, mas não se classificam como síndrome hereditária conhecida (STOFFEL & KASTRINOS, 2014).

1.2.3. Etiologia molecular

A instabilidade genômica é reconhecida como um importante parte do processo de carcinogênese do CCR, sendo dividida basicamente em três vias moleculares distintas que podem ocorrer como evento único ou associado (Tabela 1).

- a) Instabilidade cromossômica (CIN, do inglês: *chromosomal instability*)
- b) Instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês: *microsatellite instability*)
- c) Fenótipo metilador de ilhotas CpG (CIMP, do inglês: *CpG island methylator phenotype*)

Tabela 1. Tabela de prevalência, eventos moleculares e implicância clínica nas três vias moleculares no CCR (Adaptado de (GONZALEZ-PONS & CRUZ-CORREA, 2015)).

	Instabilidade cromossômica (CIN)	Instabilidade microssatélite (MSI)	Fenótipo metilador de ilhotas CpG (CIMP)
Prevalência	80-85%	15-20%	Até 20%
Eventos moleculares	Aneuploidia, inativação da APC/B-catenina, acumulação clonal de alterações genéticas nos oncogenes e genes supressores de tumor, perda ou ganho alélica	Mutações/epimutações no genes MMR resultando em inserções ou deleções em microssatélites	Hipermetilação do promotor da ilha CpG,
Significado clínico	Associado a pior prognóstico	Associado com tumores proximais, estádios precoces, mal diferenciados e com abundante infiltração linfocitária	Relacionado a tumores de localização proximal, alta prevalência em mulheres e mutações de BRAF

A instabilidade cromossômica, faz parte da via adenoma-carcinoma clássica, a qual é responsável por cerca de 70% dos casos de CCR (GRADY, 2004; RASKOV et al., 2014). Esta via é caracterizada por desequilíbrios no número de cromossomos, gerando tumores com aneuploidias e perda da heterozigose (AALTONEN et al., 1994). Os mecanismos envolvidos na CIN incluem segregação cromossômica, disfunção dos telômeros, alterações na resposta aos danos ao DNA e na manutenção da função celular. As mutações de APC causam translocação da β -catenina para o núcleo e levam a transcrição de genes implicados

na carcinogênese e invasão, enquanto as mutações no *KRAS* levam a uma constante ativação da *MAP* (do inglês: *Mitogen Activated Protein*), que, por sua vez, sinaliza para um aumento da proliferação celular. As mutações que levam à perda de função de p53, o principal ponto de controle do ciclo celular, ocasiona uma reentrada repetida e descontrolada no ciclo celular, impedindo o seu papel de supressor tumoral (PINO & CHUNG, 2010). Também, a perda de heteroziguidade em 18q, onde os genes *SMAD2* (do inglês, *SMAD family member 2*), *SMAD4* (do inglês, *SMAD family member 4*) e *DCC* estão localizados e a perda de alelos em 8p e 5q também estão correlacionadas com a presença de CIN. Clinicamente, tumores colorretais com CIN são associados à localização distal, são bem ou moderadamente diferenciados e apresentam um pior prognóstico (GUTTMACHER et al., 2003; LIPKIN et al., 2001; RASKOV et al., 2014).

A via da instabilidade microssatélite (MSI, do inglês, *Microsatellite Instability*) é causada por um fenótipo hipermutado devido a perda de um dos mecanismos de reparo a danos ao DNA. A MSI surge em razão da disfunção da via de reparo de malpareamento ou *mismatch repair* (MMR), sendo presente em 15-20% dos CCR esporádicos (SINICROPE & SARGENT, 2012). A habilidade em reparar malpareamentos ou repetições em sequência (dois a cinco pares de bases que se repetem em sequência ou microssatélites) é diminuída em tumores com esta característica; portanto, estas mutações tendem a acumular-se nestas regiões, tornando-as instável e heterogênea. A perda de expressão dos genes de reparo de malpareamentos pode ser ocasionada por eventos espontâneos (hipermetilação do promotor) ou mutações germinais, como as encontradas na Síndrome de Lynch (GUTTMACHER et al., 2003). Os genes mutados nos tumores com instabilidade microssatélites incluem *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* e *PMS2* (BOLAND & GOEL, 2010). Em geral os tumores hereditários com instabilidade microssatélite tem melhor prognóstico que os tumores esporádicos (UMAR et al., 2014). Deficiências nesta via estão associadas com tumores proximais, estádios precoces, mal diferenciados e com abundante infiltração linfocitária, mas com melhor resposta a quimioterapia (JOVER et al., 2004; NCCN - COLON CANCER, 2018; RASKOV et al., 2014; SAMOWITZ et al., 2001). Esta via será melhor detalhada ao longo desta tese, por sua importância clínica que está sendo estabelecida.

Finalmente, a terceira via inclui a modulação epigenética, a qual é responsável pelo fenótipo metilador de ilhotas CpG, uma via comum na carcinogênese do CCR, presente em até 20% dos casos. Há depleção global da metilação da citosina seguida de aquisição considerável de metilação aberrante dentro das "ilhas CpG" (regiões do DNA maior do que

200 pares de bases, contendo aproximadamente 50% de bases Citosina e Guanina e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG). Esta alteração ocasiona tumores com hipermetilação de proto-oncogenes, levando ao seu silenciamento e culminando em perda de expressão proteica. Os eventos epigenéticos podem colaborar com as mutações na progressão da mucosa do cólon normal até o CCR, com mais eventos de metilação do DNA que mutações genéticas pontuais (LAO & GRADY, 2011). Um exemplo de um efeito combinado genético e epigenético no processo de desenvolvimento do CCR é a presença de mutações em *BRAF* (do inglês, *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), ou instabilidade microssatélites em tumores com fenótipo metilador de ilhotas CpG (WEISENBERGER et al., 2006). Estes tumores caracterizam-se por acometer predominantemente o cólon proximal e serem mais prevalentes em mulheres (OGINO et al., 2006, 2007; RASKOV et al., 2014).

1.2.4. Diagnóstico e estadiamento

Conforme mencionado anteriormente, o cólon é composto por quatro partes (ascendente, transversa, descendente e sigmóide), sendo a dicotomização entre cólon e reto somente anatômica. Esta divisão não influencia a detecção e avaliação do grau da evolução do tumor (estadiamento), mas modifica a abordagem terapêutica (NCCN - COLON CANCER, 2018).

O diagnóstico do CCR pode ser realizado por três formas. Na primeira, o paciente terá algum sinal ou sintoma como mudança do hábito intestinal, desconforto abdominal, perda de peso, presença de sangue nas fezes na forma de hematoquezia, melena ou raias de sangue, alteração de exames laboratoriais, ou apresentar-se com um quadro de emergência cirúrgica como oclusão ou perfuração intestinal (SMITH; POPE & BOTHA, 2005). Na segunda forma de diagnóstico, os pacientes estão em rastreamento oncológico, seja por idade, algum fator de risco ambiental presente ou história familiar da doença. A terceira forma de diagnóstico é por achados em exames de rotina ou por outro objetivo, como uma ecografia ou tomografia computadorizada de abdome realizada em busca de outra queixa apresentada pelo paciente.

Para o diagnóstico é fundamental que seja realizada uma biópsia que comprove a doença. Esta pode ser realizada pela remoção completa do tumor por cirurgia (por indicação de um procedimento de emergência ou impossibilidade de exame endoscópico prévio) ou por colonoscopia que realiza a retirada de um fragmento tumoral, sendo também realizado o rastreio de todo o cólon pelo risco de tumores sincrônicos (INCA, 2018).

Após o diagnóstico, o paciente deve ser submetido ao estadiamento clínico e/ou patológico completo, exames de bioquímica completos, determinação do antígeno carcinoembrionário, reconhecido pela sigla CEA (do inglês, *carcinoembryonic antigen*) e tomografia computadorizada de tórax, pelve e abdome, com contraste via oral e venoso (BALTHAZAR EJ, MEGIBOW AJ, HUINICK D, 1998; NCCN - COLON CANCER, 2018). O estadiamento inclui, ainda, a avaliação do tumor primário, linfonodos e metástases a distância pelo sistema do TNM (do inglês, *Tumor, Node, Metastases*). O TNM irá definir o estadiamento do tumor que refletem resultados de sobrevida similar para os tumores de cólon e reto dentro dos estádios, sendo utilizado para ambos (AMIN et al., 2017).

Desde 1º de janeiro de 2018, utiliza-se a classificação TNM da 8ª Edição do Estadiamento da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) e da UICC (*International Union Against Cancer*). Esta é composta de uma classificação clínica pré-operatória (cTNM), patológica pós-operatória (pTNM) e após terapia neoadjuvante e cirurgia (ypTNM). Esta classificação leva em consideração a invasão mural do tumor (T) comprometimento de linfonodos (N) e presença de metástases a distância (M) (AMIN et al., 2017; HARI et al., 2013; NCCN - COLON CANCER, 2018) (Tabela 2).

Tabela 2. Definições para o estadiamento TNM.

Tumor Primário	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência do tumor primário
Tis	Carcinoma in situ, carcinoma intramucoso (envolvimento da lamina própria sem extensão através da muscular da mucosa)
T1	Tumor invade a submucosa (através da muscular da mucosa, mas sem invadir a muscular própria)
T2	Tumor invade a muscular própria
T3	Tumor invade através da muscular própria e tecidos peri-colorretais
T4	Tumor invade o peritônio visceral ou invade ou adere a órgãos e estruturas adjacentes
T4a	Tumor invade através do peritônio visceral (incluindo perfuração do intestino pelo tumor ou invasão contígua através de áreas de inflamação na superfície do peritônio visceral)
T4b	Tumor invade diretamente ou se adere a órgãos e estruturas adjacentes
Linfonodos Regionais	
NX	Linfonodos regionais não puderam ser avaliados
N0	Sem metástase linfonodal
N1	Um a três linfonodos positivos (tumor >0,2mm), ou qualquer depósito tumoral presente mesmo com linfonodos identificáveis negativos
N1a	Um linfonodo regional positivo
N1b	Dois ou três linfonodos regionais positivos
N1c	Nenhum linfonodo é positivo, mas há depósito tumoral na subserosa, mesentério, tecido pericôlonico não peritonizado ou tecidos perirretais e mesorretais
N2	Quatro ou mais linfonodos positivos
N2a	Quatro a seis linfonodos positivos
N2b	Sete ou mais linfonodos positivos
Metástase a Distância	
M0	Sem metástase a distância por imagem
M1	Metástase em uma ou mais estruturas, órgãos ou peritônio
M1a	Metástase em uma ou mais estruturas, órgãos sem metástase peritoneal
M1b	Metástase em duas ou mais estruturas, órgãos sem metástase peritoneal
M1c	Metástase peritoneal isolada sem metástase para estruturas ou órgãos

Fonte: NCCN, 2018.

Nesta edição, tumores T1 invadem até a submucosa, tumores T2 penetram através da submucosa na muscular própria, tumores T3 penetram através da muscular própria, tumores T4a infiltram diretamente o peritônio visceral e tumores T4b invadem ou estão

aderidos a outros órgãos e estruturas (AMIN et al., 2017). O componente T do estadiamento do CCR é um fator prognóstico muito importante, pois tumores T4N0 tem uma sobrevida menor que tumores T1-2 N1-2 (CHU et al., 2016a; HARI et al., 2013; KIM et al., 2015). Outro dado importante desta classificação é que tumores T4aN0 tem uma sobrevida de 79,6% e tumores T4bN0 de 58,4% (GUNDERSON et al., 2010).

A classificação dos linfonodos regionais é N1a (somente um linfonodo positivo), N1b (2 a 3 linfonodos comprometidos), N2a (4-6 linfonodos positivos) e N2b (mais de 7 linfonodos comprometidos). O N1c corresponde ao depósito tumoral na subserosa, mesentério, tecidos pericolônicos e perirretais não peritonizado e sem metástase linfonodal (AMIN et al., 2017; NCCN - COLON CANCER, 2018).

A doença metastática é classificada como M1a quando somente um lugar ou órgão sólido está comprometido (incluindo linfonodos fora do trajeto da drenagem linfática do tumor). M1b é utilizada para representar metástases para múltiplos órgãos ou doença peritoneal exclusiva. M1c para carcinomatose peritoneal com ou sem metástases hematogênicas para órgãos viscerais. Esta divisão foi acrescentada nesta última edição, pois pacientes com carcinomatose peritoneal tem menor sobrevida livre de doença e sobrevida geral que os pacientes sem metástase peritoneal (FRANKO et al., 2012).

A junção da avaliação do TNM determina um estadiamento da lesão (Tabela 3). De um modo geral, tumores invasivos limitados ao cólon (estádios I e II) apresentam uma alta taxa de cura, sendo tratados com cirurgia exclusiva. Quando há invasão linfonodal, o tumor torna-se estágio III, acrescentando a quimioterapia e quando há metástase a distância é classificado como estágio IV, com uma sobrevida comprometida quando comparado aos demais estádios (MARKOWITZ & BERTAGNOLLI, 2009; NCCN - COLON CANCER, 2018).

No entanto, o sistema TNM possui limitações como fator prognóstico e de definição de tratamento em pacientes com CCR. Um exemplo é que 20-40% dos pacientes em estágio II, irão apresentar um tumor mais agressivo do que prevê seu estadiamento e virão a falecer por recidiva ou metástase em um intervalo de até 5 anos (BIAGI et al., 2011). Muitos pacientes em estágio II são considerados de alto risco por critérios clinicopatológicos, para os quais o início da quimioterapia ainda não possui um consenso, restando os marcadores biológicos um papel importante na decisão terapêutica (LIU et al., 2017; SALAZAR et al., 2011; SHO et al., 2017). Outra deficiência deste sistema é a limitação à personalização do tratamento (O'CONNELL et al., 2008), já que os critérios da escala TNM são muito amplos e somente avaliam fatores de invasão mural tumoral, comprometimento linfonodal e

presença de metástase a distância. Foi observado que, mesmo com os novos tratamentos, há uma inalteração na mortalidade nos últimos 20 anos, refletindo a limitada vantagem concedida pelos avanços no tratamento adjuvante (AGHILI et al., 2010). Essas considerações demonstram a grande falha do sistema TNM que não considera a complexidade molecular da heterogeneidade do CCR resultante do amplo espectro de alterações genéticas e epigenéticas (MEIRELLES, 2016).

Tabela 3. Estadiamento anatômico e grupos prognósticos.

Estádio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b
IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1c

Fonte: NCCN, 2018

1.2.5 . Fatores prognósticos e preditivos

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 manejo terapêutico, particularmente para a doença em uma fase precoce. Resultados clínicos como sobrevida global e sobrevida livre de doença são os mais utilizados em estudos oncológicos, especialmente para determinação da efetividade ou superioridade de uma nova droga isolada ou combinações. Fator preditivo é uma condição ou descoberta que pode ser usada para ajudar a prever se a doença de uma pessoa irá responder a um tratamento específico (NAIR; SANDHU & SHARMA, 2014). A prestação de cuidados para o câncer requer uma modelagem prognóstica sofisticada em todos esses níveis de complexidade e em diferentes populações sócio econômicas em diferentes sistemas de saúde (MARKS et al., 2018).

Sabe-se que o CCR possui uma natureza heterogênea e, por isto, definir um prognóstico no momento do diagnóstico torna-se um desafio. Neste contexto, é importante salientar que os grandes estudos dos fatores prognósticos moleculares como o *Oncotype DX*®, o Consenso de Subtipos Moleculares (CMS, do inglês *Colorectal Molecular Subtypes*), *Immunoscore*®, entre outros, são limitados por não conseguirem incluir completamente a complexidade oriunda da heterogeneidade tumoral (GALON et al., 2012; GUINNEY et al., 2015; ROGERS et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2014). Muitos desses fatores são insuficientemente validados por pequenos estudos com limitação metodológica e com falta de comparação robusta entre os fatores prognósticos e de resposta ao tratamento. Outro ponto importante é que estes estudos raramente consideram as características individuais do paciente, as características do tumor, o tratamento ofertado ou a recorrência tumoral. Mesmo assim, o prognóstico dos pacientes com CCR está melhorando devido ao maior acesso ao rastreamento e diagnóstico, assim como a realização de tratamentos oncológicos personalizados baseados em dados moleculares como mutações em *KRAS* e *BRAF*, os quais objetivam a redução dos encargos humanos e financeiros na doença metastática (KAMEL & AL-AMODI, 2017; WALTHER et al., 2009).

A extensão anatômica da doença, avaliada pelo estadiamento clinicopatológico, continua sendo o aspecto mais importante fator prognóstico para a definição do tratamento do CCR. No entanto, existem muitos pacientes cujos resultados não correspondem aos relacionados ao estágio do tumor no momento do diagnóstico. Entender os mecanismos dessa diferença permite uma abordagem mais precisa e personalizada com melhores resultados. Nos últimos anos, novas evidências impactaram positivamente a compreensão do prognóstico individual. Isso inclui a importância das características específicas do paciente, a eficácia do tratamento ofertado pela equipe multidisciplinar, o desenvolvimento de fatores morfológicos histopatológicos, novos marcadores moleculares e indicadores imunológicos (CHAPUIS; CHAN & DENT, 2011). Muitas das informações imunológicas e moleculares oferecem novas formas promissoras para classificar e compreender o prognóstico da CCR, mas a base de conhecimento de sua importância relativa permanece incompleta (MARKS et al., 2018).

Pode-se dividir os fatores prognósticos em fatores do paciente - como idade, sexo, comorbidades, história familiar - fatores do tumor no momento do diagnóstico - como o estadiamento e dados histopatológicos - fatores inerentes ao tratamento - como cirurgia eletiva e cirurgia de urgência, radioterapia e os diferentes agentes quimioterápicos utilizados - fatores imunológicos e fatores moleculares - como expressão do CEA, mutações, instabilidade cromossômica, alteração do funcionamento dos sistemas de reparo do DNA (MARKS et al., 2018) (Figura 10).

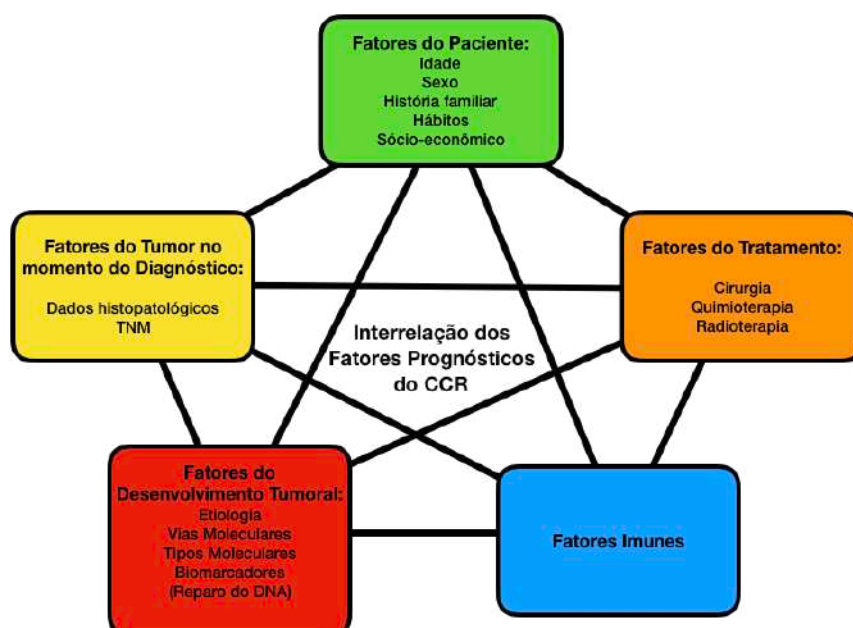


Figura 10. Modelo prognóstico do CCR com seus fatores e sua interrelação, demonstrando a heterogeneidade desta patologia (Adaptado de Marks et al, 2018).

1.2.5.1. Fatores inerentes ao paciente

O desenvolvimento do CCR é o resultado de uma interação de diversas variáveis, incluindo elementos externos como agentes ambientais e alimentares, assim como fatores internos de natureza somática ou hereditária (PINHO & ROSSI, 1999).

Qualquer indivíduo possui um risco de 4-5% ao longo de sua vida de ter um CCR. No entanto, há fatores de risco que podem influenciar esta taxa (MÁRMOL et al., 2017). O maior fator de risco para câncer não modificável, independente do tipo, é a idade: o risco de CCR é consideravelmente aumentado após os 50 anos, sendo raro o seu aparecimento antes dessa idade, exceto nos casos de etiologia hereditária (LEVIN & CORLEY, 2013). Este risco é explicado devido ao acúmulo de alterações genéticas aberrantes e perda da defesa imune com o tempo, tendo as comorbidades um importante fator de decisão terapêutica nos pacientes com idade muito avançada, como por exemplo limitando terapias como quimioterapia e assim afetando diretamente o prognóstico da doença (GLIMELIUS, 2014; PAPAMICHAEL et al., 2009; VAN EEGHEN et al., 2015).

O sexo feminino apresenta uma sobrevida melhor que os homens. As mulheres, prevalentemente apresentam mais tumores de cólon direito com instabilidade microssatélites e os homens uma maior incidência de tumores retais. Uma das explicações possíveis seria uma maior exposição aos estrógenos, uma menor relação neutrófilo/linfócitos (CHUA et al., 2011) e a mutação do gene *p16* nove vezes mais frequente em mulheres (AIT OUKRIM et al., 2015; MAJEK et al., 2013). No entanto, estes mecanismos ainda precisam ser melhor definidos (MARKS et al., 2018).

Além da idade e do sexo, outro fator de risco não modificável, é a história pessoal de CCR e/ou a presença de doença inflamatória intestinal. O risco de pacientes com colite ulcerativa é aumentado em 3,7% (EADEN; ABRAMS & MAYBERRY, 2001) e pacientes com doença de Crohn possuem 2,5 vezes maior chance de desenvolver CCR (CANAVAN; ABRAMS & MAYBERRY, 2006). Nas doenças inflamatórias intestinais, há um crescimento anormal celular denominado displasia. Mesmo que estas células displásicas ainda não sejam malignas, elas têm maior chance de desenvolver atipias que a tornam um câncer (MÁRMOL et al., 2017). Outro fator de risco não modificável é a história familiar de neoplasia maligna, principalmente em parentes acometidos com menos de 50 anos de idade,

aumentando o risco de 1,7 vezes nos seus familiares descendentes (JOHNS & HOULSTON, 2001).

Os fatores de risco também estão relacionados aos hábitos de vida, como dieta e atividades físicas. O sedentarismo é considerado um fator de risco, pois está relacionado com obesidade, outro fator de risco importante para o desenvolvimento do CCR. A obesidade está relacionada com aumento de ingestão de alimentos e acúmulo de tecido adiposo corporal que desencadeiam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, ocasionando uma situação de inflamação no cólon e reto, resistência a insulina e modulação de enzimas metabólicas como a adiponectina e lecitina (MARTINEZ-USEROS & GARCIA-FONCILLAS, 2016). Dessa forma, hábitos dietéticos não saudáveis podem aumentar a chance do CCR em até 70% (MICHELS et al., 2005). Não somente, a ingestão de gordura, mas o consumo elevado de carne vermelha, baixo consumo de fibras, diabetes melito, ingestão de álcool e o tabagismo aumentam o risco de CCR (BASTIDE; PIERRE & CORPET, 2011; BOTTERI et al., 2008; CROSS et al., 2014; LIANG; CHEN & GIOVANNUCCI, 2009; PÖSCHL et al., 2004).

Por último, o *status* sócio econômico é considerado um fator independente de prognóstico e preditivo (SIEGEL et al., 2017; SMITH et al., 2006). No entanto, o *status* socioeconômico pode ser visto como um substituto do prognóstico e não como um fator prognóstico. Por exemplo, os pacientes com um *status* socioeconômico mais precário podem ter mais comorbidades, dietas menos nutritivas, doença com diagnóstico mais tardio e/ou realizado sob o regime de urgência (obstrução ou perfuração do cólon), tabagismo, etilismo sedentarismo entre outros, o que influencia o mau prognóstico (ELHADI et al., 2016).

1.2.5.2. Fatores do tumor no momento do diagnóstico

O CCR é geralmente estadiado após a remoção do tumor primário e os dados histopatológicos provêm informações importantes que definem o tratamento (NCCN - COLON CANCER, 2018). A avaliação histopatológica inclui o grau de diferenciação tumoral, penetração mural pelo tumor e extensão a outras estruturas, número de linfonodos avaliados e comprometidos, presença de metástases a distância, margens cirúrgicas, invasão linfovascular e invasão perineural (COMPTON et al., 2000; COMPTON & GREENE, 2004; FUJITA et al., 2003; JASS, 2007; LIEBIG et al., 2009; LO et al., 2008; LOUGHREY & SHEPHERD, 2017; NISSAN et al., 2006; QUAH et al., 2008; UENO et al., 2007).

O verdadeiro significado das características histopatológicas ainda são objetos de opiniões diversas (COMPTON et al., 2000). Alguns autores propuseram o uso de algoritmos para incorporar variáveis dos dados histopatológicos no sistema TNM, porém essa abordagem não foi aceita na prática clínica corrente (COMPTON et al., 2000; JASS, 2007).

Essa discussão iniciou em 1991, com a publicação da *International Comprehensive Anatomical Terminology International Documentation System* (ICAT/IDS). A seguir, uma nova monografia da UICC discutiu uma visão abrangente dos fatores prognósticos para CCR, sendo avaliados e resumidos as novas variáveis potencialmente independentes, com revisão em 2006 e 2009 (CHAPUIS; CHAN & DENT, 2011; WASHINGTON et al., 2009). No entanto, somente um pequeno número de características histopatológicas não incluídas no TNM em um grupo de pacientes heterogêneos, independente do estágio demonstrou alguma relação prognóstica, como tumores com linfonodos comprometidos macroscopicamente (CHAPUIS et al., 2004; NEWLAND et al., 1994) e microscopicamente (RAHBARI et al., 2012; SLOOTHAAK et al., 2014), invasão linfovascular e perineural (COMPTON, 2003; LIEBIG et al., 2009) (Compton, 2003; Liebig, 2009) e diferenciação celular (COMPTON, 2003; HALVORSEN & SEIM, 1988), podendo influenciar na decisão terapêutica em pacientes estágio II (HOFF, 2016; NCCN - COLON CANCER, 2018). A Tabela 4 demonstra estes dados. As razões que os dados histopatológicos não são utilizados são complexas e em grande parte metodológicas, mas sublinham a necessidade de um acordo sobre métodos de avaliação e valores de corte que devem ser claramente definidos para avaliar corretamente estas características em relatórios rotineiros de patologia cirúrgica (WASHINGTON et al., 2009).

Tabela 4. Dados histopatológicos como fatores prognósticos.

Dado Histopatológico	Significância	Justificativa	Autor
Localização lesão primária	Tumor de reto com pior prognóstico	Cirurgia mais complexa pelo acesso e obtenção de margens cirúrgicas	(ANDEREGGEN et al., 2006; JAFARABADI et al., 2011; MEGUID et al., 2008; WEITZ et al., 2005)
Tamanho do tumor	Sem significância	Somente para registro	(COMPTON et al., 2000; FARHOUD et al., 2002; LEE; PARK & SOHN, 2007; MATSUDA et al., 2009)
Grau de penetração	Utilizado no sistema TNM	Associado a ocorrência de metástases linfáticas e pior prognóstico.	(QUAH et al., 2008; WEITZ et al., 2005; WONG et al., 2008)
Linfonodos comprometidos	Utilizado no sistema TNM	Indicador de pior prognóstico	(CHANG et al., 2007; FAN et al., 2011; LE VOYER et al., 2003; NAGTEGAAL et al., 2017; STACKER; BALDWIN & ACHEN, 2002)
Invasão linfovascular e perineural	Pior prognóstico independente, associado a maior profundidade, infiltração tumoral, presença de metástase linfonodal e hematogênica	Diversos trabalhos mostraram através de análises multivariadas que tanto a invasão perineural como a linfovascular por si só já são um indicador de mau prognóstico.	(COMPTON et al., 2000; FUJITA et al., 2003; LIEBIG et al., 2009; LONGATTO-FILHO et al., 2007; NAGTEGAAL et al., 2017; NISSAN et al., 2006; QUAH et al., 2008; YANG et al., 2015; ZLOBEC et al., 2008)
Metástase vascular	Pior prognóstico	Redução da sobrevida global, com presença de metástases hepáticas e recidivas.	(DERWINGER & GUSTAVSSON, 2008; LEGOLVAN & RESNICK, 2010; NISSAN et al., 2006; QUAH et al., 2008; SHEN et al., 2009)
Grau de diferenciação celular	Menor diferenciação, pior prognóstico	Menor diferenciação relacionada a invasão linfática, à penetração transmural e maior chance de metástase linfonodal e hematogênica.	(DERWINGER & GUSTAVSSON, 2008; MAGUIRE & SHEAHAN, 2014)
Mucina ou células em anel de sinete	Pode ser um fator prognóstico adverso, mas ainda apresenta muitas controvérsias.	Associa-se com pior prognóstico somente se localizado no retossigmoide, ou em pacientes com menos de 45 anos. Aumenta em 2-8% o risco de morte.	(PEREZ et al., 2008; VERHULST et al., 2012)
Infiltrado linfocitário tumoral	Fator prognóstico favorável	Relaciona-se à presença de instabilidade microsatélite do DNA.	(FRIDMAN et al., 2012; KLOOR, 2009; MAGUIRE & SHEAHAN, 2014)

1.2.5.3 . Fatores inerentes ao tratamento

1.2.5.3.1. Tratamento cirúrgico

A cirurgia é muitas vezes o principal componente curativo do tratamento, tanto para os tumores em estágio precoce assim como os que tenham metástase linfonodal e hematogênica. A cirurgia que segue os preceitos oncológicos é considerada um importante fator prognóstico para a recorrência após ressecções de CCR (QUIRKE et al., 2009; WEST et al., 2008). No câncer de reto, foi demonstrado que a presença de células tumorais a menos de 1mm da margem de ressecção é um fator de mau prognóstico (BIRBECK et al., 2002). O envolvimento da margem circunferencial de ressecção depende da extensão da doença, da eficácia das técnicas radiológicas na predição de doença e da qualidade da cirurgia. A excisão mesorretal total envolve a excisão total do mesorreto em um pacote intacto da fáscia, objetivando um plano melhor de ressecção e a menor incidência de margens comprometidas, assim como menor recorrência local (HEALD & RYALL, 1986; WIBE et al., 2002). A cirurgia padronizada no CCR pode melhorar o prognóstico (BERTELSEN et al., 2016; HOHENBERGER et al., 2009; SØNDENAA et al., 2014; WEST et al., 2010; WIBE et al., 2002).

O caráter de urgência da cirurgia da ressecção do tumor primário, quando o mesmo está perfurado ou com a presença de um quadro de oclusão intestinal (MARKS et al., 2018; RENZI et al., 2016), bem como um número inadequado de linfonodos ressecados (inferior a 20) influenciam em um pior prognóstico do CCR (LE VOYER et al., 2003).

Do ponto de vista radiológico, a precisão do estadiamento tem um impacto significativo no resultado cirúrgico subsequente. O aprimoramento das técnicas de imagem permitiu um estadiamento mais preciso pré-operatório e, portanto, uma maior precisão na previsão de prognóstico. Além disso, o planejamento adequado da abordagem cirúrgica depende de exames de imagem fidedignos, levando a resultados oncológicamente superiores e limitando a morbidez (quando possível). A ressonância nuclear magnética, combinada com a tomografia computadorizada é um método confiável na avaliação do CCR (BATTERSBY et al., 2016; MERCURY, 2006).

1.2.5.3.2. Radioterapia

Para o câncer de reto, a radioterapia é agora uma modalidade de tratamento bem estabelecida. Embora este tratamento reduza o risco de recorrência local, não há influência na sobrevida global (MARKS et al., 2018). Além disso, há diferenças em sua aplicação no mundo. Por exemplo, nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa, a abordagem mais comum é a radioterapia pré-operatória de curta duração; no entanto, no Japão, esta não é uma prática padrão (BOLAND & FAKIH, 2014; TOKUHARA et al., 2016). Na Inglaterra, foi demonstrada uma grande variação no uso da radioterapia, pacientes jovens são irradiados com mais frequência, enquanto esta foi menos utilizada em pacientes idosos e com comorbidades (MORRIS et al., 2016).

1.2.5.3.3. Quimioterapia

Os tratamentos quimioterápicos e terapias-alvos baseiam-se em 6 classes ou pelo menos 13 fármacos diferentes (Tabela 5), podendo serem utilizados em combinações (Tabela 6), o que possibilita a individualização do tratamento de cada doente. Neste cenário, a individualização do tratamento do paciente, inclusive com a determinação do perfil molecular, possibilita uma escolha terapêutica inteligente e com melhores resultados (HOFF, 2016).

Tabela 5. Drogas quimioterápicas utilizadas no tratamento do CCR.

Droga	Alvo
Fluoropirimidinas <ul style="list-style-type: none">• 5-Fluorouracil• capecitabina	Timidilato sintetase
Leucovorin	Metábólito ativo do ácido fólico Potencializa efeito do 5-FU
Platinas - oxaplatina	DNA
Inibidor da Topoisomerase - irinotecano	Topoisomerase I
Anti-VEGF <ul style="list-style-type: none">• bevacizumabe	Fator de crescimento vâsculo-endotelial
Anti-EGFR <ul style="list-style-type: none">• cetuximabe• panitumumabe	Receptor do fator de crescimento endotelial
Inibidores de quinases - regorafenibe	Vias angiogênica, estromal e do receptor da tirosina quinase oncogênica
Inibidores de PARP-1 - olaparibe	Reparo de DNA
Inibidores de anti-PD-L1 - pembrolizumabe	Antígeno tumoral

Fonte: NCCN, 2018.

Tabela 6. Combinações de drogas quimioterápicas no CCR.

Combinação	Droga
XELOX	capecitabina
	oxaplatina
FOLFIRI	LV
	5-FU
	irinotecano
FOLFOX	LV
	5-FU
	oxaplatina
FOLFOXIRI	LV
	5-FU
	Irinotecano
	Oxaplatina
XELIRI	capecitabina
	oxaplatina
	irinotecano

Fonte: NCCN, 2018.

De um modo geral, tumores de cólon estágio I e II de baixo risco (número de linfonodos ressecados superior a 20, ausência de quadro de obstrução ou perfuração no diagnóstico, ausência de invasão perineural ou linfovascular ou tumor bem diferenciado), o tratamento cirúrgico exclusivo com seguimento é suficiente. Paciente com tumores estágio II com alto risco, III e IV deve ser considerado tratamento quimioterápico adjuvante com esquemas combinados de 5-FU (5-fluorouracil), capecitabina, leucovorin (LV), oxaliplatina, irinotecano, bevacizumabe, cetuximabe, panitumumabe, regorafenibe e olaparibe (NCCN - COLON CANCER, 2018), sendo iniciado em até 4-6 semanas após a cirurgia, visto que a cada 4 semanas de atraso, há uma redução da sobrevida global em 14% (BIAGI et al., 2011). Nos tumores de reto, a partir do estágio II, deve ser indicada radioterapia com quimioterapia neoadjuvante (NCCN - COLON CANCER, 2018).

O primeiro agente utilizado no CCR foi o 5-FU, em 1957, sendo ainda hoje um dos pilares do tratamento quimioterápico. O 5-FU é o 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).

O LV, aumenta a ação do 5-FU, pois estabiliza a ligação do metabólito do 5-FU à timidilato sintase; assim o metabólito é incorporado no DNA, interferindo com sua replicação. A administração sinérgica de 5-FU/LV melhorou as taxas de resposta em CRC em até 37% quando em comparação com 5-FU isolado, bem como aumentando sobrevida global (ERLICHMAN et al., 1988; PETRELLI et al., 1987).

A capecitabina, desenvolvida como alternativa ao 5-FU, é um fármaco via oral precursor do 5-FU que quando metabolizado possui o mesmo mecanismo de inibição da timidilato sintase. Essa droga demonstrou que, quando utilizada de forma isolada, teve uma resposta ao tratamento superior ao 5-FU/LV, mas com a mesma sobrevida (CUNNINGHAM et al., 2004; HOFF, 2016; TWELVES et al., 2001).

A oxaplatina, utilizada juntamente com a capecitabina (XELOX) ou com 5-FU e leucovorin (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).

O irinotecano, um análogo sintético da camptotecina, o qual atua como inibidor topoisomerase I, impedindo a replicação e a transcrição do DNA), assim levando a lesões de quebra dupla (ZHUANG et al., 2010), sendo outro quimioterápico utilizado no CCR metastático. Inicialmente foi utilizado como droga de segunda linha para pacientes não respondedores a terapia com 5-FU, sendo observado um aumento da sobrevida global quando comparados ao tratamento com 5-FU isolado (ROUGIER et al., 1998).

Ainda hoje, 5-FU, capecitabina, LV, cisplatina, oxaliplatina e o irinotecano continuam a ser os principais agentes utilizados no tratamento do CCR. No entanto, a associação destes demonstrou melhores respostas em relação a sobrevida, sendo o padrão de quimioterapia tanto para o tratamento da doença com caráter curativo, quanto paliativo, possibilitando também a conversão de pacientes paliativos em curativos (DE GRAMONT et al., 2000; DOUILLARD et al., 2000; FOLPRECHT et al., 2008; GUSTAVSSON et al., 2015; LOUVET et al., 2002; SEYMOUR et al., 2007).

O FOLFOX (LV, 5-FU e oxaplatina), melhorou a sobrevida livre de doença em aproximadamente 20% (estádio II e III) a 30% (estádio IV) e sobrevida global em 6% (estádio II e III) a 30% (estádio IV) quando comparado a 5-FU/LV isolado (ANDRÉ et al., 2004; DE GRAMONT et al., 1997, 2000; KUEBLER et al., 2007; LÉVI et al., 1992). O esquema FOLFIRI (LV, 5-FU e Irinotecano) quando comparado a 5-FU/LV aumentou a taxa de resposta ao tratamento de 31 para 49% em pacientes com CCR metastáticos. Outro esquema é o FOLFOXIRI (LV, 5-Fu, oxaplatina e iritecano) que quando comparado ao FOLFIRI aumentou a sobrevida livre de doença e sobrevida global (TOURNIGAND et al., 2004).

Outros esquemas utilizados são o XELOX (capecitabina + oxaplatina) e o XELIRI (Capecitabina, Oxaplatina e Irinotecano). Quando o esquema XELOX foi comparado ao 5-FU/LV, houve um aumento do sobrevida livre de doença e sobrevida global com resultados semelhantes ao FOLFOX (HALLER et al., 2011).

Mais recentemente, especialmente em se tratando da abordagem do CCR metastático, grandes avanços têm sido alcançados. Podemos apontar quatro classes principais de drogas que estão sendo adicionadas aos esquemas clássicos no 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 (do inglês, *Reticular Activating System*); (3) inibidores de quinases (regorafenib); (4) inibidores de PARP-1 (do inglês, *Poly (ADP-ribose) Polymerase 1*) - (olaparibe). Os melhores dados de sobrevida são de pacientes com CCR metastático, os quais beneficiam-se com um aumento da sobrevida global em 5 anos em 30% com estes agentes quimioterápicos (COIMBRA et al., 2011).

O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humano desenvolvido contra VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*) que se liga ao VEGF solúvel, evitando a ligação ao receptor e inibindo a proliferação de células endoteliais e formação de vasos. Seu uso associado ao FOLFIRI teve um aumento do sobrevida livre de doença (6,2 meses para 10,6 meses) e sobrevida global (de 15,6 meses para 20,3 meses) (HURWITZ et al., 2004).

Outra via de sinalização tumoral é o receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês, *epidermal growth factor receptor*) responsável pelo crescimento e capacidade de metastatização (OVERMAN & HOFF, 2007). Pacientes com CCR com

aumento na expressão do EGFR têm maior probabilidade de desenvolver metástases e menor sobrevida quando comparados aos pacientes em que a expressão deste receptor não está alterada (TAKAHASHI et al., 1995).

O cetuximabe e o panitumumabe são os anticorpos monoclonais direcionados contra o EGRF, inibindo a angiogênese, paralisando o ciclo celular, estimulando a apoptose e a ativação do sistema imune através dos mecanismos de citotoxicidade e ativação do complemento (OVERMAN & HOFF, 2007). O uso do cetuximabe em combinação com o irinotecano, em pacientes com progressão de doença, resulta em um aumento do intervalo livre de progressão de 4 meses (CUNNINGHAM et al., 2004).

O regorafenibe, um inibidor de quinases das vias angiogênica, estromal e do receptor da tirosina quinase oncogênica (DIETVORST & ESKENS, 2013) demonstrou uma leve melhora na sobrevida global em pacientes CCR metastáticos refratários (GROTHEY et al., 2013). Os inibidores de PARP-1 (olaparibe) serão discutidos no artigo de revisão dessa tese.

Além disso, os tumores com MSI apresentam alta produção de antígenos tumorais com infiltração linfocitária tumoral e aumento da expressão de PD-L1 (GERMANO et al., 2018; LLOSA et al., 2015) sendo responsivos ao bloqueio imune com pembrolizumabe, melhorando a sobrevida dos pacientes (GERMANO et al., 2017; LE et al., 2017b; LUKSKA et al., 2017; MCGRANAHAN et al., 2016; MOISEYENKO et al., 2018).

Todas estas linhas de quimioterapia resultaram em um aumento da sobrevida global de 6 meses de pacientes com CCR metastáticos da década de 1980 para 30 meses na atualidade (LE et al., 2017a; SIEGEL et al., 2017).

1.2.5.4. Fatores imunes

O fator imune compreende a interação da inflamação sistêmica e fatores de resposta do hospedeiro agindo localmente no tumor. Em relação à inflamação sistêmica, um marcador que está sendo cada vez mais utilizado é a relação neutrófilos/linfócitos, calculada dividindo a contagem de neutrófilos pela contagem de linfócitos. Um aumento desse índice é traduzido como linfocitopenia (comprometimento mediado por células) e neutrofilia (resposta a inflamação aguda), sendo associado a um pior prognóstico diminuindo a sobrevida e o tempo livre de progressão de doença (LI et al., 2014). Este teste é uma informação retirada do hemograma do paciente, sem custo financeiro, mas precisa ser melhor inserido no contexto clínico (MARKS et al., 2018).

O sistema imunológico também possui um papel importante diretamente nas células do CCR. Diversos tipos de células imunes são encontrados nos tumores, em particular, a presença de um infiltrado linfocitário peritumoral (com a presença de células citotóxicas CD3, CD45RO, CD8 e FOXP3) modificando o prognóstico. Para pacientes com baixa densidade de células CD3 e CD45RO, tanto no tumor ou em sua margem, independente do estágio, a sobrevida global é semelhante do CCR metastático (GALON et al., 2006). Uma pontuação padronizada, denominada Immunoscore®, foi sugerida como um marcador prognóstico clinicamente útil devido à sua forte associação com o resultado em alguns estudos (FRIDMAN et al., 2012). No entanto, sua implementação requer uma validação com estudos com maior número de casos para identificar como ela se relaciona com o subconjunto MSI de tumores. Aproximadamente 4% dos CCR metastáticos apresentam MSI alto, que indicam uma falha do sistema de reparo de malpareamentos. Esta condição está associada a um aumento da carga mutacional e presença de um infiltrado peritumoral de células imunes (GALON et al., 2006), sendo estes pacientes candidatos a terapia-alvo com inibidores do ponto de controle imune (anti PD-L1) (GERMANO et al., 2018; LLOSA et al., 2015).

1.3. Biomarcadores

O biomarcador molecular ideal deve apresentar alta sensibilidade e especificidade, ser seguro, financeiramente acessível e consistentemente detectado, independentemente do gênero ou do grupo étnico (HUANG et al., 2010; KUMAR et al., 2009; PARIKH & VASAN, 2007; TANAKA et al., 2010). Este biomarcador também deve detectar alterações genômicas e/ou variações na expressão de proteínas que se correlacionam especificamente com a doença, levando a um diagnóstico preciso ou ser capaz de avaliar o risco de doenças futuras e a probabilidade de um paciente responder a um tratamento específico, conduzindo ao máximo a um tratamento personalizado (GONZALEZ-PONS & CRUZ-CORREA, 2015).

As descobertas na biologia molecular nas últimas três décadas elucidaram alguns mecanismos moleculares da carcinogênese colorretal. Ainda, dentro de um tumor, há um conjunto variado de grupos celulares com alterações genéticas variadas e o diagnóstico molecular busca refletir uma grande representação destas modificações. Os avanços no entendimento deste processo oferecem a oportunidade de identificar marcadores moleculares de forma diagnóstica buscando um diagnóstico precoce, estratificação de risco, e determinação prognóstica. Além disso, um biomarcador molecular poderá indicar a progressão da doença predizendo a resposta ao tratamento e de sobrevivência, assim como ser utilizado para monitorar a recorrência da doença (GONZALEZ-PONS & CRUZ-CORREA, 2015).

Embora alguns dos testes de rastreamento do CCR disponíveis tenham se provado efetivos na redução da mortalidade, um teste altamente específico e não invasivo ainda não foi descoberto. A *American Cancer Society (ACS)* recomenda uma série de testes de rastreamento que vão de semi-invasivos (colonoscopia) a não-invasivos (exames de fezes). Porém, a combinação de ausência de sintomas, métodos endoscópicos semi-invasivos e uma acurácia questionável dos exames de fezes resulta em diagnósticos tardios em um número significativo de indivíduos (GONZALEZ-PONS & CRUZ-CORREA, 2015). Espera-se que os testes moleculares sejam mais sensíveis e específicos dos que os métodos atuais. Por isto, inúmeros estudos para a identificação de marcadores moleculares (DNA, RNA (do inglês, ribonucleic acid) ou proteína) em tumores, no plasma ou nas fezes são realizados.

Atualmente, alguns marcadores moleculares já são utilizados para a avaliação do tumor colorretal, direcionando um tratamento personalizado. Os testes moleculares

utilizados incluem MSI, análise das mutações em BRAF, KRAS e NRAS. Mais recentemente, análise de CIMP, expressão variada de RNA mensageiros, microRNA, componentes da via EGRF também têm sido estudados quanto ao seu potencial prognóstico e preditivo. Finalmente, uma classe inovadora de marcadores em CCR vem recebendo maiores atenções da comunidade científica: as alterações em genes e proteínas das demais vias de reparo do DNA além da clássica via de reparo de malpareamento (LAPORTE et al., 2018).

1.3.1. Antígeno carcinoembriônico (CEA)

Este antígeno, descrito em 1965 (GOLD & FREEDMAN, 1965), é uma glicoproteína cuja concentração aumenta quando produzida por tumores de vísceras ocas. Níveis mais elevados de CEA são considerados indicativos de mau prognóstico para o CCR ressecável e está também relacionado com a progressão tumoral (LOCKER et al., 2006). A sensibilidade desse marcador varia de 41-97% e a especificidade de 52 a 100% aumentando de acordo com o maior estadiamento (HUNDT; HAUG & BRENNER, 2007; NICHOLSON et al., 2015). No entanto, altos níveis plasmáticos não são específicos do CCR, podendo apresentar-se aumentados em doenças hepáticas, pancreatite ou mesmo em outras neoplasias. Assim, não se utiliza o CEA para o rastreamento e diagnóstico do CCR, pois seus altos níveis somente são detectáveis em estágios avançados de uma pequena fração de pacientes com CCR (GONZALEZ-PONS & CRUZ-CORREA, 2015).

1.3.2. KRAS e NRAS

O proto-oncogene KRAS codifica uma pequena proteína G que atua *downstream* das vias sinalizadoras PI3K (do inglês, *phosphatidylinositol-3-kinase*)/PTEN (do inglês, *protein tyrosine phosphatase*)/AKT e RAF/MEK (do inglês, *abbreviation of MAP (mitogen-activated protein) kinase*)/ERK (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*). A detecção de mutações KRAS é atualmente o marcador preditivo mais utilizado para a resposta às terapias baseadas em anticorpos anti-EGFR (cetuximab e panitumumab) (CUNNINGHAM et al., 2004). No entanto, estudos recentes demonstraram evidências convincentes que, somado ao KRAS, mutações no gene NRAS, presente em 3-5% dos casos de CCR, predizem uma ausência de resposta a terapias baseadas em anti-EGFR (DE ROOCK et al., 2010; DOUILLARD et al., 2013). Estes estudos apoiam o uso da análise mutacional da família RAS como biomarcadores preditores da eficácia terapêutica de anti-EGFR no CCR metastático (APRILE G, MACERELLI M, DE MAGLIO G, PIZZOLITTO S, 2013) ao prever baixas respostas a cetuximab e panitumumab associados com FOLFOX (ANDREYEV et al., 2001; CUNNINGHAM et al., 2004; DOUILLARD et al., 2013; ROOCK et al., 2011; SAMOWITZ et al., 2000).

Aproximadamente, 60-70% dos pacientes com CCR metastáticos tem um tipo selvagem de KRAS com resposta limitada às terapias baseadas em anticorpos anti-EGFR (ALLEGRA et al., 2009), sendo um teste já recomendado pela NCCN, ASCO e ESMO (NCCN - COLON CANCER, 2018; VAN CUTSEM et al., 2016a). Todavia, ainda não foi claramente estabelecido se o pior prognóstico é associado à mutações em KRAS ou é independente do regime de tratamento utilizado (WANG et al., 2010).

As mutações do NRAS são parte do clínico do CCR metastático, para definir o uso do inibidor de EGFR. As implicações clínicas da mutação do NRAS, além da falta de resposta à terapia anti-EGFR (DOUILLARD et al., 2013), é o comportamento clínico semelhante do CCR metastático com KRAS mutado. Mutações no KRAS têm sido associadas com tumores do lado direito do cólon, enquanto mutações no NRAS têm sido associadas com tumores primários do lado esquerdo e sexo feminino (IRAHARA et al., 2010), sugerindo uma biologia distinta para subgrupos moleculares mutantes de KRAS e NRAS de CCR metastáticos.

Alguns estudos investigaram CCR com KRAS ou NRAS mutantes, mas foram limitados por um pequeno número de casos. KRAS e todas as mutações do RAS foram associadas a pior sobrevida no CCR metastático (YAEGER et al., 2015). O KRAS e todas as mutações do RAS têm sido associados a piores desfechos após hepatectomia com risco aumentado de recorrências nos pulmões (KEMENY et al., 2014; VAUTHEY et al., 2013). No entanto, não se sabe se os casos mutantes de NRAS contribuíram para esses desfechos desfavoráveis, pois representavam a minoria de casos mutantes de RAS estudados.

1.3.3. 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 esporádico com alta MSI (DAVIES et al., 2002; DE LA CHAPELLE; PALOMAKI & HAMPEL, 2009), sendo ausente nos pacientes com Síndrome de Lynch. Pode ser utilizado como uma importante ferramenta diagnóstica para distinguir o CCR esporádico do hereditário. A mutação mais observada é a *nonsense* 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 CCR (FRANSÉN et al., 2004). Estudos recentes sugerem que as mutações em *BRAF* também possam ser utilizadas como marcadores preditivos de resposta às terapias anti-EGFR (ROOCK et al., 2011; VAN CUTSEM et al., 2016a). As mutações em *BRAF* são associadas a um pior prognóstico, porém ainda não se sabe se isto é independente do tratamento. NCCN e ESMO recomendam que em sejam testadas as mutações em BRAF com o objetivo de definir uma terapia ótima para o paciente com CCR metastático (NCCN - COLON CANCER, 2018; VAN CUTSEM et al., 2016a).

1.3.4. Instabilidade microssatélite (MSI)

As mutações genéticas e as alterações epigenéticas em genes do sistema de reparo do mal pareamento, MMR (do inglês, *mismatch repair*), (especialmente *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*) resultam em alterações em sequências de alta repetição ou microssatélites (GUTTMACHER et al., 2003; UMAR et al., 2014). A definição de MSI alto é baseado em mais de 30% de “*loci*” instáveis presentes no tumor. Os tumores com 10-29% de “*loci*” instáveis são considerados MSI baixo. Os CCR esporádicos com MSI alto são localizados principalmente no cólon proximal, com histopatologia de células em anel de sinete ou com mucina, pouco diferenciados, com abundância de infiltrado de leucócitos peritumoral e mutações em *BRAF* (IACOPETTA; GRIEU & AMANUEL, 2010; JASS et al., 2002; ROTH et al., 2010).

As evidências da literatura sugerem que a avaliação da presença de MSI no CCR esporádico pode ser uma importante ferramenta diagnóstica e preditiva da resposta ao tratamento (GONZALEZ-PONS & CRUZ-CORREA, 2015). O MSI elevado é associado com melhora da sobrevida e um prognóstico mais favorável quando comparado a pacientes com tumores com estabilidade microssatélite, estando ligado a menor taxa de linfonodos comprometidos e metástase sistêmica, portanto um tumor regionalmente localizado. Outros estudos sugerem que o MSI alto pode ser um preditor independente de uma doença menos agressiva e melhores desfechos (BENATTI, 2005; POPAT; HUBNER & HOULSTON, 2005; SINICROPE et al., 2006). O MSI pode ser também um fator preditivo a resposta ao tratamento. Considerando o MSI como fator preditivo, em pacientes estágio II, o “*status*” influencia as decisões do tratamento quimioterápico. No entanto em pacientes CCR metastáticos, o MSI baixo pode ser um fator preditivo de não resposta, mas os dados são conflitantes na literatura (RYAN et al., 2017). Finalmente, a ESMO, NCCN, JSCCR (do inglês, Japanese Society for Câncer of the Colon and Rectum) recomendam o teste do MSI devido ao grande valor preditivo no tratamento do CRC metastático com inibidores imunes do *checkpoint* celular, mas ainda há vários estudos recrutando pacientes para definir o real papel desde marcador no tratamento de pacientes com CCR (NCCN - COLON CANCER, 2018; VAN CUTSEM et al., 2016b; WATANABE et al., 2015). Os mecanismos deste marcador serão discutidos na próxima seção.

1.3.5. Subtipos moleculares de consenso do CCR

Dada a complexa heterogeneidade do CCR, diversas tentativas de definir subtipos moleculares têm sido feitas. Recentemente, um grupo de pesquisadores sugeriu um consenso ao tentar combinar dados de um conjunto de 4151 amostras do TCGA (do inglês, *The Cancer Genome Atlas*), criando 4 subclassificações moleculares associadas com aspectos prognósticos de cada uma delas (GUINNEY et al., 2015; INAMURA, 2018) (Figura 11).

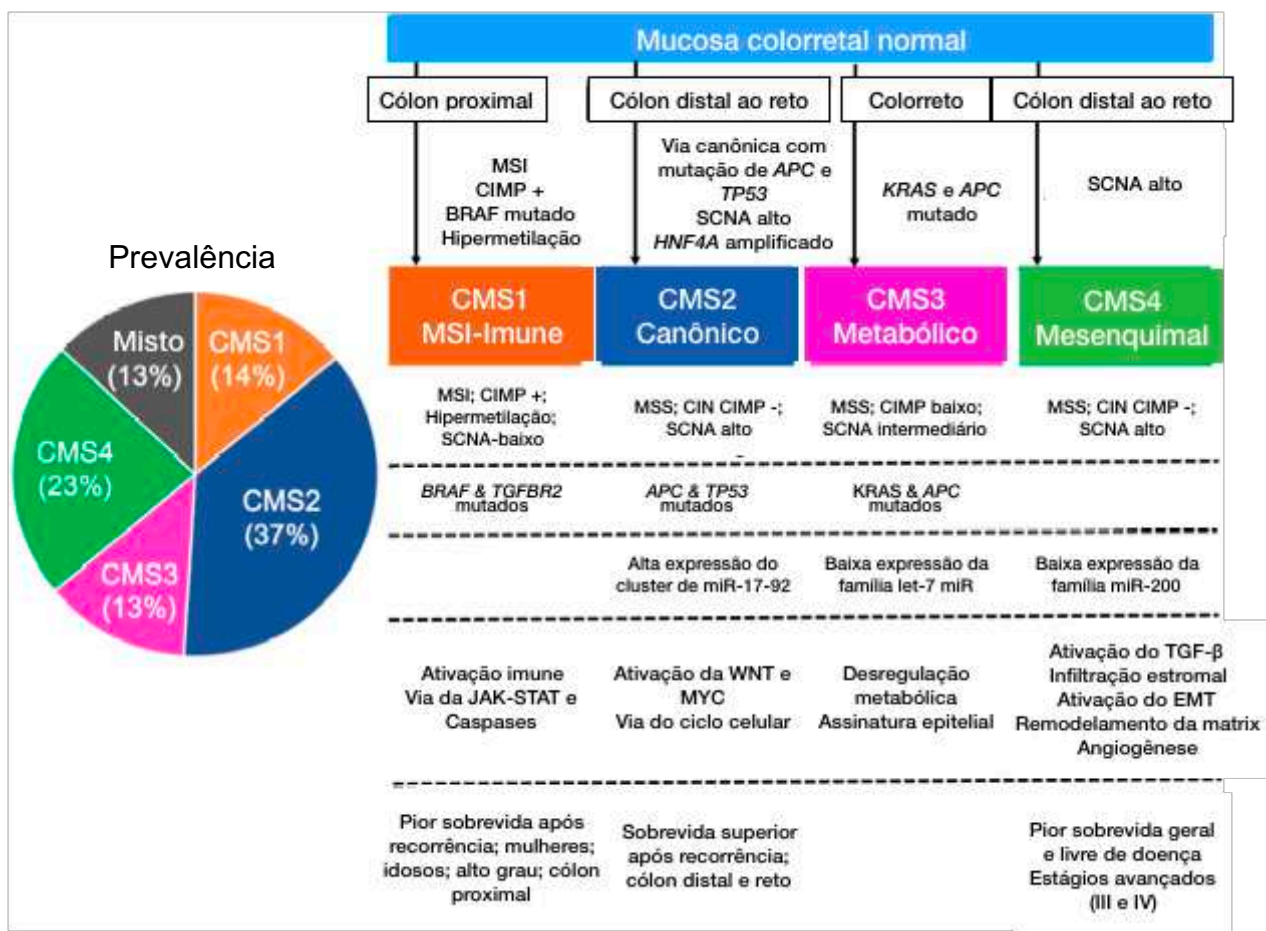


Figura 11. A taxonomia do CCR de acordo com o consenso de subtipos moleculares CCR (CMS, do inglês, *colorectal molecular subtypes*). Este reflete as diferenças biológicas nos subtipos moleculares baseados na expressão gênica. CIMP: fenótipo metilador de ilhas CpG; CIN: instabilidade cromossômica; EMT: transição epitélio-mesenquimal; MSI: instabilidade de microssatélite; MSS: estabilidade microssatélite; SCNA: alteração do número de cópias somáticas (Adaptado de Inamura, 2018).

Embora esta classificação ainda não possa ser considerada como um estratificador terapêutico, certamente ela ajuda a compreender os diferentes subtipos moleculares de tumores. No entanto, este modelo é bastante discutido na literatura, com outros modelos de divisão molecular sendo apresentados e buscando sua validade em relação ao seu poder prognóstico e preditivo (EIDE et al., 2017; LINNEKAMP et al., 2018).

1.3.6. Importância do estadiamento e marcadores tumorais no CCR

Mesmo com todas as evidências de heterogeneidade molecular dos tumores colorretais, o estadiamento TNM continua a ser o principal fator prognóstico e preditivo na seleção de pacientes com CCR para quimioterapia adjuvante (BENSON et al., 2013). Pacientes com CCR em estágio III são rotineiramente referenciados para quimioterapia adjuvante, pelo alto risco de metastatização (50-60%), mesmo com uma ressecção oncológica ótima (BENSON et al., 2004a; QUASAR COLLABORATIVE GROUP, 2007). Por outro lado, pacientes com CCR em estágio II não são referenciados para quimioterapia adjuvante, pelo fato que vários estudos não demonstraram benefício (BENSON et al., 2013, 2004a; FIGUEREDO; MUKHERJEE & ZBUK, 2008; QUASAR COLLABORATIVE GROUP, 2007; SCHRAG et al., 2002). No entanto, pacientes com CCR no estágio II representam um grupo altamente heterogêneo que desafia a estratificação de risco com base apenas em fatores clinicopatológicos. Estudos têm consistentemente descrito um risco de 20 a 30% deste grupo desenvolver recorrência em pacientes com CCR estágio II, e o atual sistema de estadiamento permanece ineficaz na identificação deste subgrupo (DOTAN et al., 2012). Embora as recomendações sejam dadas para consideração de terapia adjuvante em pacientes de estágio II com alto risco como tumores T4, perfurados ou obstruídos, má diferenciação celular, invasão linfovascular (O'CONNELL et al., 2008; QUAH et al., 2008), menos de 12 linfonodos ressecados (CHANG et al., 2007; LE VOYER et al., 2003; PRANDI et al., 2002), e um nível elevado de CEA pré-operatório (TAKAGAWA et al., 2008) estas permanecem inadequadas (BENSON et al., 2013), mesmo que estes fatores tenham um importante impacto negativo na sobrevida, onde estes pacientes possuem uma sobrevida de 5 anos de 60%, similar ao pacientes em estágio III (O'CONNELL et al., 2008; QUAH et al., 2008). As limitações do sistema de estadiamento TNM sugerem a necessidade de considerar além dos fatores clinicopatológicos no prognóstico e predição do tratamento do CCR, algum outro marcador (BENSON et al., 2013).

O uso dos marcadores moleculares como fatores prognósticos e preditivos na oncologia tem sido aplicado em uma ampla variedade de tipos de neoplasia (DIETEL et al., 2015). No CCR, a instabilidade de microssatélites (MSI) e o status de mutação no KRAS, NRAS e BRAF foram propostos como potenciais fatores prognósticos (NCCN - COLON CANCER, 2018; POPAT; HUBNER & HOULSTON, 2005; ROTH et al., 2010). No entanto, grande parte dos estudos de estado molecular dos CCR são em uma pequena amostra de

pacientes, com variações de reprodutibilidade de resultados entre estudos e inconsistências na precisão da predição quando aplicado a uma coorte de pacientes independentes (ABDUL AZIZ et al., 2016; SALAZAR et al., 2011; SANZ-PAMPLONA et al., 2012). Nos últimos anos, com o desenvolvimento de novas técnicas, iniciou-se a busca por novos marcadores que possam ajudar na decisão terapêutica deste subgrupo de pacientes (LIU et al., 2017; SHO et al., 2017). A partir da proposta da instabilidade de microssatélites (ou da deficiência na via de reparo de malpareamento do DNA) como fator prognóstico no CCR, abriu-se a visão sob o sistema de reparo do DNA como um potencial marcador molecular prognóstico e preditivo no CCR.

1.4. Sistema 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 (NAGEL et al., 2014), podendo variar entre os indivíduos, de acordo com a exposição a agentes externos e processos celulares internos como lesões oxidativas ocasionadas pelo metabolismo celular (LORD & ASHWORTH, 2012). Quando não reparadas adequadamente, estas lesões podem induzir as células, em um melhor cenário, à morte, senescência ou podem ser as precursoras de processos carcinogênicos.

O reparo das lesões ao DNA envolve uma rede de mecanismos especializados em reconhecer e remover os diferentes tipos de danos que afetam a integridade do DNA, iniciando um processo em cascata altamente coordenado – coletivamente conhecido como DDR (do inglês: *DNA Damage Response*). Em linhas gerais, este processo envolve o reconhecimento ao dano ao DNA, a sinalização da sua presença no contexto celular replicativo e o processamento em si da lesão (ou o 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 (HOEIJMAKERS, 2009; MENCK & MUNFORD, 2014; ZHOU & ELLEDGE, 2000), ou sinalizar às células para que ativem a apoptose quando sob circunstâncias de persistência ou irreparabilidade do dano (FRIEDBERG et al., 2006; MEIRELLES, 2016; RICH; ALLEN & WYLLIE, 2000).

Didaticamente, as vias de reparo de DNA são divididas de acordo com o tipo de lesão que processam, sendo chamadas de: reparo direto; reparo de malpareamento ou *mismatch repair (MMR)*; reparo por excisão de bases (BER, do inglês: *Base Excision Repair*) e de nucleotídeos (NER do inglês: *Nucleotide Excision Repair*); reparo de quebras duplas (*DSBR*, do inglês: *double-strand breaks repair*), que pode ocorrer por recombinação homóloga (HR, do inglês: *Homologous Recombination*) ou junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês: *Non-Homologous End Joining*); reparo pela via da síntese translesão (TLS, do inglês: *Translesion Synthesis*) e ligações intercadeias ou *crosslinks* do DNA (ICLs, do inglês: *Interstrand Crosslinks*). 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; CALVO & SAMSON, 2012; MALAQUIN et al., 2015; MICHL; ZIMMER & TARSOUNAS, 2016; SIMONELLI et al., 2012) (Figura 12).

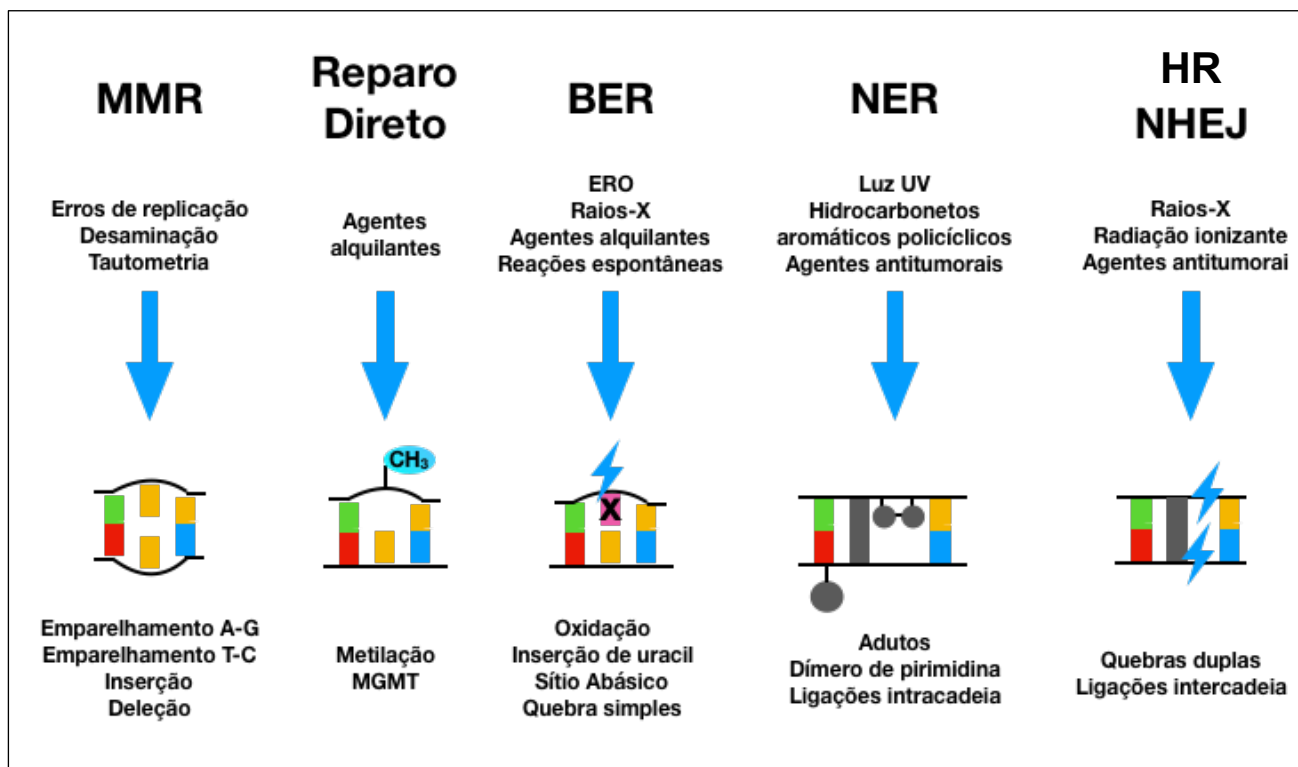


Figura 12. Esquema ilustrativo dos principais agentes endógenos e exógenos com potencial de danificar o DNA, exemplos das lesões causadas e vias diretamente envolvidas com o seu reparo. ERO: espécies reativas de oxigênio (Adaptado de HOEIJMAKERS, 2001; IYAMA & WILSON, 2013).

O sistema de reparo do DNA pode ser considerado uma importante via de carcinogênese no CCR, pois pode determinar a evolução do tumor (fator prognóstico), assim como a resposta ao tratamento (fator preditivo) (ROOS; THOMAS & KAINA, 2016). O CCR esporádico está relacionado a interação de diversos fatores de risco que podem ocasionar o dano ao DNA. O primeiro fator desta interação é o fato que o epitélio colônico ter uma alta taxa de replicação celular, estando altamente e diretamente exposto a agentes mutagênicos (ARVELO; SOJO & COTTE, 2015). Dentre os danos endógenos fisiológicos que esta células podem sofrer, destaca-se o estresse oxidativo devido a modificações químicas por moléculas reativas criadas durante o metabolismo celular normal (APEL & HIRT, 2004; SEDELNIKOVA et al., 2010), o qual o tecido colônico está altamente sujeito pelo seu catabolismo celular (ARVELO; SOJO & COTTE, 2015). Além de fontes endógenas de danos ao DNA, esta célula está sob constante ataque de agentes exógenos e ambientais que podem a danificar. Estes incluem o estresse físico, como a luz ultravioleta (UV), (FRIEDBERG et al., 2006; RAVANAT; DOUKI & CADET, 2001) ou radiação ionizante, que pode tanto ter origem natural (radiação cósmica e gama) como artificial (raios-X e

radioterapia) que levam a uma quebra dupla do DNA (FRIEDBERG et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2008), entre outros citados em tópico anterior.

Adicionalmente, o DNA celular pode ser danificado por agentes químicos como os agentes utilizados na quimioterapia. Nestes, incluem-se os agentes alquilantes, como metilmetanossulfonato (MMS) e a temozolomida (TMZ), que induzem alquilações as 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 (IRIGARAY & BELPOMME, 2010; NOLL; MASON & MILLER, 2006). Os agentes quimioterapêuticos como os inibidores de topoisomerase I e II (camptotecina ou etoposídeo, respectivamente) geram quebras simples ou duplas através do sequestro ou inibição covalente das respectivas topoisomerasas (HENKLER; STOLPMANN & LUCH, 2012).

Ou seja, o sistema de reparo do DNA em um primeiro momento deve estar funcionando de forma adequada, evitando o início da carcinogênese. Num segundo momento, depois de estabelecido o tumor, o mesmo sistema pode interferir na resposta ao tratamento, bem como influenciar no prognóstico do paciente com CCR.

A seguir, será feita uma breve apresentação das vias de acordo com as lesões que processam e seus principais componentes. Os aspectos aprofundados sobre os valores prognósticos e preditivos da modulação das vias de reparo do DNA no CCR serão discutidos no Capítulo II desta tese através de um artigo de revisão publicado no periódico *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (LAPORTE et al., 2018).

1.4.1. Reparo de malpareamento

O sistema MMR (do inglês, *mismatch repair*), reparo de malpareamento ou reparo de emparelhamento errôneo, possui um papel essencial no reparo pós-replicativo de inserções e deleções ou, ainda, durante as incorporações errôneas de nucleotídeos que escaparam da atividade de *proofreading* das polimerases replicativas. O MMR é uma via altamente conservada ao longo da evolução de seres unicelulares 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 CCR hereditário não-polipóide, também conhecido como síndrome de Lynch e outros tumores hereditários e esporádicos (FUKUI, 2010; LI, 2008). 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., 2010).

O MMR 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: (1) reconhecimento da base malpareada, feito pelos heterodímeros de MutS, MutS α (MSH2-MSH6) ou MutS (MSH2-MSH3); MutS α geralmente reconhece emparelhamentos errôneos e deleções/inserções pequenas (até 2 nucleotídeos), enquanto MutS reconhece principalmente defeitos formados por deleções/inserções maiores; (2) excisão da porção da fita contendo o erro (o que gera uma lacuna), a qual é feita pelo heterodímero MutL α (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 (do inglês: Replication Factor A) e Exo1 (exonuclease 1); 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 & YAMANE, 2008). (Figura 13)

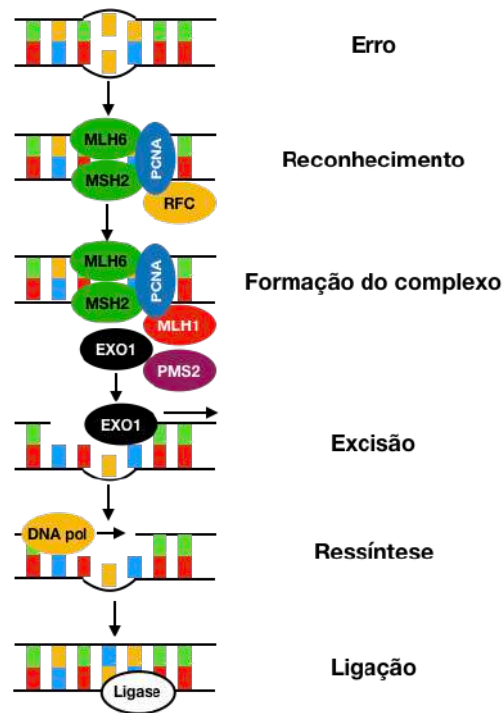


Figura 13. Representação esquemática das proteínas envolvidas em cada fase do processamento de um malpareamento, desde o seu reconhecimento até a religação do fragmento recém-sintetizado à fita original. DNA pol: *DNA polimerase*; EXO1: *Exonuclease 1*; MLH1: *do inglês, MutL homolog 1*; MLH6: *do inglês, MutL homolog 6*; MSH2: *do inglês, MutS homolog 2*; PCNA: *do inglês, proliferating Cell Nuclear Antigen*; PMS2: *do inglês: post meiotic segregation increased 2*; RFC: *do inglês, replication factor C* (Adaptado de HELLEDAY; ESHTAD & NIK-ZAINAL, 2014).

1.4.2. Reparo direto

O reparo direto, por conceito, é uma via que atua estequiometricamente através de uma única enzima e em um único passo ao reconhecer e remover a lesão no DNA. A principal lesão processada por esta via é a alquilação ou metilação de bases (KAINA et al, 2007), sendo processada pela enzima MGMT (do inglês, *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase). MGMT transfere os adutos de metil na posição *O*⁶ das guaninas (MINOO, 2013) para um resíduo de cisteína no seu domínio catalítico, restaurando a base nitrogenada e se auto-inativando para que seja subsequentemente degradada pelo sistema ubiquitina-proteossomo (XU-WELLIVER & PEGG, 2002) (Figura 14).

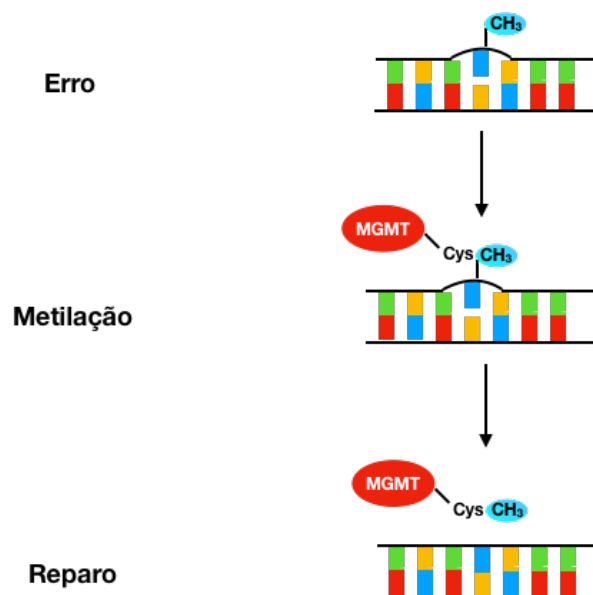


Figura 14. Representação esquemática das proteínas envolvidas em cada fase reparo direto mediado pela MGMT. CH_3 : Metilação; Cys; cisteína; MGMT: do inglês, *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (Adaptado de FU; CALVO & SAMSON, 2012).

1.4.3. Reparo por excisão de bases

O BER (do inglês, *base excision repair*) é uma via que está envolvida predominantemente no reparo de lesões causadas por produtos do metabolismo, principalmente espécies reativas de oxigênio (ERO), assim como reações com moléculas químicas endógenas e agentes exógenos, como agentes alquilantes (HELLEDAY et al., 2008). A principal fonte de danos ao DNA colônico vem do metabolismo oxidativo e da respiração celular, os quais geram produtos que podem atuar tanto na modificação de bases quanto induzindo quebras simples e duplas na cadeia do DNA (SLUPPHAUG; KAVLI & KROKAN, 2003). Sendo assim, a superprodução de ERO combinada com a insuficiência de mecanismos de defesa aos danos oxidativos é um dos maiores contribuintes para a carcinogênese colorretal (PAZ-ELIZUR et al., 2008; TUDEK & SPEINA, 2012).

O BER é iniciado por proteínas da classe das DNA glicosilases (OGG1 (do inglês, *8-Oxoguanine DNA Glycosylase*), MUTYH (do inglês, *mutY DNA glycosylase*), NTH1 (do inglês, *urine homolog of endonuclease III*) e NEIL1 (do inglês, *Endonuclease VIII-like 1*), as quais atuam no reconhecimento de diferentes tipos de lesão ao DNA. As DNA glicosilases podem ser 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 & SCHÄR, 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; GARCIA & HE, 2009). O sítio AP resultante é tanto um produto intermediário como uma potencial lesão altamente prevalente no DNA, produzida por perda espontânea de uma base (HITOMI; IWAI & TAINER, 2007).

Em ambos os casos referidos, os sítios AP serão processados por uma AP endonuclease como a APE1 (do inglês, *apurinic/aprimidinic (AP) endoDNAase*), a segunda enzima na via canônica do BER, o DNA será seccionado por uma endonuclease, como a APE1 (Iyama, 2013). A partir desse ponto o BER pode seguir duas sub-vias, as quais são específicas de acordo com o tipo e a extensão do dano encontrado e das condições celulares no momento, incluindo a capacidade bioenergética: (1) a via curta (SP-BER, do inglês *short-patch BER*), responsável pelo reparo de lesões em apenas uma base; (2) a via longa (LP-

BER, do inglês: *long-patch BER*), que pode remover de duas a doze bases. Durante a via curta, uma DNA polimerase (especialmente a DNA Polimerase B) imediatamente preenche a lacuna com a base correta utilizando a outra fita como molde e este processo finaliza com uma DNA ligase restaurando a integridade da fita. Já na via longa, uma DNA polimerase também irá agir, mas através da síntese de um fragmento de DNA mais longo baseado na fita complementar íntegra, que leva à formação de uma estrutura em *flap* que é processada por uma endonuclease específica (FEN1, do inglês: *flap endonuclease 1*), seguida da ação de uma DNA ligase com a mesma atividade da SP-BER (DIANOV & HÜBSCHER, 2013; PARSONS & DIANOV, 2013).

O BER conta com proteínas secundárias com a função de facilitadoras da via. As mais notáveis são XRCC1 (do inglês, *X-ray repair cross-complementing protein 1*) 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 (CALDECOTT, 2003, 2008). PARP1, por sua vez, é uma proteína nuclear abundante que age como sensor molecular de quebras no DNA (LE PAGE et al., 2003). O PARP-1 catalisa transferência de ADP-ribose às proteínas-alvo, utilizando NAD^+ com a formação concomitante de nicotinamida (BUERKLE, 2010; VIRAG, L., SZABO, 2002). Esta modificação permite o recrutamento de proteínas de reparo, como a própria XRCC1. Ao mesmo tempo, a densa carga negativa de PA resulta na liberação de PARP-1 do DNA, o que permite acesso às proteínas de reparo ao local da lesão. (Figura 15)

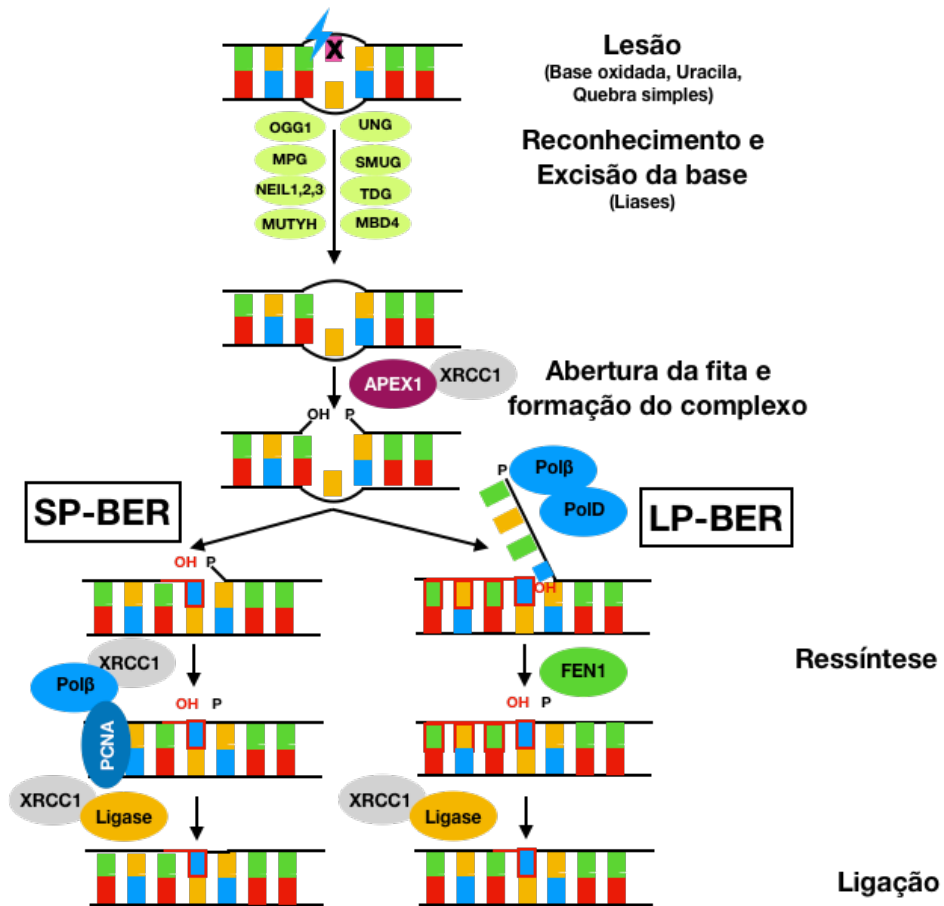


Figura 15. Representação esquemática das proteínas envolvidas em cada fase do BER, desde o seu reconhecimento até a religação do fragmento recém-sintetizado à fita original. APE1: do inglês, *apurinic/aprimidinic (AP) endoDNAase*; FEN1: do inglês, *flap endonuclease 1*; LP-BER: do inglês, *long-patch BER*; MUTYH: do inglês, *mutY DNA glycosylase*; NEIL: do inglês, *Endonuclease VIII-like*; OGG1: do inglês, *8-Oxoguanine DNA Glycosylase*; PCNA: do inglês, *proliferating Cell Nuclear Antigen*; Pol β : *Polimerase beta*; POLD: *Polimerase delta*; SP-BER: do inglês, *short-patch BER*; UNG: do inglês, *uracil-DNA-glicosilase*; XRCC1: do inglês, *X-ray repair cross-complementing protein 1* (Adaptado de HELLEDAY; ESHTAD & NIK-ZAINAL, 2014).

1.4.4. Reparo por excisão de nucleotídeos

O NER (do inglês, *nucleotide excision repair*) é a via responsável por reparar danos que modifiquem a estrutura do DNA de forma significativa, ou seja, promovendo uma distorção tão volumosa 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 (ultravioleta) (CPDs, do inglês, *Pyrimidine dimers 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 nitrosuréis (CURTIN, 2012; SPIVAK & GANESAN, 2014). Exemplos de doenças ligadas diretamente com o NER são o Xeroderma Pigmentoso, a Síndrome de Cockayne e a Tricotiodistrofia (CLEAVER & REVET, 2008; CLEAVER; LAM & REVET, 2009; GREGG; ROBINSON & NIEDERNHOFER, 2011).

O NER possui duas subvias de acordo com a lesão reconhecida: Reparo do Genoma Global (GGR, do inglês: *Global Genome Repair*) e ao Reparo acoplado à Transcrição (TCR, do inglês: *Transcription Coupled Repair*) (CLEAVER; LAM & REVET, 2009; HANAWALT & SPIVAK, 2008; VOLKER et al., 2001). O primeiro, GGR-NER, é aquele restrito ao reparo de lesões em regiões não transcritas do genoma, sendo o reconhecimento feito pelo complexo XPC (do inglês: *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C*), hHR23B e centrin-2. 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 & SPIVAK, 2008; SCHÄRER, 2013).

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 (do inglês, *Transcription Factor II H*), XPA, RPA e XPG/ERCC5 (do inglês, *Excision repair cross-complementing 5*). As proteínas XPB/ERCC3 e XPD/ERCC2 (do inglês: *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group B*) são as helicases que abrirão a dupla hélice do DNA ao redor da lesão (SCHÄRER, 2013).

A próxima etapa consiste na incisão da cadeia através da ação coordenada das endonucleases XPG e XPF-ERCC1 (do inglês: *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group F e G*). Subsequentemente, ocorre o recrutamento das proteínas RFC e PCNA, 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 (HANAWALT & SPIVAK, 2008; MARTEIJN et al., 2014; SCHÄRER, 2013; TSODIKOV et al., 2007). (Figura 16)

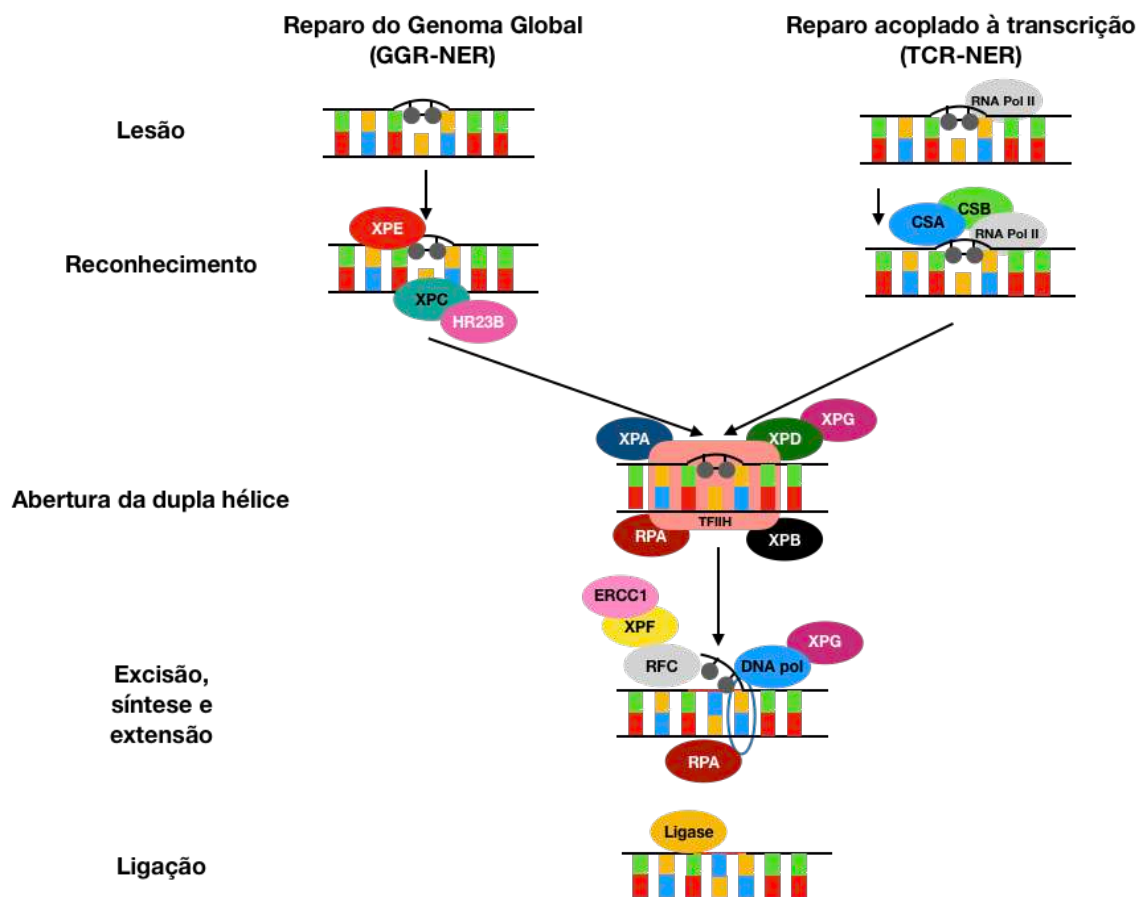


Figura 16. Representação esquemática da via de reparo por excisão de nucleotídeos. A etapa de reconhecimento da lesão é feita por uma das duas vias, GGR-NER ou TCR-NER. Em seguida, estas vias unem-se através de componentes em comum, convergindo para uma única via até o processo final de ressíntese e religação do fragmento processado. CSA: do inglês, *Cockayne Syndrome Complementation Group A*; CSB: do inglês, *Cockayne Syndrome Complementation Group B*; DNA pol: DNA polimerase; RNA pol: RNA polimerase; RFC: do inglês, *replication factor C*; RPA: do inglês, *replication protein A*; XPA: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Group A*; XPD/ERCC3: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group B*; XPC/ERCC1: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C*; XPD/ERCC2: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group D*; XPE: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Group E*; XPF; do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Group F*; XPG: do inglês, *Xeroderma Pigmentosum Group G* (Adaptado de IYAMA & WILSON, 2013)

1.4.5. Reparo de quebras duplas

As quebras duplas (DSB, do inglês: *Double Strand Breaks*) no DNA são uma das formas mais citotóxicas, que ativam respostas de morte celular se não forem reparadas, promovendo instabilidade genômica através da geração de sucessivas translocações e aneuploidias (KREJCI et al., 2012). As DSBs podem surgir endogenamente através da ação do ROS (*do inglês, Reactive Oxygen Species*), produzidos pelo metabolismo celular normal ou devido a falhas de replicação do DNA ou eventos de reparos justapostos. As causas exógenas incluem radiações ionizantes ou agentes quimioterapêuticos (BOHGAKI; BOHGAKI & HAKEM, 2010; HELLEDAY et al., 2008; JACKSON & BARTEK, 2009). As duas vias responsáveis por realizar o reparo das DSBs são a recombinação homóloga (HR) e a junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) (Figura 17).

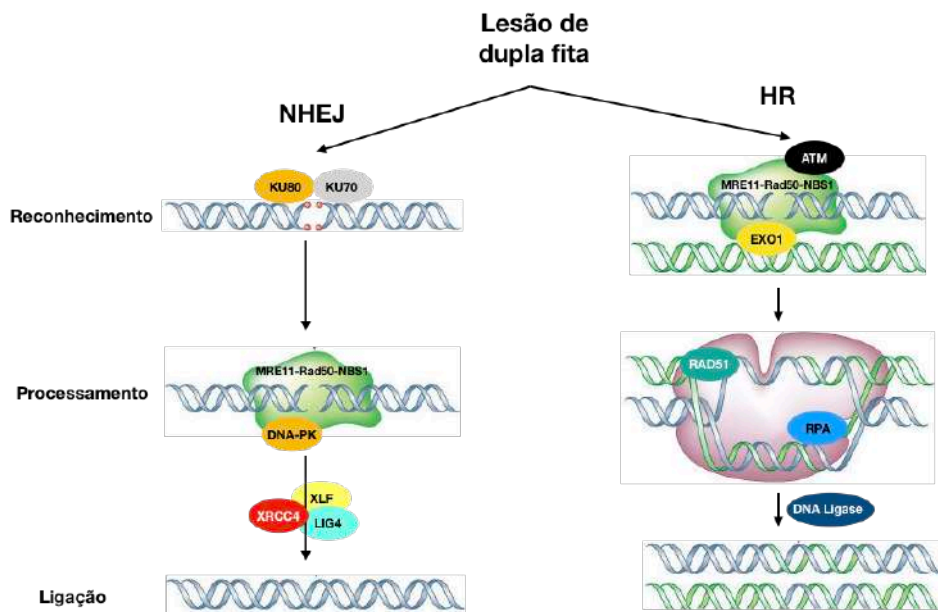


Figura 17. Representação esquemática da via de reparo de quebra dupla, sendo representada as duas vias, a junção de extremidades não homóloga (NHEJ) e a recombinação homóloga (HR). DNA-PK, do inglês, *DNA-dependent protein kinase*; RAD51, do inglês, *RecA-like NTPases*; EXO: exonuclease; RPA: do inglês, *replication protein A*; XLF/XRCC4: do inglês, *X-Ray repair cross complementing protein 4*; LIG: ligase (Adaptado de FRIEDBERG, 2003; PENG, 2011).

A HR atua na divisão de células e na fase S, uma vez que requer uma cromátide homóloga para seu funcionamento, enquanto que o NHEJ pode ter sua função tanto em células em divisão ou não, de forma independente do ciclo celular e também permite erros

(*error prone*) (LORD & ASHWORTH, 2012; PFEIFFER; GOEDECKE & OBE, 2000). Verificou-se que várias doenças derivam de deficiências em HR ou NHEJ, apresentando defeitos neurológicos, imunológicos e de desenvolvimento, bem como a sensibilidade à radiação, envelhecimento prematuro e predisposição ao câncer (D'AMOURS & JACKSON, 2002; DIFILIPPANTONIO et al., 2002; HOEIJMAKERS, 2001; O'DRISCOLL et al., 2004; SHARPLESS et al., 2001).

A HR envolve um cromossomo danificado e uma cópia de DNA íntegro que é utilizado como molde para o reparo do dano (RENKAWITZ; LADEMANN & JENTSCH, 2014). A recombinação homóloga é iniciada através da ligação do complexo de proteínas MRE11-RAD51 (do inglês, *RecA-like NTPases*) - NBS1 (do inglês, Nijmegen Breakage Syndrome 1) (MRN) aos locais de quebra da dupla-fita, o qual funciona para manter as partes que sofreram lesão agrupadas e próximas uma da outra (DE JAGER et al., 2001). Essa situação fornece base estruturada para a nuclease CtIP (do inglês, *carboxy-terminal binding protein* (*CtBP*) - *interacting protein*), constituindo o complexo MRN-CtIP. Esse complexo catalisa a ressecção dos finais das lesões, juntamente com a exonuclease I (EXO1) (LIMBO et al., 2007; SYMINGTON & GAUTIER, 2011).

Em seguida, a Proteína de Replicação A (RPA, do inglês: *Replication Protein A*) se liga à nova região de fita única criada, estabiliza a extremidade 3', e sequencialmente é trocada por um filamento da recombinase RAD51 (DE LAAT et al., 2008; HEYER; EHMSSEN & LIU, 2010). A RAD51 une as extremidades 3' das fitas únicas de DNA, em um processo do qual participam várias proteínas, incluindo RPA, Rad52p e Rad54p (JACKSON et al., 2002). A RAD51 interage com uma molécula de DNA que não sofreu dano, e, quando localiza uma região homóloga, a RAD51 catalisa a troca de fitas (HEYER; EHMSSEN & LIU, 2010). Assim, a molécula que sofreu dano invade a outra fita de DNA, em um *D-loop* (PETUKHOVA; STRATTO & SUNG, 1998). O término 3' da molécula de DNA lesionada é estendido por uma DNA polimerase, que copia informação da fita sem dano, e os finais das fitas são ligados por uma DNA ligase I. Depois de finalizado o processo, os crossovers de DNA são dissociados através de quebra (CHRISTMANN et al., 2003; HABER, 2000; IYAMA & WILSON, 2013).

Algumas alterações nas proteínas da via por HR podem predispor ao surgimento de tumores (KREJCI et al., 2012). Por exemplo, mutações em BRCA2 (do inglês, *breast cancer gene 2*) e RAD51 aumentam a susceptibilidade para câncer de ovário e mama (MEINDL et al., 2010; SCHOENMAKERS; HUYSMANS & VAN DE VEN, 1999). Nesse contexto, a

recombinação homóloga, nesse trabalho é representada por XRCC2 (*do inglês, Excision repair cross-complementing 2*) que repara fragmentações cromossômicas, translocações e deleções. O XRCC2 é parte do complexo proteico Rad21 BCDCX2 que atua na via de HR dependente de BRCA1-BRCA2. Em caso de dano no DNA, o BCDX2 atua a jusante do recrutamento de BRCA2 e a montante do recrutamento de RAD51. O BCDX2 liga-se predominantemente à intersecção dos quatro braços *duplex* da junção *Holliday* e à junção dos garfos de replicação (CHUN; KOK & JIN, 2013; HILBERS et al., 2016; KURUMIZAKA et al., 2002; MASSON et al., 2001) (Figura 18).

A NHEJ, por sua vez, liga as duas extremidades de uma DSB sem buscar homologia com sequências conservadas de DNA. Como consequência, este processo pode causar deleções ou mutações no local ou ao redor da DSB (LORD & ASHWORTH, 2012). Na primeira etapa da via NHEJ, as proteínas Ku70 e XRCC5/Ku80 reconhecem e protegem a fita contendo o dano (CHRISTMANN et al., 2003). Após ocorre, o recrutamento e a associação da subunidade catalítica da DNA-PK (*do inglês, DNA dependent protein kinase*) com o complexo de XRCC4 (*do inglês, X-Ray repair cross complementing 4*) e LIG4 (*do inglês, DNA ligase IV*) (DYNAN & YOO, 1998). A ligação das duas extremidades através de XRCC4/LIG4 ocorre após as DSBs terem sido processadas pelo complexo MRE11-Rad50-NBS1, que remove o excesso de *flaps* em 5' e 3' (STRACKER et al., 2004). Em adição, a obtenção da atividade exonuclease específica de cadeia simples pela DNA-PK, ocorre pela união com a proteína Artemis. Através deste complexo, Artemis é fosforilada e passa a atuar como uma endonuclease (MOSHOUS et al., 2001). Para completar o processo, a síntese do DNA é realizada até preencher as lacunas e a junção final é realizada por XRCC4-LIG4 em colaboração com XLF (IYAMA & WILSON, 2013). O XRCC5 representa, neste trabalho, o NHEJ. A proteína codificada por este gene é conhecida como DNA helicase II dependente de ATP ou proteína de reparo do DNA denominada XRCC5 ou Ku80. Ela é um componente de ligação do DNA da proteína quinase dependente de DNA, e funciona em conjunto com o complexo DNA ligase IV-XRCC4 no reparo de quebra de fita dupla de DNA por junção de extremidade não homólogas e a conclusão da recombinação V (D) J ou recombinação somática (MORCHIKH et al., 2017; ROBERTS et al., 2010; TUTEJA et al., 1994; WILLIS et al., 2002) (Figura 18).

1.4.6. Síntese translesão

O DNA deve ser replicado com precisão e geralmente isto ocorre com baixas taxas de erros (menos de uma base a cada 10^{10}) graças à fidelidade extraordinária das DNA polimerases (Pol) replicativas e da habilidade do reparo de malpareamento. Todavia, a atividade exonuclease das DNA polimerases leva à parada da replicação, deixando a forquilha de replicação exposta e vulnerável. Esta vulnerabilidade se traduz em quebras no DNA e até em um colapso total do complexo que podem ocorrer durante o processo de reparo de lesões. Para evitar este acontecimento tão trágico para a célula, a tolerância ao dano ao DNA é uma alternativa menos custosa em termos de viabilidade celular e integridade do material genético. Ou seja, a replicação do DNA segue através do dano, restaurando a quebra dupla sem tentar fazer a excisão da base danificada. A execução deste mecanismo pode ser feita através da combinação de vários mecanismos de reparo do DNA ou diretamente através da Síntese Translesão (TLS, do inglês: *Translesion Synthesis*) (HOFFMANN & CAZAUX, 2010) (Figura 19).

A TLS é um mecanismo que depende de DNA polimerases especializadas, as quais possuem sítios ativos capazes de acomodar o dano ou partes do DNA com distorções. Obviamente, a forma como executam a replicação do DNA traz consigo um risco muito maior de causar mutações, uma vez que as adaptações estruturais vão permitir em menor fidelidade a manutenção do DNA enquanto ele é copiado. Assim, as DNA polimerases translesão são consideradas parte da resposta ao dano do DNA mas não enzimas de reparo do DNA, pois permitem que o DNA continue a ser replicado na presença de lesões de DNA que, de outra forma, bloqueariam o processo. Sem a tolerância a danos ao DNA, a célula sofre risco de colapso na forquilha de replicação, translocações, aberrações cromossômicas e morte celular (WATERS et al., 2009). Este processo é considerado *error-prone*, ou seja, sujeito a erros, já que as polimerases de menor fidelidade podem incorporar nucleotídeos errados ao DNA, podendo causar alterações na sequência de DNA que podem levar a mutações (HOFFMANN & CAZAUX, 2010).

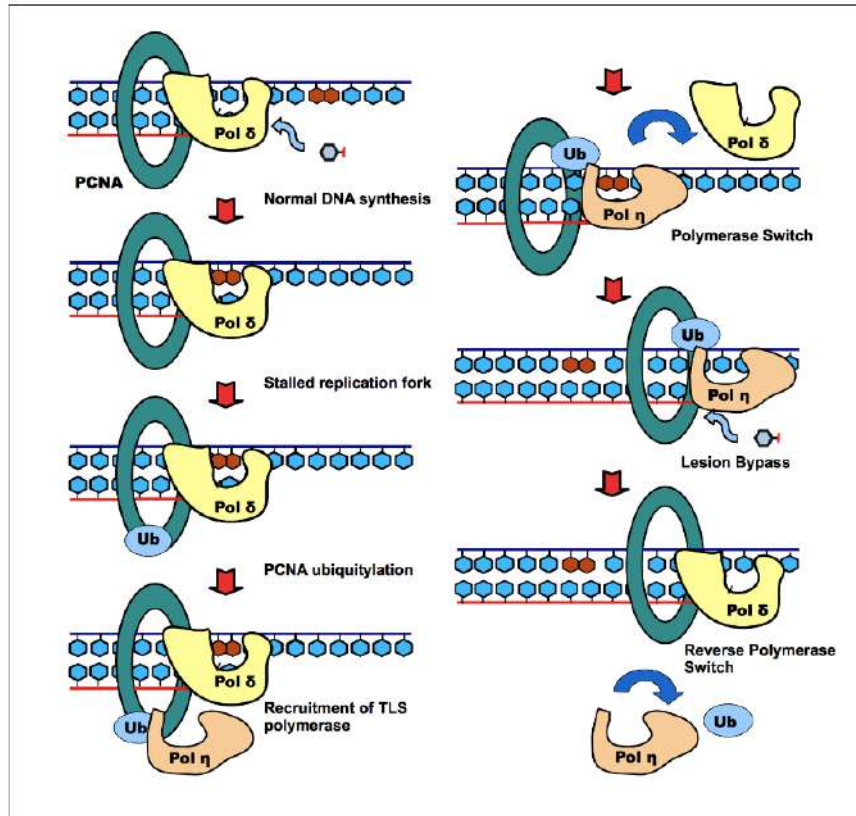


Figura 19. Esquema ilustrativo de Síntese Translesão com a DNA Polimerase η . Adaptado de *Molecular Mechanism of DNA Translesion Synthesis*. (Disponível em: <http://sites.udel.edu/zhuanggroup/molecular-mechanism-of-dna-translesion-synthesis/>. Acesso em: 02/01/2019).

Até o momento, dezoito DNA polimerases foram identificadas, algumas delas funcionam na replicação do DNA genômico, mas a maioria atua no reparo do DNA e na TLS (Tabela 7) (ZAFAR & EOFF, 2017). Classicamente, as DNA polimerases atuam em BER, NER, HR e NHEJ, realizando a síntese da nova fita ou ligando quebras do DNA (LANGE; TAKATA & WOOD, 2011). Dentre as DNA polimerases, existem as polimerases replicativas e as especializadas, as quais podem realizar a síntese mesmo na presença de danos ao DNA. Assim, enquanto as DNA polimerases replicativas têm especificidade para bases normais do DNA, mas pouca capacidade de replicação diante do dano, as DNA polimerases TLS fazem o *by-pass* destas lesões, garantindo a continuidade do processo replicativo (ZAFAR & EOFF, 2017).

Tabela 7. Descrição das Polimerases, discriminando a família, nome de gene, nome da polimerase (Pol), função molecular e sua implicância no câncer em relação a sua expressão.

Família	Gene	Pol	Função	Papel no câncer	Referências
A	POLG	Pol γ (gamma)	Replicação DNA Mitochondrial		(ZAFAR & EOFF, 2017)
	POLQ	Pol θ (theta)	BER, TLS de danos exógenos	hiperexpressão no câncer de mama, colorretal e NSCLC (do inglês, <i>Non Small Cell Lung Cancer</i>) indicador de mau prognóstico no câncer de mama	(HIGGINS et al., 2010; KAWAMURA et al., 2004; LEMEE et al., 2010; PILLAIRE et al., 2010) (LEMEE et al., 2010)
	POLN	Pol ν (nu)	NHEJ		(ZAFAR & EOFF, 2017)
	POLA	Pol α (alfa)			(ZAFAR & EOFF, 2017)
B	POLD	Pol δ (delta)	Replicação DNA Nuclear		(ZAFAR & EOFF, 2017)
	POLE	Pol ϵ (épsilon)		relacionado a instabilidade microsatélite no CCR	(LEMEE et al., 2010)
	REV3	Pol ζ (zeta)	TLS	expressão diminuída no câncer de pulmão, estômago e colorretal promove resistência intrínseca e adquirida a derivados de platina e ciclofosfamida	(SONODA et al., 2003) (XIE et al., 2010; XU et al., 2013)
	POLB	Pol β (beta)	BER	expressão elevada no câncer gástrico, ovariano, próstata, tireóide e uterino mutantes ou variantes de emenda expressas em aproximadamente metade de todos os cânceres	(ALBERTELLA et al., 2005) (DONIGAN et al., 2012)
X	POLL	Pol λ (lambda)	BER, NHEJ	expressão elevada no câncer de próstata e uterino expressão correlaciona-se com a quantidade de tabagismo expressão diminuída em câncer de pulmão de estágio avançado de fumantes	(ALBERTELLA et al., 2005) (OHBA et al., 2009) (OHBA et al., 2009)
	DNTT	TdT	NHEJ		(ZAFAR & EOFF, 2017)
	POLM	Pol μ (mu)	NHEJ		(ZAFAR & EOFF, 2017)
Y	POLH	Pol η (eta)	TLS, replicação de sítios frágeis	perda de pol η (em XPV) predispõe-se para o câncer de pele induzido pela luz solar expressão elevada no câncer ovariano e HNSCC (do inglês, <i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>) expressão predispõe a resposta a platina no NSCLC, câncer gástrico metastático e HNSCC células deficientes de pol η são sensíveis a doxorubicina	(SRIVASTAVA et al., 2015; ZHOU et al., 2013) (SRIVASTAVA et al., 2015; ZHOU et al., 2013) (CEPPI et al., 2009; TENG et al., 2010; ZHOU et al., 2013) (MORAES et al., 2012)
	POLI	Pol ι (iota)	TLS	expressão aumentada no glioblastoma expressão aumentada em cultura de células de câncer de mama	(WANG et al., 2004) (LEMEE et al., 2010; YANG et al., 2004)
	POLK	Pol κ (kappa)	TLS	nível reduzido de transcrições em tumores colorretais humanos expressão aumentada no câncer de pulmão promove a resistência a agentes prejudiciais ao DNA	(LEMÉE et al., 2007) (O-WANG et al., 2001; WANG et al., 2004)
AEP	PRIMPOL	PrimPol		promove a resistência adquirida a ciclofosfamida e ao DNA induzido por platina, por meio do aumento da mutagênese mutações <i>missense</i> embrionárias associadas a um risco aumentado de câncer cervical	(LIN et al., 2006; OKUDA, 2005; WU et al., 2004; XIE et al., 2010; XU et al., 2013) (HE et al., 2008)
	HIV-1 RT	HIV-1 RT			(ZAFAR & EOFF, 2017)
RT	TERT	TERT (telomerase)			(ZAFAR & EOFF, 2017)

Assim, são DNA polimerases translesão: Pol η (*POLH*), Pol κ (*POLK*), Pol ι (*POLI*) e *REV1* (do inglês, *Protein reversionless 3*) (da família Y), Pol ζ (*REV3*) (da família B) e Pol θ (*POLQ*) e Pol ν (*POLN*). Nenhuma delas possui atividade *proofreading* ou exonuclease. Portanto, são caracterizadas por sua baixa eficiência, baixa precisão e baixa processividade (YANG et al., 2018). Além de precisões diferentes, que estão inversamente relacionadas às taxas de erro (WU & WANG, 2017), as polimerases replicativas e translesão não são fundamentalmente diferentes (LEE et al., 2015; WANG; BROYDE & ZHANG, 2009).

1.4.6.1. Polimerases translesão e o câncer

A ligação entre TLS e a carcinogênese foi originalmente identificada através do estudo de POLH e pol η (MASUTANI et al., 1999). No entanto, a implicação clínica da TLS na carcinogênese começou a ser mais estudada em 2005, o qual foi verificado que a alteração de diversas DNA polimerases estavam alteradas em uma variedade de tumores em relação ao tecido normal, destacando-se as DNA polimerases β e λ , as quais estavam sendo superexpressas em mais de 30% dos espécimes tumorais de tumores cutâneos (ALBERTELLA et al., 2005). Além disso, também foi identificada uma relação na baixa expressão da pol λ em pacientes tabagistas em estágio IV de câncer de pulmão (OHBA et al., 2009). Adicionalmente, foi verificado que agentes exógenos, como radiação ultravioleta, agentes alquilantes e carcinógenos podem alterar a expressão de Pol η , Pol ι , Pol κ e Pol ζ (ZHU & ZHANG, 2003; ZHU et al., 2010, 2012). Desse modo, a relação das polimerases translesão e a carcinogênese estão sendo cada vez mais estudada, inclusive buscando o desenvolvimento de fármacos que possam interagir com elas (DOLES et al., 2010; XIE et al., 2010; XU et al., 2013).

Os derivados de platina (cisplatina, oxaliplatina) levam à morte de células que se dividem rapidamente através da geração de *crosslinks* entre purinas adjacentes, bloqueando as polimerases replicativas (DASARI & TCHOUNWOU, 2014). Duas purinas ligadas entre si pela platina se assemelham a um dímero de timina, e a Pol η é capaz de parear guaninas de forma eficiente (MASUTANI et al., 2000; ZHAO et al., 2012). O *bypass* total de um *crosslink* com cisplatina, no entanto, exige que Pol ζ estenda o iniciador além do local danificado (SHACHAR et al., 2009), tendo sua expressão reduzida implicada no CCR (PAN et al., 2005). Pacientes submetidos a quimioterapias com derivados de platina podem desenvolver uma elevada expressão de Pol η e quimiorresistência (CEPPI et al., 2009; MORAES et al., 2012; TENG et al., 2010; ZHOU et al., 2013). De fato, verificou-se que as taxas de sobrevida em pacientes com câncer de pulmão não-pequenas células, adenocarcinoma gástrico metastático, ovariano e com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço estão inversamente correlacionadas com os níveis de expressão de Pol η . A inibição direta de Pol η , portanto, poderia aumentar a eficácia do tratamento com platina (DASARI & TCHOUNWOU, 2014; SRIVASTAVA et al., 2015; ZHOU et al., 2013).

O gene POLH fornece instruções para fazer uma proteína chamada DNA polimerase *eta* (η), sendo membro da família do tipo Y. A principal função da Pol η é replicar o DNA que foi danificado, particularmente pelos raios ultravioleta (UV) da luz solar (ZAFAR & EOFF, 2017). A expressão de pol η foi relatada como reduzida nos CCR, pulmonar e gástrico, mas elevada em aproximadamente dois terços dos tumores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (PAN et al., 2005; ZHOU et al., 2013). Estudos para determinar seu papel preditivo foram conduzidos em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, adenocarcinomas de pulmão e gástrico tratados com cisplatina (CEPPI et al., 2009; TENG et al., 2010; ZHOU et al., 2013). No ovário, a pol η não apenas facilita a resistência à cisplatina em células de câncer ovariano, mas que a enzima serve para manter as células tumorais semelhantes a população *stem-like* (SRIVASTAVA et al., 2015).

A Pol κ , da Família Y, ignora especialmente os adutos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tais como de benzopireno (RECHKOBLIT et al., 2002; SUZUKI et al., 2002), parecendo possuir função no passo de síntese em NER (BÉTOUS et al., 2009). Embora incapaz de acomodar ou ignorar lesões UV, Pol κ é reconhecido como facilitador da síntese de reparo após a excisão de dano UV (STARCEVIC; DALAL & SWEASY, 2004). No CCR, foram observados níveis baixos de Pol κ no tecido tumoral (LEMÉE et al., 2007). Pol κ também foi implicada no *by-pass* de bases alquiladas e sítios abásicos, além de ser implicada na extensão de malpareamentos e pequenas lesões ao DNA (LUPARI et al., 2012).

A Pol θ está envolvida na síntese translesão e no reparo de quebra dupla por lesões de radiação ionizante. Ela ainda está envolvida no BER, possuindo a habilidade de processar sítios abásicos inserindo um resíduo de adenina, assim possuindo uma alta capacidade de estender a polimerização a partir deste resíduo, por possuir atividade de 5'-deoxiribose-fosfato-liase (dRp-liase) (YOUSEFZADEH & WOOD, 2014). Ela tem sido implicada como um indicador de mau prognóstico e menor sobrevida em pacientes com expressão elevada nos tumores de mama, colorretal e carcinoma não pequenas células de pulmão (ALLERAMOREAU et al., 2012; LEMEE et al., 2010). Em pacientes de CCR, a superexpressão de POLQ foi correlacionada com pior tempo de sobrevida (PILLAIRE et al., 2010).

1.4.7. Reparo de *crosslinks*

As ligações intercadeias ou *crosslinks* do DNA (ICL, do inglês: *Interstrand Crosslinks*) são lesões que bloqueiam processos celulares essenciais, como a transcrição e a replicação (NOLL; MASON & MILLER, 2006). Estas lesões são a base da toxicidade de muitos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer, assim como também podem ser originadas de lesões endógenas e ambientais (GRILLARI; KATINGER & VOGLAUER, 2007; SCHÄRER, 2005). Nas células neoplásicas, o reparo de ICL é um mecanismo indesejável pelo qual os tumores podem adquirir resistência a quimioterápicos (MCHUGH; SPANSWICK & HARTLEY, 2001), enquanto que em células normais, as vias de reparo protegem a célula das consequências deletérias de lesões ao DNA (SMEATON et al., 2009).

O reparo de ICL em células de mamíferos é bastante complexo, e muitas vias de reparo estão atuantes, incluindo NER (BESSHO; MU & SANCAR, 1997; THOMA et al., 2005; WANG et al., 2001; ZHENG et al., 2003), HR (DE SILVA et al., 2000; LIU et al., 2008; SAFFRAN et al., 2004) e MMR (WU et al., 2005; ZHANG et al., 2002; ZHAO et al., 2009). Estas vias utilizadas para reparar ICL podem depender da fase do ciclo celular e há evidências de que existem vias independentes da recombinação homóloga que utilizam o by-pass da lesão para realizar o reparo (RICHARDS et al., 2005; WANG et al., 2001; WU et al., 2005; ZHANG et al., 2002; ZHENG et al., 2003).

As exonucleases de DNA com sentido 5'-3' possuem um papel importante na manutenção da estabilidade genômica, clivando as quebras duplas do DNA objetivando o reparo e o processamento de intermediários gerados durante o MMR e o NHEJ (JIRICNY, 2013; LEE et al., 2013; SYMINGTON & GAUTIER, 2011). As principais exonucleases humanas conhecidas são a DCLRE1A (do inglês, *DNA cross-link repair 1A protein*), que possui um papel importante no reparo de *crosslinks* (DRONKERT et al., 2002; WANG et al., 2011); a DCLRE1B (do inglês, *DNA cross-link repair 1B protein*), que é uma enzima do reparo do DNA que desempenha um importante papel de manutenção dos telômeros (DEMUTH; DIGWEED & CONCANNON, 2004; FREIBAUM & COUNTER, 2006; LENAIN et al., 2006; VAN OVERBEEK & DE LANGE, 2006); e DCLRE1C (do inglês, *DNA cross-link repair 1C protein*), que possui uma fraca atividade de exonuclease, mas também atua como uma endonuclease, processando os intermediários durante a recombinação V (D) J (LIEBER et al., 2004; MOSHOUS et al., 2001; PANNICKE et al., 2004).

A DCLRE1A, também conhecida como SNM1A (do inglês, sensitive to nitrogen mustard 1A) localiza lugares de quebra dupla e tem um papel de mediador da fase G1 do ciclo celular, sendo a enzima ATM essencial para a regulação dos processos de controle da divisão celular e na reparação dos danos sofridos pelo DNA e a DCLRE1A funcionando como substrato para esta (YAN et al., 2010). Também tem outra função durante a mitose, participando de um ponto de controle mitótico precoce da prófase, com uma função de reparo a danos celulares e outros a serem esclarecidos (SCOLNICK & HALAZONETIS, 2000).

A DCLRE1B, também denominada SNM1B (do inglês, sensitive to nitrogen mustard 1B) ou Apollo, participam do garfo de replicação dos *crosslinks*, atuando no reparo de DNA, interagindo com os complexos proteicos como o MUS81-EME1, o complexo MRE11-RAD50-NBS1 e FANCD2 (ANDERS et al., 2009; WHITBY; OSMAN & DIXON, 2003).

A DCLRE1C, também conhecida como SNM1C (do inglês, sensitive to nitrogen mustard 1C) ou Artemis, é uma proteína multifuncional cuja atividade de nuclease é regulada por subunidades catalíticas de proteína quinase dependentes do DNA durante a recombinação V (D) J e a NHEJ. Sua deficiência, resulta na Síndrome da Imunodeficiência Combinada Severa (RS-SCUD) por um defeito na recombinação V(D)J (POINSIGNON et al., 2004).

A família DCLRE tem um papel claro na manutenção da integridade genômica e na supressão da carcinogênese. Todos os três genes, expressos por suas proteínas, demonstraram ter vários papéis no reparo direto do dano do DNA e foram implicados no controle de *checkpoint* do ciclo celular diante de diferentes formas de danos ao DNA. A DCLRE1A e DCLRE1C são substratos de proteínas-quinases do *checkpoint*, e ambas demonstraram atuar como supressores tumorais em modelos de ratos. (BRANDES et al., 2005; HOMMA & HOMMA, 2005; MARIATOS et al., 2003; PRIVETTE et al., 2007; SCOLNICK & HALAZONETIS, 2000; TURNER et al., 2005). Polimorfismos no gene *DCLRE1A* foram associados ao câncer de pulmão de pequenas células (KOHNO et al., 2006). *DCLRE1B* desempenha um papel na proteção dos telômeros, e uma baixa expressão deste gene provoca níveis altamente elevados de fusões cromossômicas, resultando em instabilidade cromossômica. Enquanto o genótipo nulo resulta em letalidade embrionária em ratos, mutações mais sutis podem levar ao câncer em seres humanos. A DCLRE1C demonstrou ser um regulador negativo da p53 e, além de seu papel na ubiquitinação de proteínas, sugerem que, paradoxalmente, poderia ser um alvo para a quimioterapia do câncer. Na verdade, a DCLRE1C pode atuar como um supressor de tumor e um oncogene, uma vez

que, na sua ausência, ocorrerá instabilidade genômica, enquanto sua superexpressão pode inibir a atividade de p53 e desregular outros reguladores do ciclo celular (YAN et al., 2010).

1.4.8. Importância do reparo do DNA no CCR (Hipótese do trabalho)

Até o momento, o estadiamento TNM é considerado a principal variável prognóstica e o principal determinante do tratamento do CCR. No entanto, com os novos estudos, cada vez mais, uma série de fatores independentes clinicopatológicos estão sendo considerados para definição do tratamento de pacientes com tumores estágio II e III que podem estar sendo sub-tratados ou super-tratados (BENSON et al., 2013, 2004a; FIGUEREDO; MUKHERJEE & ZBUK, 2008; HOFF et al., 2001; O'CONNELL et al., 2008; QUAH et al., 2008; QUASAR COLLABORATIVE GROUP, 2007; SCHRAG et al., 2002). 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 certas (MEIRELLES, 2016).

O uso de marcadores moleculares que melhorem o prognóstico e que sirvam de marcadores preditivos no tratamento tem sido aplicado em uma ampla variedade de afecções oncológicas (DIETEL et al., 2015). Dentro deste contexto, no CCR, o MSI e o status de mutação no KRAS, NRAS e BRAF foram propostos como potenciais fatores prognósticos (NCCN - COLON CANCER, 2018; POPAT; HUBNER & HOULSTON, 2005; ROTH et al., 2010).

Sabe-se que o desequilíbrio entre os mecanismos de dano (aspectos fisiológicos e ação de fatores etiológicos) e reparo do DNA podem estar implicados na instabilidade genômica, levando a alterações moleculares desencadeando uma alteração estrutural histológica. Esta alteração histológica, por sua vez, traduz-se em aspectos clinicopatológicos que resultam nos resultados prognósticos, resposta ao tratamento e de sobrevida. Devido a parte molecular ser o cerne do problema do CCR e outros tumores, ainda deve ser melhor estudada, pois a conduta terapêutica atual ainda se respalda basicamente no estadiamento patológico da doença. 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 personalizadas e na melhora da sobrevida.

Portanto, uma vez que o tecido intestinal apresenta uma taxa de replicação elevada e está sujeito a diversas injúrias causadas por agentes endógenos e exógenos, é totalmente plausível que os componentes do sistema de reparo do DNA estejam alterados. Mais do que

isto, eles podem modular os graus de agressividade tumoral e determinar a sobrevida dos pacientes com CCR.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo geral

Avaliar a participação dos componentes das vias de reparo quebra dupla do DNA (*XRCC2* da HR – Recombinação Homóloga e *XRCC5* do NHEJ - união de extremidade não-homóloga), síntese translesão (*POLH*, *POLK* e *POLQ*) e ligação intercadeia (*DCLRE1A*) em relação a dados clinicopatológicos, sobrevida livre de doença e sobrevida geral de um grupo de pacientes intervistos cirurgicamente por câncer colorretal.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a expressão gênica entre tecido normal e tumoral de *POLH*, *POLK*, *POLQ*, *XRCC2*, *XRCC5* e *DCLRE1A*;
- Analisar a influência da expressão gênica de *POLH*, *POLQ*, *POLK*, *XRCC2*, *XRCC5* e *DCLRE1A* em relação a dados clinicopatológicos, sobrevida livre de doença e sobrevida geral;
- Analisar a influência do padrão de metilação do promotor de *POLH*, *POLK*, *XRCC5* e *DCLRE1A* em relação a dados clinicopatológicos, sobrevida livre de doença e sobrevida geral;
- Analisar a influência da expressão proteica através da imuno-histoquímica de *POLK* e *XRCC5*/Ku80 em relação a dados clinicopatológicos, sobrevida livre de doença e sobrevida geral;
- Analisar a influência da imuno-histoquímica de *MLH1*, *MSH2*, *p53* e *Ki67* em relação a dados clinicopatológicos, sobrevida livre de doença e sobrevida geral;
- Analisar a influência da mutação de *BRAF*^{V600E} em relação a dados clinicopatológicos, sobrevida livre de doença e sobrevida geral;

- Analisar a correlação da expressão protéica de MLH1, MSH2, p53 e Ki67 em relação a expressão gênica de *POLH*, *POLQ*, *POLK*, *XRCC2*, *XRCC5* e *DCLRE1A*, padrões de metilação do promotor de *POLH*, *POLK*, *XRCC5* e *DCLRE1A* e a expressão proteica de *POLK* e *XRCC5/Ku80*;
- Propor um diagrama de influência molecular em relação a dados clinicopatológicos e de sobrevida dos pacientes com CCR esporádico.

3.1. CAPÍTULO I

ARTIGO:

Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer

publicado na Critical Reviews in Oncology/Hematology 126:168–185, 2018

DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.03.017

Impact factor: 4,495

Qualis A1



Contents lists available at ScienceDirect

Critical Reviews in Oncology / Hematology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/critrevonc

Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer

Gustavo A. Laporte^a, Natalia M. Leguisamo^{b,c}, Antonio N. Kalil^{a,1}, Jenifer Saffi^{c,*}^a *Surgical Oncology Service, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA), Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*^b *Institute of Cardiology/University Foundation of Cardiology, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*^c *Laboratory of Genetic Toxicology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

ARTICLE INFO

Keywords:

Colorectal cancer
DNA repair
Epigenetics
Biomarkers
Prognostic factor
Predictive factor
Survival

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third major cause of cancer-related deaths worldwide. However, despite the scientific efforts to provide a molecular classification to improve CRC clinical practice management, prognosis and therapeutic decision are still strongly dependent on the TNM staging system. Mismatch repair system deficiencies can occur in many organs, but it is mainly a hallmark of CRC influencing clinical outcomes and response to therapy. This review will discuss the effect of the modulation of other DNA repair pathways (direct, excision and double strand break repairs) in the clinical and pathological aspects of colorectal cancer and its potential as prognostic and predictive biomarkers.

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third major cause of cancer-related deaths worldwide. Every year, almost 1,000,000 new cases of CRC are diagnosed and 700,000 deaths from CRC are registered (Frederiksen et al., 2010; Siegel et al., 2017). The overall survival rate of patients with CRC is highly dependent on the disease stage at the time of diagnosis (Siegel et al., 2017). CRC is a multifactorial disease which occurs due to sequential and cumulative genetics and epigenetic alterations, including tumor suppressors, cell cycle regulators' genes and DNA mismatch repair (MMR) pathway in the colon mucosa cells (Migliore et al., 2011). It is well accepted that the molecular progression of CRC follows the classical model of adenoma-carcinoma sequence or vogelgram (Fearon and Vogelstein, 1990; Vogelstein et al., 1988). However, there is a growing body of evidences implicating other cellular and molecular alterations and their impact in CRC development and levels of aggressiveness.

Early CRC detection is still the most effective approach against this disease (NCCN, 2017). CRC staging basically relies on the use of tumor-node-metastasis (TNM) system and does not analyze any molecular aspects of the tumor as a routine (Galon, 2006; Kawakami et al., 2015). The current TNM staging system is inadequate and obsolete to be considered the only tool for therapeutic decisions, CRC recurrence and survival prediction after resection for stage II and III patients. It results in insufficient treatment of stage II CRC with 25% of disease recurrence, fast progression with metastasis and resistance to chemotherapy (Biagi

et al., 2011; O'Connell et al., 2008) and excessive treatment of stage III CRC patients with 50% of disease recurrence (Bramsen et al., 2017; Tsikitis et al., 2014). Thus, biomarkers are indispensable for TNM refinement and accuracy, but due to tumor heterogeneity, it is still a challenge to find a unique molecular classification system with prognostic and predictive value.

Currently, to refine TNM prognostic accuracy, carcinoembryonic antigen (CEA) is recommended as a biomarker to detect the presence of metastasis and to follow up CRC patients. However, the use of CEA in early CRC diagnosis or recurrence still presents major limitations in terms of sensitivity (from 41% to 97%) and specificity (from 52% to 100%) (Dbouk et al., 2007; Duffy, 2001; Nicholson et al., 2015). So far, the combined use of TNM and CEA for the identification of patients who are at risk of developing distant metastases has not been recognized as being effective (Donizetti Silva et al., 2013).

As CRC has been defined as a complex and a heterogeneous disease, especially regarding outcomes and drug responsiveness, it is not surprising that it can be classified into various gene expression-based subtypes, which are also categorized by their specific molecular (including microsatellite instability (MSI) or chromosomal instability (CIN) and pathological profiles in colorectal molecular subtypes (CMS) (Guinney et al., 2015; Muller et al., 2016). Subtype CMS1 and CMS4 have worse prognosis (Guinney et al., 2015).

Mismatch repair system deficiencies can occur in many organs, but it is mainly a hallmark of hereditary CRC. Around only 15% of sporadic CRC present MSI as a direct consequence of defective MMR (dMMR)

* Corresponding author.

E-mail address: jenifers@ufcspa.edu.br (J. Saffi).¹ These authors shared senior authorship.<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.03.017>Received 24 September 2017; Received in revised form 5 March 2018; Accepted 22 March 2018
1040-8428/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

(mainly due to epigenetic silencing of MLH1, MSH2, PMS1 and/or PMS2 promoters), which is associated with a better overall survival rate and response to 5-fluoracil (5-FU)-based therapies (Sinicrope et al., 2011). In this context, the classical relevance of DNA repair system in sporadic CRC as a prognostic and predictive tool relies on the investigation of MSI presence in the tumor specimens. Therefore, considering this and the extensive participation of DNA repair modulation in virtually all the types of cancer, over the last decade other DNA repair pathways have been studied in the light of its predictive and prognostic values for colorectal cancer. Here we review the studies comprising the associations between gene and protein expression of the main components of direct, excision (base and nucleotide) and double strand break repair pathways and clinicopathological features, response to chemotherapy and survival in CRC.

2. Biological importance of DNA repair mechanisms in CRC

It is estimated that human cells suffer over 2×10^4 DNA damaging events every day, which are normally repaired by specific DNA repair pathways that assure the genomic integrity (Lindahl and Wood, 1999). The components of DNA repair system can be didactically classified into direct (which requires one protein/enzyme that act in one single step) and indirect repair (which requires several proteins/enzymes that act in several steps, including lesion recognition and strand excision, polymerization and ligation). Direct repair (DR) repairs DNA methylations; Base excision repair (BER) pathway is responsible for repairing oxidized bases and single-strand breaks (SSBs); Nucleotide excision repair (NER) pathway corrects pyrimidine dimers and bulky helix disorders; DNA double strand breaks (DSBs) are processed by homologous recombination (HR) and-homologous end joining (NHEJ) pathways.

Defective DNA repair is a common hallmark of cancer. DNA repair genes are frequently mutated in cancer, yet limited studies have proven their indispensable role in the disease prognosis and response to chemo- and radiotherapy. Hence, the biological significance of DNA repair mechanisms is supported by the fact that the deregulation of such system may contribute both to the initiation and progression of cancer. In addition, by repairing the damage caused by chemo- and radiotherapy to the DNA molecule of the cancer cell, the DNA repair systems may implicate in resistance to treatments. Therefore, the efficacy of cancer treatments - which rely on structural and metabolic dysfunction of DNA to induce the death of neoplastic cells - may be severely compromised, culminating in poor clinical outcomes. Consequently, there is still a search for new therapeutic approaches based on the principle of using internal deficiencies in DNA repair mechanisms, in favor of increasing the cellular sensitivity to agents that cause this sort of lesions. Thus, the ability of neoplastic cells or even neoplastic stem cells to recognize and initiate DNA repair is possibly the key mechanism for overcoming the therapeutic resistance and recurrence of cancer (Torgovnick and Schumacher, 2015).

In CRC, the classic relevance of DNA repair pathways can be attributed to the mismatch repair pathway, since germline deleterious mutations in this pathway genes are responsible for the hereditary version of colorectal neoplasms occurrence and confer a 70% lifetime risk of CRC development and an increased risk of developing other cancers (Sehgal et al., 2014). However, in sporadic CRC, the MMR deficiency results from the loss of expression of at least one out of four of its main components, mainly MLH1 and/or MSH2 by epigenetic mechanisms and leads to MSI in 15% of the cases (Sargent et al., 2010). In addition, also considering the context of DNA repair and damage, the gastrointestinal tract is a main target for oxidizing elements, which are highly mutagenic (Aran et al., 2016; Obtulowicz et al., 2010). These factors are responsible for increasing the susceptibility of colonic epithelium to mutations due to base oxidation, mispairings and strand breaks, which can lead to loss of genomic integrity and colorectal carcinogenesis. Since MMR system is involved in post-replicative damage recognition and signaling, inactivity of this pathway may be one

suitable explanation for the process of malign transformation preferably affecting proliferating cells, such as colon epithelial tissues (Fearon, 2011).

However, the relationship between DNA damage and its repair is far more complex than its own concept, since no single pathway can repair all types of injury efficiently. Some lesions are substrate for more than one pathway, and there is evidence of interaction between proteins involved in distinct pathways (Nagel et al., 2014). This interaction is probably responsible for generating different degrees of malignancy and modulating the carcinogenic process as well as the response to therapeutic agents in CRC (Bardhan and Liu, 2013).

3. Mismatch repair: MMR status has promising prognostic and predictive value in CRC patients

MMR is one of DNA repair pathways that aims to maintain genomic stability when DNA replication and recombination errors occurs (Iyer et al., 2006). This pathway recognizes and repairs erroneous insertions, deletions and misincorporation of bases, but also repairs mispairs due to endogenous (oxidative reactions) and exogenous (chemicals and physical agents) kinds of DNA damage (Li, 2008). Study of the biochemistry of the MMR proteins has revealed that recognition of mismatches and insertion/deletion loops is performed by a heterodimers of either MSH2 and MSH6 or MSH2 and MSH3 (Hsieh and Kazuhiko, 2009). While the MLH1, PMS2, and PMS1 proteins act primarily by repairing the base-base mismatches and insertion/deletion loops, the heterodimer of MLH1-PMS2 proteins executes the repair of the mismatches in conjunction with other molecules (Kheirelseid et al., 2013).

MMR is the most studied DNA repair pathway in the context of CRC pathological and clinical features, and deficiencies in this pathway result in tumors with MSI. Microsatellites are defined as repeated DNA sequences that consists in 2–5 base pairs, usually occurring 10–60 times and are scattered throughout coding and noncoding regions of the genome, compounding 3% of the genome (Bupathi and Wu, 2016).

It is well established that two distinct types of CRC - according to the MMR status - exist: MMR-proficient (pMMR) and MMR-deficient (dMMR). A germline mutation in one of the main MMR components (most frequently MLH1 or MSH2 and rarely MSH6 and PMS2), is the source of MMR deficiency in patients with Lynch syndrome (LS), previously referred as hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), which comprises 0.8–5% of all CRC cases (Boland, 2005; Kawakami et al., 2015; Lynch, 1966; Mecklin, 1987). dMMR is also observed in 10–20% of patients with sporadic CRC, usually caused by MLH1 promoter hypermethylation and consequent loss of protein expression (Hewish et al., 2010). Immunohistochemistry (IHC) in colorectal tumors for MLH1 and MSH2 is a rapid, sensitive and highly specific method for screening for MMR defects (Overbeek et al., 2008). Search for dMMR can be performed by IHC by testing at least one of the four main MMR proteins (MLH1, MSH2, PMS2, and MSH6) or by directly searching MSI in DNA-based test for unclear sporadic CRC or hereditary CRC confirmation (Funkhouser et al., 2012; Sepulveda et al., 2017).

dMMR CRC shows several distinct clinicopathological features and may have some influence in response to chemotherapy and serve as a predictive factor to 5-FU response in CRC patients. dMMR/MSI is considered a prognostic factor for unfavorable outcomes, which are represented by predominant occurrence in proximal colon, lymphocytic infiltrate, poorly differentiated tumor cells and presence of mucin or signet ring appearance. Conversely, dMMR in CRC tumors favors response to 5-FU-based chemotherapy in comparison to patients with pMMR CRC receiving the same scheme (Koopman et al., 2009; Miyakura et al., 2001; Ryan et al., 2017; Sepulveda et al., 2017).

In selected stage II and stage III CRC the fluoropyrimidine (5-FU or capecitabine)-based adjuvant chemotherapy is considered the first line of care (André et al., 2009, 2004; Zhang et al., 2016b; Ryan et al., 2017) and is commonly used with other chemotherapeutic agents, such as

irinotecan, leucovorin (LV) and oxaplatin (Zhang et al., 2016b). Despite the amount of reports, current clinical data about 5-FU-based adjuvant chemotherapy in patients with dMMR is still considered conflicting, mainly due to bimodal age distribution of CRC patients, limited sample size, inclusion of multiple tumor stages and heterogeneous 5-FU-based adjuvant regimens (Kawakami et al., 2015; Zhang et al., 2016b; Ryan et al., 2017). Some studies considered that 5-FU-based adjuvant chemotherapy was ineffective in stage II and III CRC patients with dMMR tumors, since it does not improve overall and disease-free survival (Ribic, 2003; Sargent et al., 2010; Hutchins et al., 2011; Webber et al., 2015). In counterpart, other studies have shown that dMMR CRCs had a similar or even greater benefit from 5-FU-based adjuvant treatment, when compared to pMMR CRCs, with better overall and disease-free survival rates (Elsaleh et al., 2000; Hemminki et al., 2000; Kim et al., 2007; Westra et al., 2005; Popat et al., 2005; Guastadisegni et al., 2010).

In stage II dMMR CRC patients treated with surgery plus 5-FU or surgery alone, the last ones presented better overall survival (Ribic, 2003), which may indicate that these patients do not benefit from adjuvant 5-FU-based therapies (Kawakami et al., 2015). Conversely, stage III dMMR CRC patients submitted to the same regimens, dMMR disfavored disease recurrence and delayed time to response (TTR), but improved survival rates when compared to pMMR tumors. However, all stage III patients received adjuvant chemotherapy independently of MMR status (Des Guetz et al., 2009a; Kawakami et al., 2015; Webber et al., 2015). Despite still contradictory, these findings strengthen the possibility of including MMR status as a predictive biomarker for 5-FU based therapy (Ryan et al., 2017).

The addition of other chemotherapy agents to 5-FU (e.g., FOLFOX and FOLFIRI) efficiently improves disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in comparison to 5-FU with leucovorin isolated in stage III dMMR CRC patients to FOLFOX regimen (André et al., 2009; Devaud and Gallinger, 2013; Gavin et al., 2012; Zaanen et al., 2009, André et al., 2015). A meta-analysis of treated and untreated stage II/III with high-MSI (MSI-H) colorectal tumors showed that MSI-H status, in addition to predicting better prognosis, also is a predictive factor of non-response to chemotherapy (Des Guetz et al., 2009b). Alternatively, another meta-analysis in metastatic CRC patients (mCRC) found no benefit of chemotherapy in terms of response ratio for MSI-H patients compared with microsatellite stable (MSS) patients, showing that this phenotype does not predict chemotherapy response in this subset of patients (Des Guetz et al., 2009a). Regarding targeted therapy, it seems that bevacizumab - monoclonal antibody of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) - in combination with FOLFOX has a potential benefit in stage II/III dMMR CRC patients' survival (Pogue-Geile et al., 2013). It may be since dMMR CRC patients also present higher serum VEGF levels, given the well-defined target of this antibody or anti-angiogenic treatment in general (Hansen et al., 2011). Also, studies revealed that patients with advanced CRC who possess a *BRAF* mutation have significantly poorer outcomes as measured by PFS and OS and have a decreased response rate to anti-EGFR therapy relative to those with non-mutated *BRAF* (Sepulveda et al., 2017)."

Immunotherapy-based treatment is approved for use in metastatic/refractory dMMR CRC patients by the Food and Drug Administration (FDA) in the United States due to the strong T cell response induced by large amounts of neoantigens (Kelderman et al., 2015) related to the specific antigen-driven immune responses caused by dMMR (Phipps et al., 2015). dMMR CRC have a highly up-regulated expression of multiple immune checkpoint proteins, including Programmed Death-ligand 1 (PD-L1). This characteristic is not exclusive of tumor cells, but it also occurs in tumor-infiltrating lymphocytes and/or myeloid cells (Llosa et al., 2015; Ryan et al., 2017; Taube et al., 2014) and the mechanism of immune-based therapy involves the blockade of these immunoregulatory system (Ryan et al., 2017). The first phase I trial evaluated nivolumab in CRC and only one patient presented complete response out of 20 treated (Brahmer et al., 2010). A study phase II

showed compared clinical response of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated, progressive metastatic tumors, with or without dMMR, and it was demonstrated that dMMR CRC had both better progression free survival (PFS) and OS (Le et al., 2015). The European Society for Medical Oncology (ESMO) and the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) is now recommending MSI testing as a result of its immune check-point inhibitors treatment strong predictive value in patients with mCRC (Van Cutsem et al., 2016; NCCN, 2017). dMMR occurs in less than 5% of mCRC (Funkhouser et al., 2012) and immune checkpoint blockade treatment in advanced CRC patients with pMMR disease has been associated with unsatisfactory responses (Myint and Goel, 2017). However, there are studies recruiting patients with advanced unresectable or metastatic CRC aiming to define MMR status as predictive biomarker for immunotherapy-based treatment (Clinical Trials Identifier: NCT02981524; NCT03396926; NCT02563002; NCT02460198)

In sum, most sporadic CRC is pMMR, which is associated with worse survival in comparison to dMMR. Patients with resected stage II dMMR CRC have good prognosis, but the lack of evidence on 5-FU-based chemotherapy benefit supports the use of other chemotherapy schemes. For stage III CRC patients, MMR status does not influence chemotherapy decisions, but it seems that dMMR is an indicative of good prognosis and a predictive factor of non-response, although literature data on this topic are still conflicting (Ryan et al., 2017). Finally, the ESMO and NCCN recommended MSI testing due to its strong predictive value for the use of immune check-point inhibitors in the treatment of patients with mCRC which aim to use immunotherapy-based treatment, but there are many studies recruiting patients to define the real predictive role of MMR status in CCR patients treated with immunotherapy.

4. Direct repair: *MGMT* methylation status is a potential predictive biomarker of response to treatment to temozolomide (TMZ) in mCRC

O⁶-Methylguanine (O⁶-MG)-DNA-methyltransferase gene (*MGMT*) encodes the DNA-repair protein O⁶-alkylguanine (O⁶-AG) DNA alkyltransferase (AGT), which removes alkyl groups from O⁶ position of guanine to protect normal cells from exogenous carcinogens (D'Incalci et al., 1988; Pegg, 1990). This protein is unique among DNA repair proteins since it acts by itself to eliminate DNA adducts. The AGT protein is a DNA repair enzyme that is normally expressed in all normal human cells and protects DNA from damage caused by alkylating agents (Gerson, 2004).

MGMT is located on chromosome 10 at 10q26 and encodes five exons and four introns. The 5' promoter region contain several transcription factors recognition sequences and has many GC base pair repeats (CpG islands), which are very common methylation sites (Natarajan et al., 1992). Loss of *MGMT* expression, often through *MGMT* promoter methylation, is clinically relevant, and was first reported in 1999 (Esteller et al., 1999). While the overexpression of *MGMT* is known for its influence in reducing the risk of carcinogenesis and the risk of mutations after exposure to alkylating agents, such as TMZ (Amatu et al., 2016), loss of *MGMT* results in enhanced cytotoxicity of classic alkylators, such as cyclophosphamide, but also of topoisomerase I inhibitors and irinotecan (Friedman et al., 1995, 2002; Khan et al., 2008).

It is well known that colorectal mucosa is constantly exposed to exogenous carcinogens. Consequently, it is fundamental to preserve a competent DNA repairing system to protect normal cells from mutagenesis. *MGMT* restores mutagenic O⁶-methylguanine to guanine in normal colonic tissue, preventing DNA alkylation damage (Farzanehfar et al., 2013). The relevance of *MGMT* in CRC carcinogenesis is widely accepted, and reduced *MGMT* expression has been documented in tumor in comparison to normal colon tissues (Kuan et al., 2015). *MGMT* gene promoter methylation also plays an important role in colorectal

carcinogenesis, occurring in about 30–40% of all CRC cases (Esteller et al., 2001; Shen et al., 2005). Indeed, *MGMT* promoter methylation is a useful marker to identify early stages of CRC (Shen et al., 2005).

Low frequency of *MGMT* methylation has been detected in normal colorectal mucosa taken from the margin of the resected CRC as well as in individuals without CRC (Ahlquist et al., 2008; Nagasaka et al., 2008). Thus, it has been accepted that the modulation of *MGMT* expression through methylation seems to be more involved with colorectal carcinogenesis than with the prognostic aspects of the disease, since it also occurs in healthy intestinal tissue. It may suggest that *MGMT* gene silencing is only one of several steps required to accumulate DNA damage and to lead cells to malignancy. Loss of *MGMT* has therefore been defined as a *field defect*, i.e., it is not completely necessary nor sufficient for the progression of cancer, but it represents one of several steps involved with the carcinogenesis (Nagasaka et al., 2008).

MGMT loss also plays a role in MSS CRC through a mechanism of chromosomal instability (Shen et al., 2005), but it is more frequent in this MSI CRC phenotype, suggesting that *MGMT* promoter methylation selects dMMR clones (Svrcek et al., 2010). In fact, a second level of defense against DNA damage is represented by MMR pathway, which leads the cell to apoptosis in the presence of serious genomic changes (Allan and Travis, 2005).

4.1. Prognostic value of *MGMT* promoter methylation or loss of expression

Relevant literature has been registering the scientific efforts to discover the diagnostic, prognostic and predictive relevance of *MGMT* in colorectal cancer (Farzanehfar et al., 2013; Ju et al., 2011; Kim et al., 2010; Krtolica et al., 2007; Leguisamo et al., 2017; Nagasaka et al., 2008; Nilsson et al., 2013; Shima et al., 2011; Sinha et al., 2013). The first study to correlate *MGMT* promoter methylation and prognostic features of tumor aggressiveness showed no association with clinicopathological characteristics and no influence in overall survival (Krtolica et al., 2007). Later, two other studies presented conflicting data regarding the association of CRC clinical features and loss of *MGMT* expression in tumor tissues (Ju et al., 2011; Nagasaka et al., 2008). As summarized in Table 1, *MGMT* promoter methylation or loss of protein expression was associated with distal tumor location (Shima et al., 2011), late tumor stage (Ju et al., 2011; Nilsson et al., 2013; Sinha et al., 2013), high grade tumors (Leguisamo et al., 2017; Oliver et al., 2014) and tubular adenocarcinoma (Zhang et al., 2016a) – all features of tumor aggressiveness. A meta-analysis of 28 studies attempted to demonstrate evidence that *MGMT* may be a candidate for a tumor suppressor in CRC by testing its prognostic value. Unfortunately, the results were inconclusive in relation to clinicopathological data due to the heterogeneity of studies included. Even so, this meta-analysis also discussed the importance of *MGMT* as a potential drug target of

CRC (Zheng et al., 2015). Nevertheless, usually, there are many inconsistent results for associations with clinical and pathological factors, possibly due to the experimental designs of the studies, low statistical power or erroneous investigation of the methylated regions.

Currently, there is no evidence in literature that *MGMT* can be utilized as prognostic biomarker. Six studies have attempted to demonstrate the role of *MGMT*, one author described that *MGMT* methylation may play a protective role (Nilsson et al., 2013) another study showed that high expression of *MGMT* has a better outcome (Oliver et al., 2014). Nevertheless, four studies did not show correlation of low expression or methylation of *MGMT* with overall survival (Krtolica et al., 2007; De Maglio et al., 2015; Shima et al., 2011; Zhang et al., 2015a) or progression-free survival (Oliver et al., 2014).

4.2. *MGMT* promoter methylation or loss of expression predictive value

MGMT is an ascertained predictive biomarker in melanoma and glioblastoma, where alkylating agents are the first line treatment (Tuominen et al., 2015; Walter et al., 2015). Particularly in glioma, loss of *MGMT* expression affects both tumor progression and response to chemotherapy (Esteller et al., 2001). Dacarbazine and temozolomide (TMZ) deliver a methyl group to adenine or guanine in DNA. The primary cytotoxic lesion, O⁶-methylguanine (O⁶-MeG) is normally processed by *MGMT* protein in a one-step methyl transfer reaction. Thus, *MGMT* inactivation may confer sensitivity to alkylating agents (Amatu et al., 2013; Esteller and Herman, 2004).

In case of loss of *MGMT*, these lesions can be tolerated by MMR pathway (Zhang et al., 2012), which is the main rationale for the use of TMZ or dacarbazine in dMMR CRC with *MGMT* promoter methylation. However, the effectiveness of alkylating agents in the treatment of CRC is not clear (Clinical Trials Identifier: NCT02414009; NCT01781403; NCT01051596; Hochhauser et al., 2013). In the past, fluoropyrimidine-resistant patients who received dacarbazine with other drugs had response rates between 19%–33% (Içli et al., 1999). When TMZ is associated with other drugs in unselected metastatic CRC patients, it did not show improvement in the disease prognosis (Khan et al., 2008). Meanwhile, using the appropriate molecular rational, recent studies separate response rate in patients with mCRC exhibiting loss of *MGMT* expression. A case report described two patients with mCRC and loss of expression of *MGMT* who had an impressive clinical response and partial tumor regression with the use of TMZ as a single agent (Shacham-Shmueli et al., 2011). In addition, phase II studies with CRC patients with *MGMT* promoter methylation or loss of expression and treated with TMZ, are presenting objective response rates between 2,7–53% (Calegari et al., 2017; Hochhauser et al., 2013; Pietrantonio et al., 2014, 2015), with clinical significance in two studies (Pietrantonio et al., 2014, 2015), as summarized in Table 2.

Table 1
Studies reporting the prognostic value of *MGMT* promoter methylation or *MGMT* loss/low protein expression in CRC patients.

Author	n	Method	<i>MGMT</i> (% of cases)*	Clinicopathological feature association	p	Clinical outcome	p
Krtolica et al. (2007)	85	MSP	43.0	NA		OS (months)a 35.5 ± 6 vs. 23.1 ± 3.2	NS(1)
Nagasaka et al. (2008)	219	COBRA	36.1	Stage I and II	0.04(1)	NE	
Ju et al. (2011)	78	PS	26.9	Stage IV	0.043(1)	NE	
Kim et al. (2010)	285	PS	21.0	NA		NE	
Shima et al. (2011)	855	QMSP	38.0	NA		OS (HR)a 1.0 [CI 0.88–1.32]	NS(4)
		IHC	37.0	Distal CRC	0.014(1)	OS (HR)b 1.11 [CI 0.87–1.41]	NS(4)
Nilsson et al. (2013)	111	PS	34.0	Stage IV	< 0.0001(2)	OS (HR)a 0.36 [CI 0.15–0.87]	0.049(4)
Farzanehfar et al. (2013)	40	QMSP	27.5	NA		NE	
Sinha et al. (2013)	124	MSP	47.0	Stage III and IV	0.018(1)	NE	
Oliver et al., 2014	123	IHC	73.7	High grade tumors	0.011(3)	OS (HR)b 3.73 [CI 1.35–10.33] PFS (HR)b 1.55 [CI 0.81–2.99]	0.011(4) NS(4)
De Maglio et al. (2015)	53	PS	64.2	NA		OS (days)a 163 vs. 193	NS(1)
Leguisamo et al. (2017)	70	qPCR	74.2	High grade tumors	0.027(3)	NE	
Zhang et al. (2016a,b)	385	IHC	24.2	Tubular adenocarcinoma	0.011(2)	OS (months)b 19.83 vs. 23.57	NS(1)

Table 2

Studies evaluating the predictive value of MGMT promoter methylation or MGMT loss/low protein expression in metastatic CRC.

Author	Method	ITT population	Treatment	Primary endpoint		p	Conclusion
Amatu et al. (2013)	MSP	68	Dacarbazine	ORR	3%	NS(1)	Primary endpoint not met
Hochhauser et al. (2013)	MSP	37	Temozolomide	ORR	2.7% [CI 0.1-14.2%]	NS(2)	Primary endpoint not met
Pietrantonio et al. (2014)	MSP	32	Temozolomide	ORR	12%	< 0.05(1)	Primary endpoint met in CRC harboring MGMT promoter methylation
Zhang et al. (2016a,b)	IHC/MSP	385	Oxaliplatin Irinotecan	PFS (months)*	7.0 vs. 9.17 7.17 vs. 7.07	0.08(3) 0.025(3)	Primary endpoint met in irinotecan treated CRC with low MGMT expression
Pietrantonio et al. (2015)	IHC	32	Temozolomide	ORR	53%	p < 0.0001(1)	Primary endpoint met in CRC harboring MGMT promoter methylation
Amatu et al. (2016)	MSP	29	Temozolomide	PFS rate at 12 weeks (%)	10.3% [CI 2.9-24.6%]	NA	Primary endpoint not met
Sartore-Bianchi et al. (2017)	MB/IHC	71	Temozolomide or dacarbazine	DCR	34.3%	0.001(2)	Primary endpoint met in CRC harboring MGMT promoter methylation and low MGMT protein expression
Calegari et al. (2017)	MSP	80	Temozolomide	ORR	10%	NS(1)	Primary endpoint not met

MSP: methylation-specific PCR; IHC: immunohistochemistry; MB: methyl-BEAMing; ITT: intention to treat; ORR: overall response rate (complete and partial response); PFS: progression-free survival; DCR: disease control rate (complete response + partial response + stable disease); *: low- vs high-MGMT expression; CI: confidence interval; (1): student t-tests or Fisher exact test; (2): regression; (3): log-rank; NS: no significance.

Furthermore, MGMT hypermethylation or low MGMT protein expression and use of dacarbazine or TMZ was associated with better disease control rate in patients with mCRC (Sartore-Bianchi et al., 2017) and with improvement in PFS when oxaliplatin or irinotecan are added (Zhang et al., 2016b).

4.3. MGMT conclusions

Despite the amount of evidence, predictive and prognostic role of MGMT promoter methylation or loss of expression is not yet defined in CRC. The clinicopathological data reveals many inconsistent results for associations with prognostic factors, possibly due to the experimental designs of the studies, low statistical power, erroneous investigation of the methylated regions or different methods to analyze MGMT expression. Nevertheless, testing MGMT methylation status or protein expression in colorectal tumor specimens has an interesting potential as a predictive biomarker, especially if the effectiveness of TMZ as a single agent or in combination with other drugs treatment in refractory mCRC is confirmed.

5. Base excision repair: a promising but still neglected pathway in CRC

Base excision repair (BER) is a multi-step repair pathway acting on damaged bases caused by alkylation, oxidation or deamination and proceeds through a sequence of reactions according to the initial base lesion (Rouleau et al., 2010). Shortly, BER complete activity involves the coordinate actions of DNA glycosylases, endonucleases, DNA polymerases and DNA ligases. BER is initiated upon base removal by one of several substrate-specific DNA glycosylases, such as *N*-methyl-purine DNA glycosylase (MPG) and 8-oxo-guanine glycosylase (OGG1). Once the enzymatic BER steps are initiated, toxic intermediates such as apurinic/aprimidinic (AP) sites and single strand breaks (SSB) are generated. Effective BER completion is coordinated by an important secondary element, the chromatin associated enzyme poly-(ADP-ribose) polymerase or PARP. PARP is activated upon binding to sites of SSB, allowing the recruitment of downstream BER enzymes and the conclusion of the repair procedure (Maynard et al., 2009).

BER pathway has a very significant role in CRC carcinogenesis. Colon epithelium is physiologically constantly renewed and is largely exposed to oxidative stress (Obtułowicz et al., 2010) caused by exposition to a variety of exogenous mutagens (cigarette smoking, alcohol, overcooked red meat, processed saturated fat, etc.) present inside the lumen of the bowel or in the blood (Potter, 1999); or by colon chronic inflammation, which affects cellular metabolism (Itzkowitz,

2004) and enhances epithelial cell turnover and favors neoplastic transformation (Slyskova et al., 2012).

The well-known BER relevance in CRC is related to the mutation in the *MUTYH* gene, which is responsible for a predisposing condition to CRC termed *MUTYH* associated polyposis (MAP) and is responsible for 0.3%–1% of all CRC (Nielsen et al., 2011). Patients carrying *MUTYH* mutations (Tyr165Cys or Gly382Asp) tend to develop multiple adenomatous colon polyps during their lifetime and have an increase of 28 to 93-fold risk of CRC (Farrington et al., 2005; Lubbe et al., 2009). *MUTYH* is a DNA glycosylase involved in oxidative DNA damage repair and repair of post-replicative mispairs within DNA replication (Zhang et al., 2015a). However, other BER components have been drawing attention in the context of sporadic CRC carcinogenesis, prognosis and response to chemotherapy in the last decade. Table 3 summarizes the main studies suggesting the changes in BER genes and proteins expression as prognostic and predictive biomarkers.

5.1. DNA glycosylases: OGG1 and MPG

The antioxidant potential in CRC tissues is impaired in comparison to healthy intestine tissue (Kondo et al., 2000; Park et al., 2001). Many observations suggest the role of oxidative stress in colon cancer pathogenesis. The most abundant oxidatively modified lesions in DNA is the promutagen 8-hydroxydeoxyguanosine (8-oxodG) and it is the substrate for 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) (Saebo et al., 2006; Slyskova et al., 2012).

In the context of CRC prognosis, changes in *OGG1* gene expression were reported in normal colic tissues, colorectal adenocarcinomas and CRC patients' leukocytes. In normal colic tissue, *OGG1* gene expression was not associated with overall survival probability (Dziaman et al., 2014a). Regarding *OGG1* gene expression in CRC specimens, the results are conflicting so far. Low expression of *OGG1* in colorectal adenocarcinomas (in comparison to healthy surrounding tissues) was correlated to distal and advanced tumors (Santos et al., 2014) but also higher *OGG1* mRNA levels were shown to be associated with high grade tumors (Leguisamo et al., 2017).

Finally, higher levels of expression of *OGG1* were found in leukocytes of patients with malignant tumors in comparison to the healthy ones or the ones with adenomas. However, no prognostic value were associated (Obtułowicz et al., 2010).

MPG (also known as AAG or MDG) is a monofunctional DNA glycosylase and has a special role in BER pathway. Differently from OGG1, MPG addresses alkylation rather than oxidative stress (Whitaker et al., 2017). Augmented sensitivity to alkylating agents has been detected by modulating BER components in preclinical studies, which may signify

Table 3
BER components expression in CRC neoplasms as prognostic and predictive biomarkers: recent discoveries.

Pathway component	n	low expression	Product	Clinicopathological feature association	P	Clinical Outcome	P	Author
OGG1	49	low expression	mRNA	Distal tumors Stage III and IV	< 0.05(1)	NE		Santos et al. (2014)
	40	high expression	mRNA	NE	0.042(2)	OSP60 a	NS(6)	Dziaman et al. (2014a,b)*
	70	high expression	mRNA	High grade tumors	0.031(2)	NE		Leguisamo et al. (2017)
MPG	70	high expression	mRNA	High grade tumors	0.044(2)	NE		Leguisamo et al. (2017)
	72	protein	protein	Lymphatic invasion	0.009(1,3)	PFSb	0.004(5)	Azambuja et al. (2017)
				Right sided CRC	< 0.001(1,3)			
APE1	49	low expression	mRNA	T3-T4	< 0.001(1,3)			
				Stage III and IV	< 0.001(1,3)			
				Lymphatic invasion	< 0.001(1,3)			
PolB	70	high expression	mRNA	Perineural invasion	0.011(1,3)			
	97	high expression	mRNA	N+	< 0.001(1,3)			
				Distal tumors	< 0.05(1)	NE		Santos et al. (2014)
Fen1	70	high expression	mRNA	Stage III and IV	< 0.05(1)	NE		Leguisamo et al. (2017)
	97	high expression	mRNA	Stage III and IV	0.018(2)	NE		Iwatsuki et al. (2009)
				N+	< 0.05(1)	OSa	0.0219(5)	
PARP1	70	low expression	mRNA	Lymphatic invasion	< 0.05(1)	Ra	1.270 [CI 0.82–2.06]	Leguisamo et al. (2017)
				Liver metastasis	< 0.05(1)			
				Distant metastasis	< 0.05(1)			
XRCC1	72	unchanged	protein	Stage III and IV	< 0.05(1)	NE		
	56	high expression	mRNA	N+	0.003(2)			
	70	low expression	mRNA	Lymphatic invasion	0.024(2)			
Fen1	72	unchanged	protein	Perineural invasion	0.003(2)			
	56	high expression	mRNA	Stage III and IV	0.001(2)			
	70	low expression	mRNA	Stage III and IV	0.001(2)			
PARP1	72	unchanged	protein	Right sided CRC	0.03(1,3)	PFSb	NS(5)	Azambuja et al. (2017)
	56	high expression	mRNA	T3-T4	< 0.001(1,3)			
	70	low expression	mRNA	Stage III and IV	< 0.001(1,3)			
XRCC1	72	unchanged	protein	Lymphatic invasion	0.04(1,3)			
	56	high expression	mRNA	N+	0.01(1,3)			
	70	low expression	mRNA	Stage III and IV	0.028(4)	PFS b	NS(5)	Azambuja et al. (2017)
XRCC1	72	unchanged	protein	Stage III and IV	0.028(4)	PFS (years) b	< 0.012(5)	
	56	high expression	mRNA	Lymphatic invasion	0.016(2)	OS (HR) b	0.012(4)	Alhadheq et al. (2016)
	70	low expression	mRNA	Perineural invasion	0.043(2)	NE		Leguisamo et al. (2017)
XRCC1	49	low expression	mRNA	Distal tumors	< 0.05(1)	NE		Santos et al. (2014)
	52	high expression	protein	Stage III and IV	< 0.05(1)	OSP60 a	NS(6)	Dziaman et al. (2014a,b)*
	151	high expression	protein	Dukes C	0.018(3)	NE		Sulzye-Bielicka et al. (2012)
XRCC1	180	high expression	protein	NA	0.042(2)	Early treatment failure (OR) b	1.376 [CI 0.625–3.028]	Huang et al. (2013)
	49	high expression	mRNA	NA	0.042(2)	NE		Santos et al. (2014)
	70	high expression	mRNA	High grade tumors	0.042(2)	NE		Leguisamo et al. (2017)
XRCC1	72	high expression	protein	Stage III and IV	0.001(1,3)	PFS b	NS(5)	Azambuja et al. (2017)
				Lymphatic invasion	0.001(1,3)			
				N+	< 0.001(1,3)			

NE: not evaluated; NA: no association; OS: overall survival; PFS: progression free survival; OSP: overall survival probability; RR: relative risk; HR: hazard ratio; OR: odds ratio; a: low vs. high expression; b: high vs. low; (1): chi-square test; (2): multiple linear regression analysis; (3): Fisher's exact test (two sided); (4): univariate/multivariate; (5): log-rank; (6): log-rank/univariate regression; NS: no significance; *normal colon tissue.

that changes in this pathway is a potential target for chemotherapy potentiation (Kinsella, 2009). Thus, the possible relevance of MPG in CRC is associated with TMZ-based treatment response, since the repair of TMZ-induced base damage starts with the recognition and removal of the damaged bases by MPG. Nevertheless, MPG role TMZ response to treatment in CRC was only assessed *in vitro* (Leguisamo et al., 2017).

Regarding MPG prognostic role, high expression of MPG was reported to be associated with several features of tumor aggressiveness, such as more aggressive histological subtypes, high grade tumors, presence of perineural and lymphatic invasion, right sided-CRC, late stages and shorter disease free survival (Azambuja et al., 2017; Leguisamo et al., 2017).

5.2. APE1

APE1 (human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1) is the main BER AP endonuclease involved in DNA repair, transcriptional regulation and redox signaling (Ballista-Hernández et al., 2017). It has a 3'-phosphodiesterase activity and initiates repair of AP sites in DNA by hydrolyzing the phosphodiester 5' backbone (Kelley and Parsons, 2001). APE1 protects cells against the toxic effects of endogenous and exogenous agents including chemotherapeutic agents (Fleck, 2004). CRC patients with reduced APE1 gene expression are more prone to present distal tumors (Santos et al., 2014). However, regarding TNM staging, the current literature offers two studies with contradictory results. While one study showed that low APE1 gene expression is associated with the occurrence of more advanced tumors (Santos et al., 2014), the other study shows the contrary (Leguisamo et al., 2017).

5.3. Polβ

DNA Polymerase β (Polβ) is localized in chromosome 8 and is the main polymerase involved in BER. It has two catalytic activities, deoxyribose phosphate (dRP) lyase and polymerase activities. APE1 incises the AP site and leaves 3'-OH and 5'-dRP groups. POLβ removes the dRP group with its lyase activity and fills in the missing nucleotide (Lavrik et al., 1998). Polβ is essential in the DNA repair system mediated through BER machinery required for DNA maintenance, replication, recombination and drug resistance. In CRC clinical context, higher levels of Polβ gene and protein expression are associated with lymph node and distant metastasis, advanced TNM stages and right-sided tumors (Azambuja et al., 2017; Iwatsuki et al., 2009; Leguisamo et al., 2017). Furthermore, high Polβ protein expression is also correlated with worse prognosis (Iwatsuki et al., 2009).

5.4. PARP-1

Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) is a nuclear enzyme, also part of the BER pathway, which is involved in cellular response to DNA damage and DNA metabolism, preserving genome integrity from DNA-strand breaks. This enzyme is also responsible for transcriptional regulation, telomere cohesion and mitotic spindle formation during cell division, intracellular trafficking and energy metabolism (Alshammari et al., 2014). The main clinical relevance of PARP in oncology relies on the use of PARP inhibitors (iPARP), following the synthetic lethality rationale (Kaelin, 2005). Thus, testing PARP-1 expression in neoplastic tissues may be a useful molecular tool for patient individual chemo sensitivity, drug effectiveness and disease response to iPARP. Mechanistically, PARP-1 overexpression may occur in reason of oxidative stress and inflammation (Aguilar-Quesada et al., 2007; Storr et al., 2012), both crucial factors involved with CRC carcinogenesis.

In theory, targeting aberrant DNA repair colorectal tumors (e.g., dMMR/MSI-H) with iPARP could be a successful strategy. Six clinical trials to assess the effects of iPARP in CRC were registered until now. Currently, there is only one active study recruiting patients (Clinical Trial Identifier: NCT02484404). However, as a single agent or in

combination with standard systemic therapies, iPARP did not demonstrate promising activity so far (Clinical Trial Identifiers: NCT00912743, NCT02305758), probably because PARP inhibition is not enough to disrupt BER pathway in dMMR tumors treated with 5-FU based schemes and provoke the expected synthetic lethality. However, in MGMT hypermethylated and dMMR colorectal tumors, the association of iPARP with 5-FU-based treatments or TMZ may favor patients' outcomes.

In terms of CRC prognosis, PARP-1 levels were reported to be higher in comparison to normal colon and in polyp tissues, suggesting an influence in CRC disease progression (Dziaman et al., 2014b). In addition, overexpression of PARP-1 in tumor tissues has been associated with less aggressive tumors, with proximal localization and absence of lymphatic and perineural invasions (Leguisamo et al., 2017; Santos et al., 2014). Unfortunately, PARP-1 levels still do not present relation with tumor stage at the time of diagnosis (Alhadheq et al., 2016; Santos et al., 2014; Sulzyc-Bielicka et al., 2012). Two studies have assessed the prognostic value of PARP-1 expression, but only one reached significance to support that increased PARP-1 expression is a predictor of shorter OS and PFS in CRC patients (Alhadheq et al., 2016).

5.5. XRCC1

XRCC1 (X-Ray Repair Complementing Defective Repair In Chinese Hamster Cells 1) is a protein part of the BER repair pathway that interacts with human polynucleotide kinase (PNK), POLβ and DNA ligase III, which is thought to act as a scaffold in the removal alien bases, caused by ionizing radiations and alkylating agents (Brem and Hall, 2005). XRCC1 has been studied in CRC patients treated with FOLFOX-4 chemotherapy with aim to determine failure to treatment with no significant difference about its expression (Huang et al., 2013). However, high expression of this protein has been correlated with high grade tumors (Leguisamo et al., 2017) and lymphatic invasion, lymph node metastasis and higher stages (Azambuja et al., 2017).

5.6. BER conclusions

Despite the growing body of experimental data regarding BER participation in CRC development and response to chemotherapy, there is still a lack of evidence for the use of BER genes and protein levels as a prognostic and predictive factors (Table 4). Furthermore, targeting this pathway as a therapeutic approach in CRC has not been thoroughly explored. Indeed, considering that alkylating agents' cytotoxicity is favoured by the inefficiency of MGMT, MMR and BER, the number of studies exploring the last pathway in CRC is still insufficient. Consequently, the search for a molecular signature that includes MGMT methylation and MMR status, and search for BER imbalance may be the next step to consolidate the use of new approaches such as alkylating agents and iPARP in refractory CRC.

6. Nucleotide excision repair: the prognostic and predictive value of NER is represented by ERCC1 and ERCC2

The nucleotide excision repair (NER) machinery is involved in repairing a great variety of DNA lesions, such as pyrimidine dimers, bulky DNA adducts and intrastrand DNA cross-links, which all distort the DNA double helix. The classic NER pathway involves roughly 30 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 (Spivak, 2016). In addition to 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 blocks RNA polymerase progression. These two NER pathways are thought to differ only at the lesion recognition step, but utilize common machinery to execute the

Table 4

Prognostic value of ERCC1 low and ERCC2 high gene/protein expression in colorectal cancer. All patients were treated with oxaplatin based therapy.

Pathway component	n	Product	Clinicopathological feature association	p	Survival	p	Author	
ERCC1 low expression	50	mRNA	NE		OS (months)* 10.2 [CI 7.8–15.1] vs. 1.9 [CI 1.1–4.9]	< 0.001(3)	Shirota et al. (2001)	
	168	protein	NE		OS (months)* 16 vs. 25	< 0.01(3)	Chang et al. (2009)	
	119	mRNA	NE		PFS (months)* 9 vs. 13	< 0.01(3)		
					OS (months)* 33.1 vs. 16	0.025(3)	Grimminger et al. (2012)	
	255	protein	Stage III and IV	< 0.001(1)	NE		Li et al. (2013)	
	180	protein	NE		OS	Worse	< 0.001(3)	Huang et al. (2013)
					PFS	Shorter	< 0.001(3)	
	120	mRNA	N+ Stage III and IV	< 0.001(2)	OS	Worse	< 0.001(3)	Yuanming et al. (2013)
					PFS	Shorter	< 0.001(3)	
	56	protein	NE		OS (months)* 30.9 vs. 13.2	0.021(3)	Han et al. (2014)	
	895	protein	NE		DFS (HR) 0.378 [CI 0.316–0.451]	< 0.001 (4)	Zhang et al. (2015a,b)	
					OS (HR) 0.375 [CI 0.307–0.458]	< 0.001(3)		
	41	mRNA	NE		OS (months)* 36 vs. 10.1	< 0.001(3)	Choueiri et al. (2015)	
64	mRNA	NE		OS (HR) 2.019 [CI 0.875–4.661]	0.1(1)	Kassem et al. (2017)		
				EFS (HR) 3.088 [CI 1.399–6.819]	0.005(1)			
86	mRNA	NE		DFS (months)* 51.9 ± 1.4 vs. 38.4 ± 3.2	0.002(3)	Huang et al. (2017)		
				OS (months)* 53.1 ± 0.9 vs. 40.6 ± 3.4	0.005(3)			
ERCC2 high expression	2233	protein	M+	0.028(1)	OS (HR) 0.82 [CI 0.65–1.04]	0.11(3)	Li et al. (2016)	
	64	mRNA	NA		OS (HR) 1.363 [CI 0.592–3.138]	0.467(5)	Kassem et al. (2017)	
					EFS (HR) 1.621 [CI 0.78–3.369]	0.195(5)		
	86	mRNA	NE		DFS	0.567(2)	Huang et al. (2017)	
				OS	0.539(2)			

final steps of the repair response (Spivak, 2015).

Classically, NER is involved in the repair of photoproducts caused by UV light (cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 pyrimidine-pyrimidones - CPD and 6-4-PP, respectively), but its scope of action is much wider, since it involves the repair of adducts resulting from numerous toxic agents, such as cigarette smoke and chemotherapeutic drugs, especially those derived from platinum and nitrosourea.

Despite NER is not classically involved with the repair of oxidative lesions, an interaction with BER pathway may suggest new roles for this pathway, especially in colorectal carcinogenesis. For example, CSA and CSB (Cockayne Syndrome A and B) proteins (TC-NER) have been shown to stimulate the activity of Neil1 and APE1 and/or to directly affect OGG1 transcription (Parlanti et al., 2012) and PARP-1 activity (Thorslund et al., 2005; Melis et al., 2013; D'Errico et al., 2013). In addition, both XPG (TC-NER) and XPC (GG-NER) also appear to play a role in the repair of oxidative lesions that distort the double helix through recognition and functioning as a cofactor to DNA glycosylases (Melis et al., 2013).

NER prognostic value is significantly more studied than its predictive in CRC (Table 5). However, it is totally conceivable that alterations in this pathway may have a contribution in colorectal carcinogenesis, since the key exogenous risk factors (e.g., smoking, alcohol consumption, high consumption of processed red meat and saturated fat) are responsible for generating reactive compounds that compromise the DNA integrity. Indeed, CRC tissues have increased NER-specific DNA repair capacity in relation to matched normal tissues (Herrera et al., 2009; Slysokova et al., 2012), which points out to a transitory cellular effort to reduce the amount of damage in these tissues during the carcinogenic process (Jonsson et al., 2010). Yet, no study has been able to find evidence of a determinant role for NER imbalance in colorectal carcinogenesis so far. This fact may indicate that this pathway is not a contributing factor to malignant transformation but that it ensures some growth advantage in the existing tumor, reducing its vulnerability to accumulation damage to DNA that precedes cell death. In this context, it is possible that the tumor genetic stability given by the increased activity of DNA repair effectors is actually associated with the metastatic process (Sarasin and Kaufmann, 2008).

In addition, oxaplatin composes the FOLFOX scheme and is one of

the main agents used in the treatment of CRC for patients diagnosed with TNM stage III and IV. Like other platinum-based compounds, oxaplatin exerts its cytotoxic effect mostly through DNA damage. This platinum agent causes bulky DNA adducts classically repaired by the NER pathway (Alcindor and Beauger, 2011; Reardon et al., 1999) In vitro, despite initial sensitivity to oxaplatin, most cancer cells will ultimately develop resistance. For example, cells that overexpress ERCC1 are resistant to oxaplatin (Arnould et al., 2003), which demonstrates NER influence in CRC platinum-based response to treatment and may have predictive value by indicating individual patient response to oxaplatin.

6.1. ERCC1 as prognostic and predictive biomarkers

ERCC1 complexes to ERCC4 (excision repair cross-complementation group 1 and 4, respectively) to make the incision at the 3' end of the damaged site during NER common pathway. As aforementioned, ERCC1 overexpression has been associated not only to resistance to cisplatin-based chemotherapy, but also to better outcomes in CRC patients without treatment. Currently, ERCC1 expression is used as a predictive biomarker for therapy response (Bohanes et al., 2011; Schirripa and Procaccio, 2017).

The first study on this regard included 50 patients and described the relationship between ERCC1 gene expression and survival in 5-FU-resistant mCRC treated with FOLFOX, suggesting that low ERCC1 mRNA levels was a prognostic biomarker for better overall 5-years survival (10.2 [CI 7.8–15.1] vs. 1.9 [CI 1.1–4.9] months, $p < 0.001$) (Shirota et al., 2001). Since then, eleven studies were conducted to confirm the impact of the changes in ERCC1 gene and protein expression in CRC patients' clinical outcomes and response to treatment. However, in terms of clinicopathological outcomes, only three studies reported that ERCC1 low expression are indicative of tumor aggressiveness, by associating ERCC1 low expression to higher stage tumors and presence of lymph node and distant metastasis (Li et al., 2013; Yuanming et al., 2013; Li et al., 2016).

Currently, it is possible to consider ERCC1 the most promising predictive biomarker in patients with CRC treated with oxaplatin in combination with a pyrimidine analog such as 5-FU or capecitabine. In

Table 5
Studies evaluating the predictive value of low ERCC1 and high ERCC2 gene/protein expression in CRC patients.

	n	Product	Disease stage	Treatment	Primary endpoint	p	Conclusions	Author	
ERCC1 low expression	45	mRNA	IV	Oxaplatin and Fluoracil	Response to therapy		0.29(1)	Primary endpoint not met	Shirota et al. (2001)
	25	mRNA	IV	Oxaplatin and Capecitabine	TTF (days)	162 vs. 85*	0.046(2)	Primary endpoint met in CRC harboring ERCC1 low expression	Uchida et al. (2008)
	59	mRNA	IV	<i>First-line</i> FOLFOX	OS (HR)	0.27 [CI 0.09–0.85] 2.95 [CI 0.8–10.8]	0.025(3) 0.1(3)	Primary endpoint met in FOLFOX isolated treated-CRC with low ERCC1 expression	Grimminger et al. (2012)
	63			<i>Second-line</i> FOLFOX		0.38 [CI 0.16–0.92]	0.03(3)		
	160	protein	III	FOLFOX + PTK FOLFOX/XELOX	OS (HR) DFS (HR)	1.05 [CI 0.35–3.17] 2.44 [CI 1.37–4.34]	0.94(3) 0.02(2)	Primary endpoint met in FOLFOX/XELOX treated-CRC with low ERCC1 expression	Li et al. (2013)
	95			5-FU	OS (HR)	1.98 [CI 1.19–3.31]	0.009(2)		
	160	protein	III	FOLFOX	DPS (HR) Early failure to therapy (HR)	1.16 [CI 0.63–2.14] 1.16 [CI 0.63–2.14] 5.153 [CI 1.654–16.057]	0.62(2) 0.62(2) 0.005(4)	Primary endpoint met in FOLFOX treated CRC with low ERCC1 expression	Huang et al., 2013
	86	protein	II-IV	FOLFOX and radiotherapy	Response to therapy (HR)	9.397 [CI 2.721–32.457]	< 0.0001(4)	Primary endpoint met in FOLFOX and radiotherapy treated CRC with low ERCC1 expression	Huang et al. (2017)
	160	protein	III	FOLFOX	Early failure to therapy (HR)	1.074 [CI 0.462–2.497]	0.869(2)	Primary endpoint not met	Huang et al., 2013
	86	mRNA	II-IV	FOLFOX and radiotherapy	Response to therapy (HR)	0.53 [CI 0.151–1.855]	0.32(2)	Primary endpoint not met	Huang et al. (2017)

FOLFOX: Leucovorin + 5-Fluorouracil + Oxaplatin; XELOX: Capecitabine + Oxaplatin; 5-FU: 5-Fluorouracil; PTK - anti-VEGF/VEGF based therapy; OS: overall survival; DFS: disease free survival; TTF: time to treatment failure; (HR): hazard ratio; CI: confidence interval; *: low vs high ERCC1; (1): fisher's exact test; (2): log-rank; (3): cox regression; (4): multivariate.

Table 6
Double Strand Break Repair components as prognostic biomarkers in CRC patients.

Pathway component	n	Product	Clinicopathological feature association	p	Clinical outcome	P	Author	
ATM	low expression	320	protein	NA	OS a	Worse	Grabsch et al. (2006)	
	low expression	445	protein	NA	OS	Worse	Beggs et al. (2012)	
BAP1	low expression	112	mRNA	N +	OS (HR)a	1.67 [CI 1.11–2.5]	Lu et al. (2014)	
		67	mRNA	Stage III and IV	OS (HR)a	2.764 [CI 1.226–7.422]	Xiong and Zhang (2017)	
	low expression	252	protein	high grade tumours	DFS (HR)a	2.16 [CI 1.108–5.624]	Tang et al. (2013)	
		67	protein	T3 and T4	NE	Worse		
BRCA1	low expression	322	protein	N +	OS	Worse	Grabsch et al. (2006)	
		322	protein	M +	DFS	Worse		
	low expression	120	mRNA	high grade tumours	OS	Worse	Grabsch et al. (2006)	
		120	mRNA	NA	DFS	Worse		
BRCA2	low expression	78	mRNA	N +	OS (HR)a	2.844 [CI 1.106–7.44]	Yuanming et al. (2013)	
		466	mRNA	Stage III and IV	OS (HR)a	2.401 [CI 1.115–5.722]	Abdul Aziz et al. (2016)	
	low expression	282	protein	NE	OS (HR)a	0.836 [CI 0.764–0.915]	Liu and Zhang (2017)	
		422	protein	NA	OS	Worse	Liu and Zhang (2017)	
	low expression	207	protein	high grade tumours	OS	Worse	Grabsch et al., 2006	
		96	protein	high grade tumours	OS	Worse	Wang et al. (2018)	
	low expression	207	protein	Dukes C tumours	DFS (HR)a	0.63(3)	Beggs et al. (2012)	
		96	protein	T3 and T4	DFS	0.0057(4)	Komuro et al. (2002)	
	Klf7	low expression	120	mRNA	NA	OS	0.477(3)	Beggs et al. (2012)
		low expression	120	mRNA	N +	DFS (HR)a	Worse	Lu et al. (2014)
Ku86	low expression	152	mRNA	Stage III and IV	OS	Worse	Lu et al. (2015)	
	low expression	96	protein	N +	OS	Worse	Lu et al. (2015)	
MRE11	low expression	625	mRNA	Stage III and IV	DFS	0.022(4)	Komuro et al. (2002)	
	low expression	625	mRNA	NA	OS (%),a,b	0.0005(4)	Pavelitz et al. (2014)	
RAD51	high expression	78	protein	proximal tumour	DFS (%),a,b	67 vs. 59	Ihara et al. (2016)	
		1213	protein	high grade tumours	DFS (%),a,b	68 vs. 71	Tennstedt et al. (2013)	
	high expression	78	protein	NA	PFS	NS(4)	Ihara et al. (2016)	
		54	protein	NA	OS	0.013(4)	Tennstedt et al. (2013)	
XRCC2	high expression	153	mRNA	high grade tumours	OS	0.035(4)	Ihara et al. (2016)	
		100	mRNA	N +	OS	Worse	Li et al. (2016)	
	high expression	101	mRNA	high grade tumours	OS	Worse	Li et al. (2016)	
		101	mRNA	N +	OS	Worse	Li et al. (2016)	
XRCC2	high expression	153	mRNA	high grade tumours	NE	0.006(2)	Xu et al. (2014)	
		100	mRNA	high grade tumours	OS	0.028(2)	Qin et al. (2015)	
	high expression	101	mRNA	T3 and T4	OS	0.024(1)	Zhang et al. (2017)	
		101	mRNA	T3 and T4	PFS	0.009(2)	Zhang et al. (2017)	
XRCC2	high expression	101	mRNA	N +	OS	0.021(2)	Zhang et al. (2017)	
		101	mRNA	M +	OS	0.01(2)	Zhang et al. (2017)	
XRCC2	high expression	101	mRNA	Stage III and IV	OS	0.0053(4)	Zhang et al. (2017)	
		101	mRNA	Stage III and IV	OS	0.0053(4)	Zhang et al. (2017)	

Table 7
Double strand break repair components and its influence in CRC response to treatment.

Pathway component	Product	n	n	Disease Stage	Treatment	Primary endpoint	p	Conclusions	Author
ATM	protein	33	I-IV	Adjuvant CT + RT	DFS		0.0046(1)	Primary endpoint met in CRC harboring ATM high expression	Grabsch et al. (2006)
BRCA1	protein	34	I-IV	Adjuvant CT + RT	DFS OS		0.0049(1) 0.0261(1)	Primary endpoint met in CRC harboring BRCA1 high expression	Grabsch et al. (2006)
Ku70	protein	96	I-III	RT	ORR(%)*	77 vs. 41	< 0.001(2)	Primary endpoint met in CRC harboring Ku70 low expression	Komuro et al. (2002)
Ku86	protein	96	I-III	RT	ORR(%)*	73 vs. 45	0.012(2)	Primary endpoint met in CRC harboring Ku86 low expression	Komuro et al. (2002)
MRE11	mRNA	320	III	5-FU/LV	DFS(%)*	67 vs. 61	NS	Primary endpoint not met	Pavelitz et al. (2014)
					OS(%)*	70 vs. 73			
XRCC2	mRNA	67	I-IV	Irinotecan + FU/LV	DFS(%)*	67 vs. 57	0.0002(3)	Primary endpoint met in CRC harboring XRCC2 low expression	Qin et al. (2015)
					OS(%)*	67 vs. 69			
	mRNA	97	III-IV	FOLFOX	ORR(%)	70 vs.20	< 0.001(3)	Primary endpoint met in CRC harboring XRCC2 low expression	Zhang et al. (2017)

CT: chemotherapy; RT: radiotherapy; 5-FU: 5-Fluoracil; LV: Leucovorin; OS: overall survival; DFS: disease free survival; ORR: overall response rate (complete and partial response); *low expression vs. high expression; (1): log-rank; (2): univariate (3): chi-squared test; NS: not significance.

eleven studies investigating the ERCC1 gene expression in CRC tumors treated with oxaliplatin, nine have found that patients whose tumors harbored low ERCC1 expression had better overall survival (Chang et al., 2009; Choueiri et al., 2015; Grimminger et al., 2012; Han et al., 2014; Kassem et al., 2017; Shirota et al., 2001; Zhang et al., 2015b; Huang et al., 2017; Li, 2017; Huang et al., 2013; Yuanming et al., 2013) (Table 5). Four studies were performed in patients with stage III CRC and the others in metastatic patients. Even with different methods used to measure ERCC1 expression and different cut-off values, the results were significant. Six studies analyzed the association between PFS or DFS and ERCC1 expression. These studies were able to establish that ERCC1 overexpression is a predictor of shorter PFS in CRC patients that received oxaliplatin in combined chemotherapy regimens (Chang et al., 2009; Huang et al., 2013; Yuanming et al., 2013; Zhang et al., 2015a,b; Kassem et al., 2017; Huang et al., 2017).

Regarding ERCC1 expression and response to treatment, its overexpression was associated with early failure to treatment defined as local recurrence or distant metastasis 1 year after XELOX (capecitabine, leucovorin and oxaplatin) (Uchida et al., 2008) and FOLFOX (oxaliplatin and capecitabine) regimens (Huang et al., 2013). Overexpression of ERCC1 was also correlated to poor response to therapy (Huang et al., 2017). When comparing CRC patients treated with FOLFOX or FOLFOX with anti-VEGF based therapies, low ERCC1 expression in neoplastic tissues was a predictor of better overall survival in FOLFOX isolated first and second-line treated patients (Grimminger et al., 2012). Low ERCC1 predictive value was also demonstrated in patients treated with FOLFOX/XELOX in comparison to the ones treated with 5-FU as a single agent (Li et al., 2013).

6.2. ERCC1 conclusion

ERCC1 is a non-guideline-endorsed genomic test, but it is mentioned by the NCCN (National Comprehensive Cancer Network) and ESMO (European Society for Medical Oncology) for use in patients with CRC (NCCN, 2017; Schirripa and Procaccio, 2017). In clinical practice, oncologists have started to require information on ERCC1 expression on CRC tumors since its overexpression strongly suggests resistance to platinum chemotherapy but also favorable prognosis (Gray et al., 2017). Conversely, ESMO consensus guidelines for the management of patients with mCRC do not recommended the use of ERCC1 protein levels for treatment decisions involving the use of oxaliplatin in routine practice (Van Cutsem et al., 2016), probably because none of the published reports had a proper study design, including intention-to-treat population and evaluation of ERCC1 sensibility and specificity.

Thus, to include ERCC1 expression as a predictive biomarker to response to oxaliplatin-based treatments, studies of diagnostic accuracy are mandatory.

6.3. ERCC2

ERCC2 (Excision Repair Cross-Complementing 2), also known as XPD (Xeroderma Pigmentosum Group D), is a subunit of human transcriptional initiation factor with ATP-dependent helicase activity and participates in DNA unrolling during NER. ERCC2 prognostic or predictive role in CRC is much less studied than ERCC1. Nevertheless, increased levels of ERCC2 have also been associated with resistance to oxaliplatin therapy in CRC patients (Huang et al., 2008). Two studies failed to prove the predictive role of ERCC2 expression for stage II–IV CRC patients treated with FOLFOX-4 adjuvant chemotherapy (Huang et al., 2013) or in association with radiotherapy (Huang et al., 2017). Regarding the prognostic value of ERCC1 expression in CRC, no difference in overall survival and event free survival of patients whose tumors harbored ERCC2 overexpression were found (Huang et al., 2017; Kassem et al., 2017).

7. Double Strand Break Repair: the pathway with few studies that needs more attention

The DNA double-strand breaks are considered an important source of DNA lesion that leads to genetic alteration, chromosomal instability, and ultimately malignant transformation. Human cells have two pathways of repair DSB: homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ). Tables 6 and 7 summarize the main studies relating DSB repair as prognostic or predictive biomarkers in CRC patients, respectively.

7.1. Homologous recombination

7.1.1. ATM

ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) is a serine-threonine kinase that is triggered by DSBs and activates several downstream targets, including those involved in DNA repair, and may also induce senescence and apoptosis (Beggs et al., 2012). Reduced ATM expression was reported as biomarker of poor disease-free survival with poor response and early failure after adjuvant chemotherapy and radiotherapy treatments (Grabsch et al., 2006). When clinicopathological data was analyzed, decreased ATM expression was significantly associated with advanced TNM stage (Lu et al., 2014) and high grade tumors (Xiong and

Zhang, 2017). Low ATM expression was also associated to poorer overall survival and disease-free survival in CRC patients (Beggs et al., 2012; Grabsch et al., 2006; Lu et al., 2014).

7.1.2. BRCA1 and BRCA2

BRCA1 (Breast Cancer Susceptibility Gene 1) is a 91KD nuclear-localized deubiquitinating enzyme and has been involved in various biological processes including chromatin dynamics, DNA damage response, and regulation of the cell cycle and cell proliferation. Although studies in the past reported an increased risk of CRC in patients with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations (Brose et al., 2002; Kirchoff et al., 2004; Niell et al., 2004; Risch et al., 2001), other studies aimed to achieve the importance of BRCA1 in sporadic CRC patients and response to therapy. Recently, reduced expression of BRCA1 and BRCA1-associated protein 1 (BAP1) were associated with poor prognosis of CRC (Abdul Aziz et al., 2016; Liu and Zhang, 2017; Lu et al., 2014; Tang et al., 2013) and more aggressive tumors (Tang et al., 2013; Yuanming et al., 2013). CRC patients whose tumors overexpressed BRCA1 and were treated with adjuvant chemotherapy and radiotherapy presented better overall survival and disease-free survival (Grabsch et al., 2006). Decreased BRCA2 expression in colorectal tumors was associated with high grade tumors and poorer overall survival (Grabsch et al., 2006; Wang et al., 2018).

7.1.3. γ -H2AX

γ -H2AX is a product of histone H2AX phosphorylation form carboxyl terminus and it is a sensitive marker for DNA double-strand breaks, which may lead to cancer or apoptosis (Ward and Chen, 2001). Using γ H2AX detection to determine the extent of DSB induction may help to detect precancerous cells, to stage cancers, monitor the effectiveness of cancer therapies and develop novel anticancer drugs (Bonner et al., 2008). Regarding CRC, only one study reported γ H2AX low expression association with more advanced tumors, but with no impact in patients' disease free survival (Beggs et al., 2012).

7.1.4. MRE11 and RAD51

MRE11 is one of the enzymes required to form the core of the MRN (MRE11-RAD50-NBS1) complex. The importance of MRE11 down-regulation in CRC prognosis was evaluated in two studies, but only one found association with features of tumor aggressiveness (proximal and high grade tumors) and poor overall and disease free survival in a subset of stage III CRC patients (Pavelitz et al., 2014). Other study with MRE11 showed that no significant association was identified between MRE11 expression and PFS (Ihara et al., 2016). In addition, no predictive value was found for changes MRE11 expression in colorectal neoplasms so far (Pavelitz et al., 2014).

RAD51 has essential roles in detection, signaling, protection and repair of DSBs and acts as the central catalyst of the error-free HR repair (Ibrahim et al., 2011). Recently, its protein overexpression in CRC patients was associated with presence of lymph node metastasis (Li et al., 2016) and poor overall and disease free survival (Tennstedt et al., 2013; Ihara et al., 2015; Li et al., 2016). No study has evaluated RAD51 predictive value in CRC.

7.1.5. XRCC2

In the HR pathway, XRCC2 protein (X-Ray Repair Complementing Defective Repair in Chinese Hamster Cells 2) is a key factor and contributes to the DNA DSBs repair and probably its expression is involved in either initiation or progression of tumorigenesis. In clinicopathological studies its overexpression is associated with more aggressive tumors (Qin et al., 2015; Xu et al., 2014; Zhang et al., 2017) with worse overall survival (Qin et al., 2015; Zhang et al., 2017). CRC patients with low XRCC2 mRNA levels presented better overall response rate after radiotherapy (Qin et al., 2015) and chemotherapy with FOLFOX (Zhang et al., 2017) treatments.

7.2. Non-homologous end joining

NHEJ is a pathway that, in order to guarantee the DNA molecule integrity, repairs DSBs without requiring a template. NHEJ uses short DNA sequences called microhomologies to guide repair the most accurately as possible. These microhomologies are often present in single-corded protrusions at the ends of DSB. Inadequate NHEJ leads to translocations and telomere fusion, which are hallmarks of tumor cells (Espejel et al., 2002; Budman and Chu, 2005). This mechanism involves the formation of a 70 kDa protein (Ku70) and a 86 kDa protein (Ku86) protein heterodimer with a DNA-dependent protein kinase C to the site of DNA damage (Grabsch et al., 2006). This heterodimer may have potential as a predictive assay for tumor radiosensitivity due to its involvement in the recognition or repair of radiation-induced DNA damage (Komuro et al., 2002). Downregulation of Ku70 was associated with poor disease-free survival, overall survival, lymphnodes invasion and advanced CRC tumors and loss of Ku70 might act as a biomarker to predict poor prognosis in patients with CRC (Komuro et al., 2002; Lu et al., 2014, 2015). Low expression of Ku86 in patients with rectal carcinoma and treated with radiotherapy were associated with better overall survival (Komuro et al., 2002).

7.2.1. DSB repair conclusion

In sum, reduced ATM expression was an independent prognostic biomarker of poor disease-free survival and overall survival and predict poor response to the therapy with early failure in CRC patients. Reduced expression of BRCA and BAP1 were also associated with more aggressive tumors, but conflicting results about its prognostic role impedes a conclusion. XRCC2 overexpression is related to more aggressive tumors with poor response to therapy and worse survival and progression-free disease. On its turn, NHEJ is represented by Ku70 and Ku86 and low expression of these proteins seems to positively affect prognosis and survival in CRC patients treated with radiotherapy.

8. Translesion synthesis: a new horizon in DNA repair and CRC

DNA replication in normal cells is regulated by mechanisms that ensure that it occurs only once per cycle. The replication and maintenance of the genome are absolute requirements for life. A proliferating cell must duplicate its entire complement of DNA with excellent precision, facing all kinds of setbacks (such as deleterious endogenous and environmental genotoxic agents), as well as the intrinsic chemical instability of the DNA molecule itself. (Hanawalt, 2007; Kunkel, 2003).

Translesion synthesis (TLS) is a mechanism that allows the DNA to continue to replicate even in the presence of lesions that would otherwise disrupt the process. This pathway is intended to tolerate the lesions for the maintenance of DNA replication and cell division by impeding replication fork stalling and preventing cell cycle arrest or induction to apoptosis. When a high-fidelity DNA polymerase encounters a lesion during the replicative process, it may be replaced by a low-fidelity 'translesion' one, which is capable of synthesizing DNA despite the presence of the lesion. After it has passed the replication fork the single-strand gap is repaired using template DNA on a sister chromatid, similar to the process used during homologous recombination (Waters et al., 2009; Lord and Ashworth, 2012).

Fifteen mammalian DNA polymerases have been identified and they have functions in the replication of genomic DNA, but the majority have an important role in the DNA repair. DNA polymerases are part of BER, NER, HR and NHEJ pathways, performing the synthesis of a new DNA strand or binding to DNA breaks (Lange et al., 2011). Among DNA polymerases, replicative polymerases are specific for undamaged DNA bases, but have little replication capacity when a lesion is encountered; in counterpart, translesion DNA polymerases Pol η (PolH), Polk (PolK), Pol ι (PolI) and REV1 (family Y), Pol ζ (family B) and Pol θ (PolQ) and Pol ν do not have proofreading or exonuclease activities. Thus, in

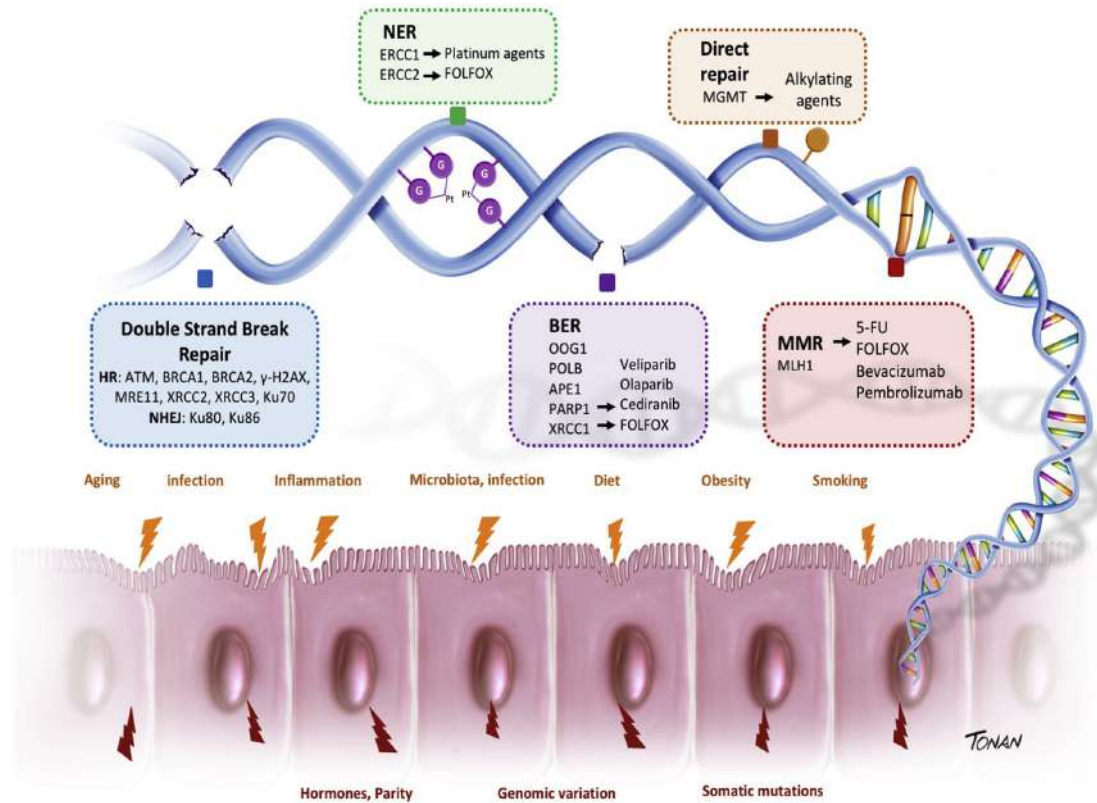


Fig. 1. The main DNA repair genes involved in colorectal cancer as prognostic or predictive biomarkers.

Table 8

Summarized role of the main DNA repair components expression with potential value as prognostic and/or predictive biomarkers in sporadic CRC.

Pathway	Component	Number of studies included*	Expression	Prognosis	Number of studies supporting	Response to treatment	Number of studies supporting	
DR	MGMT	19	Decreased or lost	More advanced and aggressive tumors	5	Alkylating agents	Partial response with no improvement in PFS	4
				Worse OS	2	Irinotecan	Better PFS	1
BER	OGG1	3	Decreased	More aggressive tumors	3	Unknown		1
				No prognostic value	1			
	MPG	2	Increased	More aggressive tumors	2	Unknown		0
				Shorter PFS	1			
	POLB	3	Increased	More aggressive tumors	4	Unknown		0
			Shorter OS	1				
	PARP1	5	Decreased	More aggressive tumors	3	Unknown		0
				Worse OS and PFS	2			
	XRCC1	4	Increased	More aggressive tumors	2	FOLFOX	No predictive value	1
				No prognostic value	1			
NER	ERCC1	13	Decreased	More advanced tumors	3	Oxaliplatin based	Better ORR, PFS and OS	5
				Better OS and PFS	9			
	ERCC2	3	Increased	No prognostic value	0	FOLFOX + RT	No predictive value	2
					2			
DSBR	ATM	4	Decreased	More aggressive tumors	2	Adjuvant CT + RT	Early failure	1
				Poorer OS and PFS	2			
	BRCA1	4	Decreased	More aggressive tumors	1	Adjuvant CT + RT	Early failure	1
				Conflicting results	2			
	Ku70	4	Decreased	More aggressive tumors	2	RT	Better OS and PFS	1
				Worse OS and PFS	2			
	XRCC2	3	Increased	More aggressive tumors	3	RT	Poorer ORR	1
				Worse OS and PFS	2	FOLFOX		1

DR: direct repair; BER: base excision repair; NER: nucleotide excision repair; DSB: double strand break repair; *studies that evaluate gene or protein expression in colorectal neoplasms; FOLFOX: Leucovorin + 5-Fluorouracil + Oxaplatin; CT: chemotherapy; RT: radiotherapy; PFS: progression free survival; ORR: overall response rate (complete and partial response); OS: overall survival.

the context of TLS, these DNA polymerases are not considered DNA repair enzymes, but tolerance factors of DNA damage. Therefore, this process is considered error-prone, because lower fidelity polymerases can incorporate wrong nucleotides to the DNA, being able to cause alterations in the sequence of DNA that can lead to mutations (Cazaux, 2010).

One study monitored the levels of DNA polymerases expression in patients with colorectal and breast cancers. Overexpression of *POLK* gene were observed in both diseases, especially in patients with more aggressive subtypes of breast cancer (Lemée et al., 2007). In the same study, the authors noted that the excess of *POLQ* in breast cancer was associated with worse prognosis, demonstrating that the upregulation of an error-prone polymerase may represent a new prognostic marker (Lemée et al., 2007). Increased expression of Polθ protein was also observed in stomach, lung and colon tumor tissues (Kawamura et al., 2004). In CRC patients, overexpression of Polθ was associated with lower survival rates (Pillaire et al., 2010). Recently, another study suggested that the induction of oxidative stress, chromosomal breaks and abnormalities observed in cells with overexpression of Polθ could be a strong contributor to the genetic instability that accompanies the development of cancer in these tissues (Cazaux, 2010). In fact, more recently, it was shown that Polθ is involved with BER pathway and processes AP sites by inserting an adenine residue and extending the polymerization, also exhibiting 5'-deoxyribose-phosphate lyase activity (Wood and Lange, 2014; Yousefzadeh et al., 2014). This fact considers TLS in CRC response to 5-FU-based chemotherapy (Matuo et al., 2010).

Polη is responsible for a variant of Xeroderma Pigmentosum (XP-V), a rare autosomal recessive disorder. Affected patients present an extreme sensitivity to light and an extremely high incidence of skin cancer. However, in contrast to other types of Xeroderma Pigmentosum, XP-V cells have proficient NER, but are unable to perform the translesion synthesis of the cyclobutane dimer of thymidine. Even though Polη has the ability to efficiently replicate the pyrimidine dimer, such enzyme is absent in patients altered affected by this disorder. (Cazaux, 2010).

As for Polk, it has the ability to perform the TLS of adducts such as benz[a]pyrene, and seems to have a function in the synthesis step in NER (Bétous et al., 2009). In CRC, low levels of Polk in tumor tissue were observed (Lemée et al., 2007). Polk was also implicated in the bypass of alkylated bases and abasic sites, in addition to being implicated in the extension of mispairing and small lesions to DNA (Lupari et al., 2012).

In summary, only one study conducted showed that overexpression of Polθ is related to a lower survival rate in CRC patients. This pathway is an opening for future clinical DNA molecular repair studies, with the objective of determining new prediction and predictive biomolecular factors.

9. Conclusion

Colorectal cancer staging still lacks the use of molecular biomarkers for both disease prognosis and therapeutic decision, which leads to disease misclassification and incorrect treatment. In this context, DNA repair-based molecular biomarkers may be a decisive tool in the diagnostic and therapeutic approach for colorectal cancer (Fig. 1). The growing body of evidence of changes in DNA repair components in the CRC progression and response to chemotherapy strengthen their potential as prognostic and predictive tools (Table 8). Nevertheless, proper diagnostic and randomized clinical trials must be conducted to ensure technical quality and clinical accuracy. Currently, the MMR pathway status and ERCC1 (NER) are turning into the most relevant predictive and prognostic biomarkers, which can be implemented in the clinical practice to tailor the chemotherapy regimens in CRC patients. Indeed, the use of both MMR status and ERCC1 protein expression are currently suggested by ESMO and NCCN for this purpose. Recently, the use of PARP1 inhibitors is achieving certain significance in the CRC

treatment scenario, mainly based on the rational of synthetic lethality in dMMR tumors. However, no definitive results were found so far. Likewise, the direct repair pathway functionality (represented by MGMT expression), has been studied regarding its response to alkylating agents, such as temozolomide, and its correlation with partial response but without improvement in progression-free survival, which still requires further studies to define its true importance in the treatment of CRC. Finally, there are also promising new data regarding the involvement of MPG and other BER proteins, which imbalance in CRC tumors correlates with poor clinical and pathological outcomes. Other DNA repair pathways such as DSB repair and TLS still need more attention from the scientific community to define its real role in CRC carcinogenesis and its potential as prognosis biomarkers.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Financial support

This research was supported by the Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS (FAPERGS/CNPq) – PRONEX Grant number 16/2551-000473-0).

References

- Abdul Aziz, Nurul Ainin, et al., 2016. A 19-Gene expression signature as a predictor of survival in colorectal cancer. *BMC Med. Genomics* 9 (1), 58. Retrieved. <http://bmcmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-016-0218-1>.
- Aguiar-Quesada, R., et al., 2007. Modulation of transcription by PARP-1: consequences in carcinogenesis and inflammation. *Curr. Med. Chem.* 14 (11), 1179–1187.
- Ahlquist, Terje, et al., 2008. Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers. *Mol. Cancer* 7 (1), 94. Retrieved. <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-7-94>.
- Aicindor, T., Beauger, N., 2011. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr. Oncol.* 18 (1), 18–25.
- Alhadheq, Abdullah M., et al., 2016. The effect of *poly(ADP-Ribose) polymerase-1* Gene 3'Untranslated region polymorphism in colorectal cancer risk among Saudi cohort. *Dis. Markers* 2016, 1–8. Retrieved. <https://www.hindawi.com/journals/dm/2016/8289293/>.
- Allan, James M., Travis, Lois B., 2005. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5 (12), 943–955. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1749>.
- Alshammari, Atika, Hazzaa, Manal Aly, Shalaby, Mohammad Saud Alanazi, Hesham Mahmoud, Saeed, 2014. Novel mutations of the PARG-1 Gene associated with colorectal cancer in the Saudi population. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15 (8), 3667–3673.
- Amatu, Alessio, et al., 2013. Promoter CpG Island hypermethylation of the DNA repair enzyme MGMT predicts clinical response to dacarbazine in a phase II study for metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 19 (8), 2265–2272.
- Amatu, A., et al., 2016. Tumor MGMT promoter hypermethylation changes over time limit temozolomide efficacy in a phase II trial for metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 27 (6), 1062–1067. Retrieved. <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdw071>.
- André, Thierry, et al., 2004. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New Engl. J. Med.* 350 (23), 2343–2351. Retrieved. <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa032709>.
- André, Thierry, et al., 2009. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J. Clin. Oncol.* 27 (19), 3109–3116.
- André, Thierry, et al., 2015. Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J. Clin. Oncol.* 33 (35), 4176–4187. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2015.63.4238>. Epub 2015 Nov 2.
- Aran, Veronica, Paula Victorino, Ana, Claudio Thuler, Luiz, Gil Ferreira, Carlos, 2016. Colorectal cancer: epidemiology, disease mechanisms and interventions to reduce onset and mortality. *Clin. Colorectal Cancer* 15 (3), 195–203. Retrieved. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.02.008>.
- Arnould, S., Hennebelle, L., Canal, P., Bugat, R., Guichard, Sylvie, 2003. Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur. J. Cancer* 39 (1), 112–119.
- Azambuja, Daniel B., et al., 2017. Prognostic impact of changes in base excision repair machinery in sporadic colorectal cancer. *Pathol. Res. Pract.* (November).
- Ballista-Hernández, Joan, et al., 2017. Mitochondrial DNA integrity is maintained by

- APE1 in carcinogen-induced colorectal cancer. *Mol. Cancer Res.* 15 (7), 831–841. Retrieved. <http://mcr.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1541-7786.MCR-16-0218>.
- Bardhan, Kankana, Liu, Kebin, 2013. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers* 5 (2), 676–713.
- Beggs, Andrew D., et al., 2012. Loss of expression of the double strand break repair protein ATM is associated with worse prognosis in colorectal cancer and loss of Ku70 expression is associated with CIN. *Oncotarget* 3 (11), 1348–1355. Retrieved. <http://oncotarget.com/abstract/694>.
- Bétous, Remy, et al., 2009. Role of TLS DNA Polymerases Eta and Kappa in Processing Naturally Occurring Structured DNA in Human Cells. *Mol. Carcinog.* 48 (4), 369–378.
- Biagi, James J., et al., 2011. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer. *Jama* 305 (22), 2335–2342. Retrieved. <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.2011.749>.
- Bohanec, Pierre, Labonte, Melissa J., Lenz, Heinz Josef, 2011. A review of excision repair cross-complementation group 1 in colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 10 (3), 157–164. Retrieved. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2011.03.024>.
- Boland, C.Richard., 2005. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. *Fam. Cancer* 4 (3), 211–218.
- Bonner, William M., et al., 2008. γ H2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8 (12), 957–967.
- Brahmer, Julie R., et al., 2010. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol.* 28 (19), 3167–3175.
- Bramsen, JesperBertram, et al., 2017. Molecular-subtype-specific biomarkers improve prediction of prognosis in colorectal cancer. *Cell Rep.* 19 (6), 1268–1280. Retrieved. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124717305399>.
- Brem, Reto, Hall, Janet, 2005. XRCC1 Is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res.* 33 (8), 2512–2520.
- Brose, Marcia S., et al., 2002. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (18), 1365–1372. Retrieved. <http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/94.18.1365%5Cnhttp://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12237282&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnapapers2://publication/uuid/A9F3F54F-9ED7-44D9-B56A-1AB94A9FEACE>.
- Budman, Joe, Chu, Gilbert, 2005. Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *EMBO J.* 24 (4), 849–860. Retrieved. <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7600563>.
- Bupathi, Manojkumar, Wu, Christina, 2016. Biomarkers for immune therapy in colorectal cancer: mismatch-repair deficiency and others. *J. Gastrointest. Oncol.* 7 (5), 713–720. Retrieved. <http://jgo.amegroups.com/article/view/8939/html>.
- Calegari, M.A., et al., 2017. A phase 2 study of temozolomide in pretreated metastatic colorectal cancer with MGMT promoter methylation. *Br. J. Cancer* 116 (10), 1279–1286.
- Cazaux, C., 2010. Genetic instability as a driver for oncogenesis. *Bull. Cancer* 97 (11), 1241–1251. Retrieved. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007455115307463>.
- Chang, Peter MuHsin, et al., 2009. ERCC1 Codon 118 C→T polymorphism associated with ERCC1 expression and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 100 (2), 278–283.
- Choueir, Michel B., et al., 2015. ERCC1 and TS expression as prognostic and predictive biomarkers in metastatic colon cancer. *PLoS One* 10 (6), 1–12. Retrieved. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126898>.
- D'Incalci, Maurizio, Citti, Lorenzo, Taverna, Pietro, Catapano, Carlo V., 1988. Importance of the DNA repair enzyme O6-Alkyl guanine alkyltransferase (AT) in cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* 15 (4), 279–292.
- Dbouk, Hashema, Tawil, Ayman, Nasr, Fahd, Kandakarjian, Loucine, Abou-Merhi, Raghida, 2007. Significance of CEA and VEGF as diagnostic markers of colorectal cancer in Lebanese patients. *Open Clin. Cancer J.* 1, 1–5. Retrieved. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2490598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- De Maglio, G., et al., 2015. MGMT promoter methylation status in brain metastases from colorectal cancer and corresponding primary tumors. *Future Oncol.* 11 (8), 1201–1209.
- Des Guetz, Gaëtan, Schischmanoff, Olivier, et al., 2009a. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur. J. Cancer* 45 (10), 1890–1896. Retrieved. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804909002810>.
- Des Guetz, Gaëtan, Uzzan, Bernard, et al., 2009b. Microsatellite instability does not predict the efficacy of chemotherapy in metastatic colorectal cancer. A systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res.* 29 (5), 1615–1620.
- Devaud, N., Gallinger, S., 2013. Chemotherapy of MMR-deficient colorectal cancer. *Fam. Cancer* 12 (2), 301–306.
- D'Errico, M., Pascucci, B., Iorio, E., Van Houten, B., Dogliotti, E., 2013. The role of CSA and CSB protein in the oxidative stress response. *Mech. Ageing. Dev.* 134 (5-6), 261–269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2013.03.006>. Epub 2013 Apr 3.
- Donizetti Silva, Tiago, et al., 2013. DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. *Oncol. Lett.* 6 (6), 1687–1692.
- Duffy, M.J., 2001. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin. Chem.* 47 (4), 624–630.
- Dziaman, Tomasz, Banaszkiwicz, Zbigniew, et al., 2014a. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and uric acid as efficient predictors of survival in colon cancer patients. *Int. J. Cancer* 134 (2), 376–383.
- Dziaman, Tomasz, Ludwiczak, Hubert, et al., 2014b. PARP-1 expression is increased in colon adenoma and carcinoma and correlates with OGG1. *PLoS One* 9 (12), 1–19.
- Elsaleh, Hany, et al., 2000. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 355 (9217), 1745–1750. Retrieved. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600022613>.
- Espejel, Silvia, et al., 2002. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J.* 21 (9), 2207–2219.
- Esteller, Manel, Herman, James G., 2004. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 23, 1–8.
- Esteller, Manel, Hamilton, Stanley R., Burger, Peter C., Baylin, Stephen B., Herman, James G., 1999. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 58, 793–797.
- Esteller, Manel, et al., 2001. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 61, 4689–4692.
- Farrington, Susan M., et al., 2005. Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am. J. Hum. Genet.* 77 (1), 112–119. Retrieved. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1226182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Farzanehfar, Mohammadreza, et al., 2013. Evaluation of methylation of MGMT (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) gene promoter in sporadic colorectal cancer. *DNA Cell Biol.* 32 (7), 371–377. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23705976>.
- Fearon, Eric R., 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6 (1), 479–507. Retrieved. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-011110-130235>.
- Fearon, Eric Ft, Vogelstein, Bert, 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61 (1), 759–767.
- Fleck, O., 2004. DNA repair. *J. Cell Sci.* 117 (4), 515–517. Retrieved. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00952>.
- Frederiksen, B.L., Jørgensen, T., Brasso, K., Holten, I., Osler, M., 2010. Socioeconomic position and participation in colorectal cancer screening. *Br. J. Cancer* 103 (10), 1496–1501. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6605962>.
- Friedman, Henry S., et al., 1995. Activity of temozolomide in the treatment of Central nervous system tumor xenografts activity of temozolomide in the treatment of Central nervous system. *Cancer Res.* 55, 2853–2857.
- Friedman, Henry S., et al., 2002. O6-benzylguanine-mediated enhancement of chemotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 1, 943–948.
- Funkhouser, William K., et al., 2012. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J. Mol. Diagn.* 14 (2), 91–103. Retrieved. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.11.001>.
- Galon, J., 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313 (5795), 1960–1964. Retrieved. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1129139>.
- Gavin, Patrick G., et al., 2012. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin. Cancer Res.* 18 (23), 6531–6541.
- Gerson, Stanton L., 2004. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 4 (4), 296–307. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1319>.
- Grabsch, Heike, et al., 2006. Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 12 (5), 1494–1500.
- Gray, Stacy W., et al., 2017. Medical oncologists experiences in using genomic testing for lung and colorectal cancer care. *J. Oncol. Pract.* 13 (3), e185–96. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28095174>.
- Grimminger, P.P., et al., 2012. TS and ERCC-1 mRNA expressions and clinical outcome in patients with metastatic colon cancer in CONFIRM-1 and -2 clinical trials. *Pharmacogenomics J.* 12 (5), 404–411. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21788964>.
- Guastadisegni, C., Colafranceschi, M., Ottini, L., Dogliotti, E., 2010. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur. J. Cancer.* 46 (15), 2788–2798. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.05.009>. Epub 2010 Jun 4.
- Guinney, Justin, et al., 2015. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* 21 (11), 1350–1356. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.3967>.
- Han, JaeJoon, et al., 2014. Combination of TRAP1 and ERCC1 expression predicts clinical outcomes in metastatic colorectal cancer treated with oxaliplatin/5-Fluorouracil. *Cancer Res. Treat.* 46 (1), 55–64. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520224%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3918528>.
- Hanawalt, Philip C., 2007. Paradigms for the three Rs: DNA replication, recombination and repair. *Mol. Cell* 28 (5), 702–707.
- Hansen, T.F., et al., 2011. The relationship between serum vascular endothelial growth factor A and microsatellite instability in colorectal cancer. *Colorectal Dis.* 13 (9), 984–988. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594200>.
- Hemminki, Akseli, Mecklin, Jukka-Pekka, Järvinen, Heikki, Aaltonen, Lauri A., Joensuu, Heikki, 2000. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 119 (4), 921–928. Retrieved. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508500029541>.
- Herrera, Mercedes, et al., 2009. Differences in repair of DNA cross-links between lymphocytes and epithelial tumor cells from colon cancer patients measured in vitro with the comet assay. *Clin. Cancer Res.* 15 (17), 5466–5472.
- Hewish, Madeleine, Lord, Christopher J., Martin, Sarah A., Cunningham, David,

- Ashworth, Alan, 2010. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7 (4), 197–208. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrclinonc.2010.18>.
- Hochhauser, D., et al., 2013. A phase II study of temozolomide in patients with advanced aerodigestive tract and colorectal cancers and methylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter. *Mol. Cancer Ther.* 12 (5), 809–818. Retrieved. <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-12-0710>.
- Hsieh, Peggy, Kazuhiko, Yamana, 2009. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 129 (7–8), 391–407.
- Huang, Ming-Yii, et al., 2008. ERCC2 2251A&C genetic polymorphism was highly correlated with early relapse in high-risk stage II and stage III colorectal cancer patients: a preliminary study. *BMC Cancer* 8 (50) Retrieved. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2262891&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Huang, Ming-Yii, et al., 2013. Predictive value of ERCC1, ERCC2, and XRCC1 over-expression for stage III colorectal cancer patients receiving FOLFOX-4 adjuvant chemotherapy. *J. Surg. Oncol.* 108 (7), 457–464.
- Huang, Ming-Yii, et al., 2017. Relationship between expression of proteins ERCC1, ERCC2, and XRCC1 and clinical outcomes in patients with rectal cancer treated with FOLFOX-Based preoperative chemoradiotherapy. *World J. Surg.* 41 (11), 2884–2897. Retrieved. <http://link.springer.com/10.1007/s00268-017-4070-z>.
- Hutchins, G., et al., 2011. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 29 (10), 1261–1270. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.30.1366>. Epub 2011 Mar 7.
- Ibrahim, A.E.K., et al., 2011. Sequential DNA methylation changes are associated with DNMT3B overexpression in colorectal neoplastic progression. *Gut* 60 (4), 499–508. Retrieved. <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2010.223602>.
- İçli, Fikri, et al., 1999. Phase II study of cisplatin and dacarbazine for metastatic colorectal carcinoma resistant to 5-Fluorouracil. *Oncology* 56 (4), 297–300.
- Ihara, Keisuke, et al., 2016. Expression of DNA double-strand break repair proteins predicts the response and prognosis of colorectal cancer patients undergoing oxaliplatin-based chemotherapy. *Oncol. Rep.* 35 (3), 1349–1355. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2015.4488>. Epub 2015 Dec 16.
- Izkowitz, S.H., 2004. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287 (1), G7–17. Retrieved. <http://ajpgi.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpgi.00079.2004>.
- Iwatsuki, Masaaki, et al., 2009. A platinum agent resistance gene, POLB, is a prognostic indicator in colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 100 (3), 261–266.
- Iyer, R., Pluciennik, A., Burdett, V., Modrich Paul, L., 2006. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem. Rev.* 106 (2), 302–323.
- Jonsson, C., et al., 2010. DNA adducts in normal colonic mucosa from healthy controls and patients with colon polyps and colorectal carcinomas. *Mutagenesis* 25 (5), 499–504. Retrieved. <https://academic.oup.com/mutage/article-lookup/doi/10.1093/mutage/geq033>.
- Ju, HaiXing, et al., 2011. Distinct profiles of epigenetic evolution between colorectal cancers with and without metastasis. *Am. J. Pathol.* 178 (4), 1835–1846.
- Kaelin, William G., 2005. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 5 (9), 689–698.
- Kassem, Amira B., et al., 2017. ERCC1 and ERCC2 as predictive biomarkers to oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal cancer patients from Egypt. *Exp. Mol. Pathol.* 102 (1), 78–85. Retrieved. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.01.006>.
- Kawakami, Hisato, Zaanani, Aziz, Sinicrope, Frank A., 2015. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* 16 (7), 30.
- Kawamura, Kiyoko, et al., 2004. DNA polymerase ϵ is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. *Int. J. Cancer* 109 (1), 9–16.
- Kelderman, Sander, Schumacher, Ton N., Kvistborg, Pia, 2015. Mismatch repair-deficient cancers are targets for anti-PD-1 therapy. *Cancer Cell* 28 (1), 11–13. Retrieved. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.06.012>.
- Kelley, Mark R., Parsons, Stephen H., 2001. Redox regulation of the DNA repair function of the human AP endonuclease Ape1/ref-1. *Antioxid. Redox Signal.* 3 (4), 671–683.
- Khan, O.A., et al., 2008. A phase II trial of lomeguatrib and temozolomide in metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 98 (10), 1614–1618. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6604366>.
- Kheirelsaid, Elrasheid A.H., et al., 2013. Mismatch repair protein expression in colorectal cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* 4 (4), 397–408. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24294512%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3819778>.
- Kim, George P., et al., 2007. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a national cancer institute-national surgical adjuvant breast and bowel project collaborative study. *J. Clin. Oncol.* 25 (7), 767–772.
- Kim, Jin C., et al., 2010. Promoter methylation of specific genes is associated with the phenotype and progression of colorectal adenocarcinomas. *Ann. Surg. Oncol.* 17 (7), 1767–1776.
- Kinsella, Timothy J., 2009. Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin. Cancer Res.* 15 (6), 1853–1859.
- Kirchhoff, Tomas, et al., 2004. Frequency of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected ashenazijewish patients with colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (1), 68–70. Retrieved. <http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/djh006%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14709740>.
- Komuro, Yasuhiro, et al., 2002. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer* 95 (6), 1199–1205.
- Kondo, Shohei, Toyokuni, Shinya, Tanaka, Tomoyuki, 2000. Overexpression of the hOGG1 gene and high 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) lyase activity in human colorectal carcinoma: regulation mechanism of the 8-OHdG level in DNA. *Clin. Cancer Res.* 6 (April), 1394–1400.
- Koopman, M., et al., 2009. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 100 (2), 266–273. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6604867>.
- Krtolica, Kovičjka, et al., 2007. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J. Gastroenterol.* 13 (8), 1187–1194.
- Kuan, JenChun, et al., 2015. DNA methylation combinations in adjacent normal colon tissue predict cancer recurrence: evidence from a clinical cohort study. *PLoS One* 10 (3), 1–11. Retrieved. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123396>.
- Kunkel, Thomas A., 2003. Considering the cancer consequences of altered DNA polymerase function. *Cancer Cell.* 3 (2), 105–110.
- Lange, Sabine S., Takata, Kei-ichi, Wood, Richard D., 2011. DNA polymerases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11 (2), 96–110. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature10760>.
- Lavrik, Olga I., et al., 1998. Subunits of human replication protein a are crosslinked by photoreactive primers synthesized by DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 26 (2), 602–607.
- Le, D.T., et al., 2015. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *New Engl. J. Med.* 372 (26), 2509–2520.
- Leguisamo, Natalia M., et al., 2017. Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy. *Oncotarget* 8 (33), 54199–54214.
- Lemée, F., et al., 2007. Characterization of promoter regulatory elements involved in downexpression of the DNA polymerase ϵ in colorectal cancer. *Oncogene* 26 (23), 3387–3394. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1210116>.
- Li, Guo-Min, 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18 (1), 85–98. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/cr.2007.115>.
- Li, P., et al., 2013. ERCC1, defective mismatch repair status as predictive biomarkers of survival for stage III colon cancer patients receiving oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Br. J. Cancer* 108 (6), 1238–1244. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.2013.83>.
- Li, Mu-Xing, et al., 2016. Excision repair cross-complementation group 1 is a prognostic biomarker in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Chin. Med. J.* 129 (5), 586–593. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26904994%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4804441>.
- Lindahl, Tomas, Wood, Richard D., 1999. Quality control by DNA repair. *Science* 286 (5446), 1897–1905.
- Liu, H.Y., Zhang, C.J., 2017. Identification of differentially expressed genes and their upstream regulators in colorectal cancer. *Cancer Gene Ther.* 27, 1–7. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/cgt.2017.8>.
- Llosa, Nicolas J., et al., 2015. Checkpoints 5 (1), 43–51.
- Lord, Christopher J., Ashworth, Alan, 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481 (7381), 287–294. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature10760>.
- Lu, Yuanfang, Gao, Jingyan, Lu, Yuanming, 2014. Downregulated ku70 and ATM associated to poor prognosis in colorectal cancer among Chinese patients. *Oncotargets Ther.* 7, 1955–1961.
- Lu, Yuanfang, Gao, Jingyan, Lu, Yuanming, 2015. Down-expression pattern of Ku70 and p53 coexisted in colorectal cancer. *Med. Oncol.* 32 (4), 98.
- Lubbe, Steven J., Bernardo, Maria Chiara Di, Chandler, Ian P., Houlston, Richard S., 2009. Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with MUTHY mutation. *J. Clin. Oncol.* 27 (24), 3975–3980.
- Lupari, Eliana, et al., 2012. Pol kappa partially rescues MMR-Dependent cytotoxicity of O 6-methylguanine. *DNA Repair* 11 (6), 579–586. Retrieved. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.03.004>.
- Lynch, 1966. Hereditary factors in cancer. *Arch Intern. Med.* 117, 206–212.
- Matuo, Renata, et al., 2010. DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP. *Biochem. Pharmacol.* 79 (2), 147–153.
- Maynard, Scott, Schurman, Shepherd H., Harboe, Charlotte, de Souza-Pinto, Nadja C., Bohr, Wilhelm A., 2009. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30 (1), 2–10.
- Mecklin, J.P., 1987. Frequency of hereditary colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 93 (5), 1021–1025. Retrieved. <papers://5aefcfa-9729-4def-92fe-c46e5cd7cc81/Paper/p76637>.
- Melis, Joost P.M., van Steeg, Harry, Luijten, Mirjam, 2013. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxid. Redox Signal.* 18 (18), 2409–2419. Retrieved. <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.5036>.
- Migliore, Lucia, Migheli, Francesca, Spisni, Roberto, Copped, Fabio, 2011. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011.
- Miyakura, Yasuyuki, et al., 2001. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 121 (6), 1300–1309. Retrieved. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508501896049>.
- Muller, Mike F., Ibrahim, Ashraf E.K., Arends, Mark J., 2016. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 469 (2), 125–134. Retrieved. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>.
- Myint, Zin W., Goel, Gaurav, 2017. Role of modern immunotherapy in gastrointestinal malignancies: a review of current clinical progress. *J. Hematol. Oncol.* 10 (1), 86. Retrieved. <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0454-7>.
- Nagasaka, Takeshi, et al., 2008. Methylation pattern of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis. *Int. J.*

- Cancer 122 (11), 2429–2436.
- Nagel, Z.D., et al., 2014. Multiplexed DNA repair assays for multiple lesions and multiple doses via transcription inhibition and transcriptional mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (18), E1823–32. Retrieved. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1401182111>.
- Natarajan, A.T., et al., 1992. Chromosomal localization of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by in situ hybridization. *Mutagenesis* 7 (1), 83–85.
- NCCN, 2017. Colon cancer. NCCN Guidelines. pp. 1–832. Retrieved. www.nccn.org.
- Nicholson, Brian D., et al., 2015. Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 12 (12), 1–214.
- Niell, Bethany L., et al., 2004. BRCA1 and BRCA2 founder mutations and the risk of colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 96 (1), 15–21.
- Nielsen, M., Morreau, H., Vasen Hans, F.A., Hes Frederik, J., 2011. MUTYH-associated polyposis (MAP). *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 79 (1), 1–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.05.011>. Epub 2010 Jul 21.
- Nilsson, Torbjörn K., Löf-Öhlin, Zarah M., Sun, Xiao Feng, 2013. DNA methylation of the p14ARF, RASSF1A and APC1A genes as an independent prognostic factor in colorectal cancer patients. *Int. J. Oncol.* 42 (1), 127–133.
- O'Connell, Michael J., et al., 2008. Survival following recurrence in stage II and III colon cancer: findings from the ACCENT data set. *J. Clin. Oncol.* 26 (14), 2336–2341.
- Obtulowicz, Tomasz, et al., 2010. Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. *Mutagenesis* 25 (5), 463–471.
- Oliver, JaimeAntonio, et al., 2014. Prognostic impact of MGMT promoter methylation and MGMT and CD133 expression in colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 14 (1), 511. Retrieved. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-511>.
- Overbeek, Lucia I.H., et al., 2008. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am. J. Pathol.* 32 (8), 1246–1251. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677806>.
- Park, David J., et al., 2001. A xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res.* 61 (24), 8654–8658. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751380>.
- Parlanti, Eleonora, et al., 2012. The cross talk between pathways in the repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mouse and human cells. *Free Radic. Biol. Med.* 53 (11), 2171–2177. Retrieved. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.593>.
- Pavelitz, Thomas, et al., 2014. MRE11-deficiency associated with improved long-term disease free survival and overall survival in a subset of stage III colon cancer patients in randomized CALGB 89803 trial. *PLoS One* 9 (10), e108483.
- Pegg, A.E., 1990. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogens and therapeutic agents. *Cancer Res.* 50, 6119–6129.
- Phipps, Amanda L., et al., 2015. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology* 148 (1), 77–87.e2.
- Pietrantonio, F., et al., 2014. Activity of temozolomide in patients with advanced chemorefractory colorectal cancer and MGMT promoter methylation. *Ann. Oncol.* 25 (2), 404–408.
- Pietrantonio, Filippo, et al., 2015. Dose-dense temozolomide in patients with MGMT-silenced chemorefractory colorectal cancer. *Target. Oncol.* 11 (3), 337–343.
- Pillaire, M.J., et al., 2010. A 'DNA replication' signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. *Oncogene* 29 (6), 876–887. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncr.2009.378>.
- Pogue-Geile, Kay, et al., 2013. Defective mismatch repair and benefit from bevacizumab for colon cancer: findings from NSABP C-08. *J. Natl. Cancer Inst.* 105 (13), 989–992.
- Popat, S., Hubner, R., Houlston, R.S., 2005. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* 23 (3), 609–618.
- Potter, J.D., 1999. Colorectal cancer: molecules and populations. *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (11), 916–932.
- Qin, Chang-Jiang, et al., 2015. XRCC2 as a predictive biomarker for radioresistance in locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative radiotherapy. *Oncotarget* 6 (31), 32193–32204.
- Reardon, Joyce T., Vaisman, Alexandra, Chaney, Stephen G., Sancar, Aziz, 1999. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and bis-aceto- ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum (IV) (JM216) platinum (IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res.* 59, 3968–3971.
- Ribic, 2003. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluoracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *New Engl. J. Med.* 349 (3), 347–357. Retrieved. [papers://c7998d8f-d25c-4cbe-be65-53ebf8851ccc/Paper/p799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14027550/).
- Risch, Harvey A., et al., 2001. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 68 (3), 700–710. Retrieved. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707631097>.
- Rouleau, Michèle, Patel, Anand, Hendzel, Michael J., Kaufmann, Scott H., Poirier, Guy G., 2010. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10 (4), 293–301. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2812>.
- Ryan, E., Sheahan, K., Creavin, B., Mohan, H.M., Winter, D.C., 2017. The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: a rationale for routine testing. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 116, 38–57. Retrieved. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.05.006>.
- Saebø, Mona, et al., 2006. Increased mRNA expression levels of ERCC1, OGG1 and RAI in colorectal adenomas and carcinomas. *BMC Cancer* 6, 208 Retrieved <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16914027%5C> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1562435&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Santos, Juliana C., et al., 2014. Effect of APE1 T2197G (Asp148Glu) polymorphism on APE1, XRCC1, PARP1 and OGG1 expression in patients with colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (10), 17333–17343.
- Sarasin, A., Kaufmann, A., 2008. Overexpression of DNA repair genes is associated with metastasis: a new hypothesis. *Mutat. Res.* 659 (1–2), 49–55. Retrieved. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574208000033>.
- Sargent, Daniel J., et al., 2010. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J. Clin. Oncol.* 28 (20), 3219–3226.
- Sartore-Bianchi, A., et al., 2017. Digital PCR assessment of MGMT promoter methylation coupled with reduced protein expression optimises prediction of response to alkylating agents in metastatic colorectal cancer patients. *Eur. J. Cancer.* 71, 43–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2016.10.032>. Epub 2016 Dec 18.
- Schirripa, Marta, Procaccio, Letizia, 2017. The role of pharmacogenetics in the new ESMO colorectal cancer guidelines. *Pharmacogenomics* 18, 197–200.
- Seghal, Rishabh, et al., 2014. Lynch syndrome: an updated review. *Genes* 5 (3), 497–507.
- Sepulveda, Antonia R., et al., 2017. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 35 (13), 1453–1496.
- Shacham-Shmueli, Einat, et al., 2011. Response to temozolomide in patients with metastatic colorectal cancer with loss of MGMT expression: a new approach in the era of personalized medicine? *J. Clin. Oncol.* 29 (10), 1–4.
- Shen, Lanlan, et al., 2005. MGMT promoter methylation and Field defect in sporadic colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 97 (18), 1330–1338.
- Shima, Kaori, et al., 2011. MGMT promoter methylation, loss of expression and prognosis in 855 colorectal cancers. *Cancer Cause Control* 22 (2), 301–309.
- Shirota, Y., et al., 2001. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 19 (23), 4298–4304. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11731512>.
- Siegel, Rebecca L., et al., 2017. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* 67 (3), 177–193.
- Sinha, Rupal, et al., 2013. Kras Gene mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT Gene promoter hypermethylation: indicators of tumor staging and metastasis in adenocarcinomatous sporadic colorectal cancer in Indian population. *PLoS One* 8 (4), 1–8.
- Sinicropo, Frank A., et al., 2011. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 103 (11), 863–875.
- Slyskova, Jana, et al., 2012. Functional, genetic, and epigenetic aspects of base and nucleotide excision repair in colorectal carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 18 (21), 5878–5887.
- Spivak, Graciela, 2015. Nucleotide excision repair in humans Graciela. *DNA Repair* 36 (10), 13–18.
- Spivak, Graciela., 2016. Transcription-coupled repair: an update. *Arch. Toxicol.* 90 (11), 2583–2594.
- Storr, S.J., Woolston, C.M., Martin, S.G., 2012. Base excision repair, the redox environment and therapeutic implications. *Curr. Mol. Pharmacol.* 5 (1), 88–101. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&listuids=22122466>.
- Sulzyc-Bielicka, Violetta, et al., 2012. Colorectal cancers differ in respect of PARP-1 protein expression. *Pol. J. Pathol.* 2, 87–92.
- Svrcek, M., et al., 2010. Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut* 59 (11), 1516–1526. Retrieved. <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2009.194787>.
- Tang, Jianjun, et al., 2013. Prognostic significance of BRCA1-associated protein 1 in colorectal cancer. *Med. Oncol.* 30 (2), 541.
- Taube, Janis M., et al., 2014. Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy.
- Tennstedt, Pierre, et al., 2013. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 132 (9), 2118–2126.
- Thorslund, Tina, et al., 2005. Cooperation of the cockayne syndrome group B protein and poly (ADP-Ribose) polymerase 1 in the response to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* 25 (17), 7625–7636.
- Torgovnick, Alessandro, Schumacher, Björn, 2015. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front. Genet.* 6, 157. Retrieved. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00157/abstract>.
- Tsikitis, Vassiliki L., Larson, David W., Huebner, Marianne, Lohse, Christine M., Thompson, Patricia A., 2014. Predictors of recurrence free survival for patients with stage II and III colon cancer. *BMC Cancer* 14 (1), 336. Retrieved. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4029910&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tuominen, Rainer, et al., 2015. MGMT promoter methylation is associated with temozolomide response and prolonged progression-free survival in disseminated cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* 136 (12), 2844–2853.
- Uchida, Kazumi, Danenberg, Peter V., Danenberg, Kathleen D., Grem, Jean L., 2008. Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, ERCC1, and thymidine phosphorylase gene expression in primary and metastatic gastrointestinal adenocarcinoma tissue in patients treated on a phase I trial of oxaliplatin and capecitabine. *BMC Cancer* 8 (1), 386–396. Retrieved. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-8-386>.
- Van Cutsem, Eric, et al., 2016. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 27 (8), 1386–1422.
- Vogelstein, Bert, et al., 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319 (9), 525–532.

- Walter, T., et al., 2015. O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in neuroendocrine tumours: prognostic relevance and association with response to alkylating agents. *Br. J. Cancer* 112 (3), 523–531. Retrieved. <http://www.nature.com/doi/10.1038/bjc.2014.660>.
- Wang, Gui-Hua, Zhao, Chun-Mei, Huang, Ying, Wang, Wei, Zhang, Shu, Wang, Xudong, 2018. BRCA1 and BRCA2 expression patterns and prognostic significance in digestive system cancers. *Hum. Pathol.* 71, 135–144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2017.10.032>.
- Waters, L., et al., 2009. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73 (1), 134–154. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00034-08>.
- Ward, Irene M., Chen, Junjie, 2001. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276 (51), 47759–47762.
- Webber, Elizabeth M., Kauffman, Tia L., Connor, Elizabeth O., Goddard, Katrina A.B., 2015. Systematic review of the predictive effect of MSI Status in colorectal cancer patients undergoing 5FU-based chemotherapy. *BMC Cancer* 15 (1), 156. Retrieved. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1093-4>.
- Westra, Jantine L., et al., 2005. Determination of TP53 mutation is more relevant than microsatellite instability status for the prediction of disease-free survival in adjuvant-treated stage III colon cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 23 (24), 5635–5643.
- Whitaker, Amy M., Schaich, Matthew A., Smith, Mallory R., Flynn, Tony S., Freudenthal, Bret D., 2017. Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. *Front. Biosci. (Landmark Edition)* 22, 1493–1522. Retrieved. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28199214> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5567671>.
- Wood, R.D., Lange, S.S., 2014. Breakthrough for a DNA break-preventer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (8), 2864–2865. Retrieved. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1400512111>.
- Xiong, Hui, Zhang, Jiangnan, 2017. Expression and clinical significance of ATM and PUMA gene in patients with colorectal cancer. *Oncol. Lett.* 7825–7828. Retrieved. <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.7181>.
- Xu, K., et al., 2014. XRCC2 promotes colorectal cancer cell growth, regulates cell cycle progression, and apoptosis. *Medicine* 93 (28), e294.
- Yousefzadeh, Matthew J., et al., 2014. Mechanism of suppression of chromosomal instability by DNA polymerase POLQ. *PLoS Genet.* 10 (10), 1–15.
- Yuanming, Lu, Lineng, Zhang, Baorong, Song, Junjie, Peng, Sanjun, Cai, 2013. BRCA1 and ERCC1 mRNA levels are associated with lymph node metastasis in Chinese patients with colorectal cancer. *BMC Cancer* 13 (1), 103. Retrieved. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3599524&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Zaanan, A., et al., 2009. 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. *Ann. Oncol.* 21 (4), 772–780.
- Zhang, J., Stevens Malcolm, F.G., Bradshaw Tracey, D., 2012. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* 5 (1), 102–114.
- Zhang, Jun Xiao, et al., 2015a. Candidate colorectal cancer predisposing gene variants in Chinese early-onset and familial cases. *World J. Gastroenterol.* 21 (14), 4136–4140.
- Zhang, Yan, et al., 2015b. A prognostic analysis of 895 cases of stage III colon cancer in different colon subsites. *Int. J. Colorectal Dis.* 30 (9), 1173–1183.
- Zhang, Le, et al., 2016a. MGMT in colorectal cancer: a promising component of personalized treatment. *Tumor Biol.* 37 (8), 11443–11456.
- Zhang, Cong Min, et al., 2016b. Role of deficient mismatch repair in the personalized management of colorectal cancer. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13 (9), E892.
- Zhang, Yong Zhou, et al., 2017. XRCC2-deficient cells are highly sensitive to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* 43 (3), 1207–1219.
- Zheng, Chen-guo, Jin, Chun, Ye, Le-chi, Chen, Nian-zhao, Chen, Zong-Jing, 2015. Clinicopathological significance and potential drug target of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in colorectal cancer: a meta-analysis. *Tumor Biol.* 36 (8), 5839–5848. Retrieved. <http://link.springer.com/10.1007/s13277-015-3254-0>.

3.2. CAPÍTULO II

ARTIGO:

The role of Double Strand Break Repair, Translesion Synthesis and Interstrand Crosslinks in Colorectal Cancer progression – clinicopathological data and survival.

Artigo submetido para publicação na BMC Cancer

Impact factor: 3.228

Qualis A2

(Artigo está com seu material suplementar ao longo do texto para facilitar a leitura)

Title:

The role of Double Strand Break Repair, Translesion Synthesis and Interstrand Crosslinks in Colorectal Cancer progression – clinicopathological data and survival.

Gustavo Andreazza Laporte^{1,3,*}, Natália Meirelles Leguisamo^{2,*}, Helena de Castro e Gloria³, Daniel de Barcellos Azambuja¹, Antonio Nocchi Kalil^{1,3}, Jenifer Saffi^{3§}

¹Division of Surgical Oncology, Santa Rita Hospital/ISCOMPA, Porto Alegre, Brazil.

²Institute of Cardiology of Rio Grande do Sul/University Foundation of Cardiology, Porto Alegre, Brazil.

³Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre/UFCSPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Are co-first authors and have contributed equally to this study.

§Corresponding author

Address correspondence to:

Profa. Dr. Jenifer Saffi

Laboratory of Genetic Toxicology/ Federal University of Health Sciences of Porto Alegre/UFCSPA

Porto Alegre – RS – Brazil

E-mail: jenifers@ufcspa.edu.br

Phone: + 55 51 99997-7252

Institutional review board statement: This study was approved by the Institutional Review Board of Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre and Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (09761613.4.0000.5345, 34145614.9.0000.5335, 58299916.3.00005335, 58299916.3.3001.5345).

Conflict of interest: No commercial interest involved in this study.

Funding: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES, Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul - FAPERGS.

Availability of data and materials: All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

Authors' contributions: GAL and NML conceived of the presented idea. GAL and NML developed the theory. GAL, HCG, DBA performed the experiment. GAL verified the analytical methods. JS and ANK supervised the findings of this work. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

Abstract

Aim: To evaluate the prognostic value of molecular modulation of double strand break (DSBR) - *XRCC2* and *XRCC5* - core components; DNA damage tolerance/translesion synthesis (DDT/TLS) - *POLH*, *POLK* and *POLQ* – and, finally, of interstrand crosslink repair (ICLR) -*DCLRE1A* – pathways in sporadic colorectal cancer (CRC) progression.

Method: Tumour specimens and matched health mucosal tissues from 47 patients with CRC who underwent surgery were assessed for gene expression of *XRCC2*, *XRCC5*, *POLH*, *POLK*, *POLQ* and *DCLRE1A* by qRT-PCR; protein expression of Polk, Ku80, p53, Ki67 and mismatch repair MLH1 and MSH2 components were assessed by immunohistochemistry (IHC); CpG island promoter methylation of *XRCC5*, *POLH*, *POLK*, *POLQ* and *DCLRE1A* was performed. Uni and multivariate analyses were employed to determine associations with clinicopathological features and prognostic value of molecular data.

Results: Neoplastic tissues exhibited induction of *POLK* ($p<0.001$) and *DCLRE1A* ($p<0.001$) expression and low expression of *POLH* ($p<0.001$) and *POLQ* ($p<0.001$) in comparison to healthy paired mucosa. Low expression of *POLH* was associated to mucinous histology and T1-T2 tumors ($p=0.038$); low tumour expression of *POLK* was associated to distant metastases ($p=0.042$). *POLK* promoter methylation was associated to early stages CRC ($p=0.011$) and *POLH* promoter methylation to high grade tumors ($p=0.023$). CRC harbouring *POLK* promoter methylation exhibited better disease free survival (DFS) ($p=0.005$).

Conclusion: This study mainly demonstrated that low expression or unmethylated *POLH* and *POLK* were related to worse biological behavior tumors. However, *POLK* methylated was associated with better DFS. *POLK* and *POLH* are potential prognostic biomarkers in CRC.

Keywords: colorectal cancer, DNA damage response, prognostic biomarkers.

Statement

TNM inconsistencies for CRC prognosis and therapeutic guidance may be neutralized by the discovery of new biomarkers. Alongside MMR, other DNA repair pathways may provide interesting candidates, including DSBR, DDT/TLS and ICLR, whose role in colorectal carcinogenesis is not fully understood.

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is considered the third major cause of cancer-related death worldwide (1-3). Survival rates and therapeutic decisions for CRC patients essentially depend on pathology-related staging following the tumour-node-metastasis (TNM) classification (4). However, despite modifications to improve prognostic staging, this algorithm still fails to predict recurrence and survival after resection for stage II and III CRC patients, resulting in heterogeneous and controversial oncological outcomes (5).

In the pursuit for eliminating TNM inconsistencies, CRC molecular complexity and its heterogeneous clinical presentations have been leading to the research of novel prognostic and predictive biomarkers, including DNA repair components. For example, 15% of sporadic CRC patients which harbour DNA mismatch repair (MMR) system defects and, consequently, microsatellite instability (MSI) (6), have better stage-adjusted survival and reduced likelihood of metastasis when compared to microsatellite stable (MSS) tumors (7,8). Regrettably, MSI has several limitations that restrict its use as a practical prognostic factor across all stages of CRC, as its clinical value is restricted to stage II CRC, where adjuvant chemotherapy is not recommended (9).

Nevertheless, associations of DNA damage and imbalances in other pathways engaged in their repair with CRC risk, progression, response to therapy and prognosis have been widely reported. We and others recently reviewed that disturbances in gene and/or protein expression of DNA damage response sensors and effectors - including double strand break repair (DSBR), DNA damage tolerance/translesion synthesis (DDT/TLS) and interstrand crosslink repair (ICLR) pathways - have minimal association with clinicopathological features and response to therapy in CRC (10,11). Despite the lack of a definitive evidence so far, a plethora of reports have been suggesting an intersection between CRC and DNA repair systems, which may be mediated by MMR defects (by inducing other somatic mutations that disrupt DNA repair mechanisms) or not (12).

Double strand breaks (DSBs) are the most critical type of genotoxic stress and its repair is a central cellular mechanism to preserve genomic stability (13). DSBs are

processed by homologous recombination (HR) or classical nonhomologous end joining (NHEJ) DNA repair pathways, and disruptions of these pathways favours the accumulation of damage in rapidly dividing cells, leading to mutagenesis or apoptosis (14). Since DSBs result in the loss of integrity of both complementary strands, proficiency of error-prone repair are required. However, loss of genetic information and genomic instability arise are immediate consequences in order to guarantee cell survival. DNA damage tolerance (DDT) mechanisms are mediated by Y- family translesion DNA polymerases (such as pol κ , pol η and pol θ), which bypass DNA adducts, imbalanced dNTP pools and unusual template structures. As a consequence, in order to impede fork collapse and apoptosis due to unrepaired DSB, translesion DNA polymerases induce mutation (15,16). So far, although a number of investigations have focused on the role of MMR, NER and BER genes in CRC, much less studies have evaluated DSBR (Double strand break repair), DDT/TLS and ICLR roles from the perspective of expression characteristics and prognostic roles in CRC (10,17-20).

Thus, since tumour heterogeneity and genomic instability are hallmarks of CRC, to pinpoint a role for DSBR, DDT/TLS and ICLR may offer a better understanding of these features. Finally, alterations in gene/protein expression within DSBR, DDT/TLS and ICL components could affect the response to chemotherapy and, ultimately, the overall survival of these patients. Thus, we aimed to evaluate the prognostic role of molecular modulation of key DSBR, DDT/TLS and ICL repair components in sporadic CRC patients.

2. Methods

2.1. Patients

A total of 47 CRC patients who underwent surgical treatment between 2013 and 2015 at Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital were included in this study. Patients who had received neoadjuvant treatment and with a family history of hereditary CRC were excluded. Clinical data for each patient comprised age, sex, preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) levels and chemotherapy regimen completed. Pathological data comprised: tumor site, histology, tumor grade, presence of lymph vascular and perineural invasion and staging (according to 8th edition of AJCC/UICC) (21).

2.2. Tumor samples

Fresh tissue specimens comprising tumour tissues (with at least 70% of neoplastic cells) and adjacent normal tumour-free regions (>10 cm distance from tumour) of primary sporadic CRC were collected and assessed for gene expression, gene promoter methylation and BRAF^{V600} mutation status. Formalin-fixed paraffin-embedded CRC samples were assed for protein expression.

2.3. Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

Gene expression of *XRCC2* and *XRCC5* (DSBR), *POLH*, *POLK* and *POLQ* (DDT/TLS), *DCLRE1A* (ICL repair) and *MLH1* and *MSH2* (MMR) was carried out in colorectal tumors and healthy paired tissues by RT2 Profiler™ PCR Array (SABiosciences/Qiagen). RNA extraction and cDNA synthesis were performed using RNeasy Mini Kit and RT² PCR Array First Strand Kit (SABiosciences/Qiagen), respectively. Catalogued PCR primers were used. Reaction was prepared using RT² SYBR-Green/Rox PCR Master Mix (SABiosciences/Qiagen). Data analysis was based on the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method (Livak et al, 2001) with normalization of raw data to two housekeeping genes (*EIF2B* and *PPIA*). Median fold change ($\text{Log}_2(\text{neoplastic tissue/normal tissue})$) for each gene was used to categorize tumors into high or low expressors.

2.4. Methylation PCR Analysis

Methylation status of CpG islands of five genes (*XRCC5*, *POLH*, *POLK*, *DCLRE1A*) was performed by methylation-sensitive restriction qPCR analysis using

EpiTect Methyl II PCR assay (Sa Biosciences/Qiagen). Digested DNA was obtained with EpiTect Methyl II DNA restriction kit (Sa Biosciences/Qiagen, #335452) and used as template for qPCR Assay using RT2 SYBR[®] Green qPCR Mastermix (Sa Biosciences/Qiagen) under standard amplification conditions. Catalogued EpiTect II Methyl PCR primers used were as follows: *POLH* (EPHS5112501-1A); *POLK* (EPHS511608-1A); *XRCC5* (EPHS108851-1A) and *DCLRE1A* (EPHS101928-1A) which were all purchased from Qiagen. Gene promoter methylation status was classified into unmethylated (<5%) and methylated (>5%).

2.5. Immunohistochemistry (IHC)

IHC for MLH1, MSH2, XRCC5 (Ku80), Polk, p53 and ki67 was carried out according to MacDonald et al. (22). The sections were incubated with the following primary antibodies, all purchased from Abcam: anti-MLH1 (1:100), anti-MSH2 (1:200), anti-XRCC5 (1:200), anti-DNA Polymerase Kappa (1:300), anti-p53 (1:250) and anti-Ki67 (1:100) and then incubated with appropriate secondary antibodies (Spring). Diaminobenzidine (DAB) was used as chromogen and the sections were counterstained with haematoxylin. 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 was evaluated using QuickScore (QS) and two observers scored all samples independently and blinded (22).

2.6. *BRAF*^{V600E} mutation analysis

The exon 15 of the *BRAF* gene was amplified by polymerase chain reaction through Platinum Taq DNA Polymerase Kit[®] (Invitrogen by Life technologies) and appropriate primer pair: forward 5'-CTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' and reverse 5'-CAGGGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3'. Sanger sequencing reaction was performed with the BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies).

2.7. Statistical Analysis

Gene expression means between normal and neoplastic tissue were compared using independent sample *t-Student* or Mann-Whitney tests after Kolmogorov-Smirnov tests. For correlation and survival analyses, continuous variables were dichotomized as previously stated. Association between molecular and clinical features were

assessed by Chi-square (χ^2) test and Fisher's exact test. Kaplan–Meier analysis, with log-rank test was used to determine the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS). Cox regression analysis for independent correlation of individual parameters with patients' OS and DFS. Statistical analysis was performed using SPSS software version 22.0.0. A two-sided test with $p < 0.05$ was considered statistically significant.

2.8. 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 Irmandade of Santa Casa of Misericórdia of Porto Alegre.

3. Results

3.1. Characteristics of CRC patients

The main patient characteristics are shown in Table 1. A total of 47 patients were included in the final statistical analysis.

Table 1: Clinicopathological features of patients with CRC included in this study (n=47)

Variable	n(%)
Total cases	47
Age (mean±SD)	67.77 ± 11.49
Age (year)	
≤ 65	19 (40.4)
> 65	28 (59.6)
Gender	
Female	28 (59.6)
Male	19 (40.4)
Preoperative CEA ng/mL	
≤ 5	25 (53.2)
> 5	22 (46.8)
Tumour location	
Right side	17 (36.1)
Left side	30 (63.9)
Histology	
Well or moderately differentiated	19 (40.4)
Poorly differentiated	28 (59.6)
Mucinous	
No	43 (91.5)
Yes	4 (8.5)
Tumour invasive depth	
1-2	12 (25.5)
3-4	35 (74.5)
Lymph node status	
N-	24 (51.1)
N+	23 (48.9)
Vascular metastasis	
No	40 (85.1)
Yes	7 (14.9)
Lymph vascular invasion	
No	23 (48.9)
Yes	24 (51.1)
Perineural invasion	
No	20 (42.6)
Yes	27 (54.4)
Chemotherapy	
No	21(45.7)
Yes	25(54.3)
TNM stage	
I-II	23 (48.9)
III-IV	24 (51.1)
Relapse	
No	32 (80)
Yes	6 (20)

3.2. Molecular changes in DSBR, ICLR and DDT/TLS in CRC tumors

MSH2 ($p=0.031$), *POLK* ($p<0.001$) and *DCLRE1A* ($p<0.001$) were overexpressed, while mean gene expression of *POLH* ($p<0.001$) and *POLQ* ($p<0.001$) were found reduced in neoplastic tissues in comparison to healthy paired mucosa (Figure 1A and 1C). Only *XRCC2* and MMR repair genes were considered normally expressed. *POLH*, *POLQ* and *XRCC5* presented a mean 4.34, 2.61 and 1.74-fold expression induction, respectively. Conversely, *POLK* and *DCLRE1A* exhibited a 3.72 and 3.2-fold expression reduction, respectively (Figure 1B and 1C).

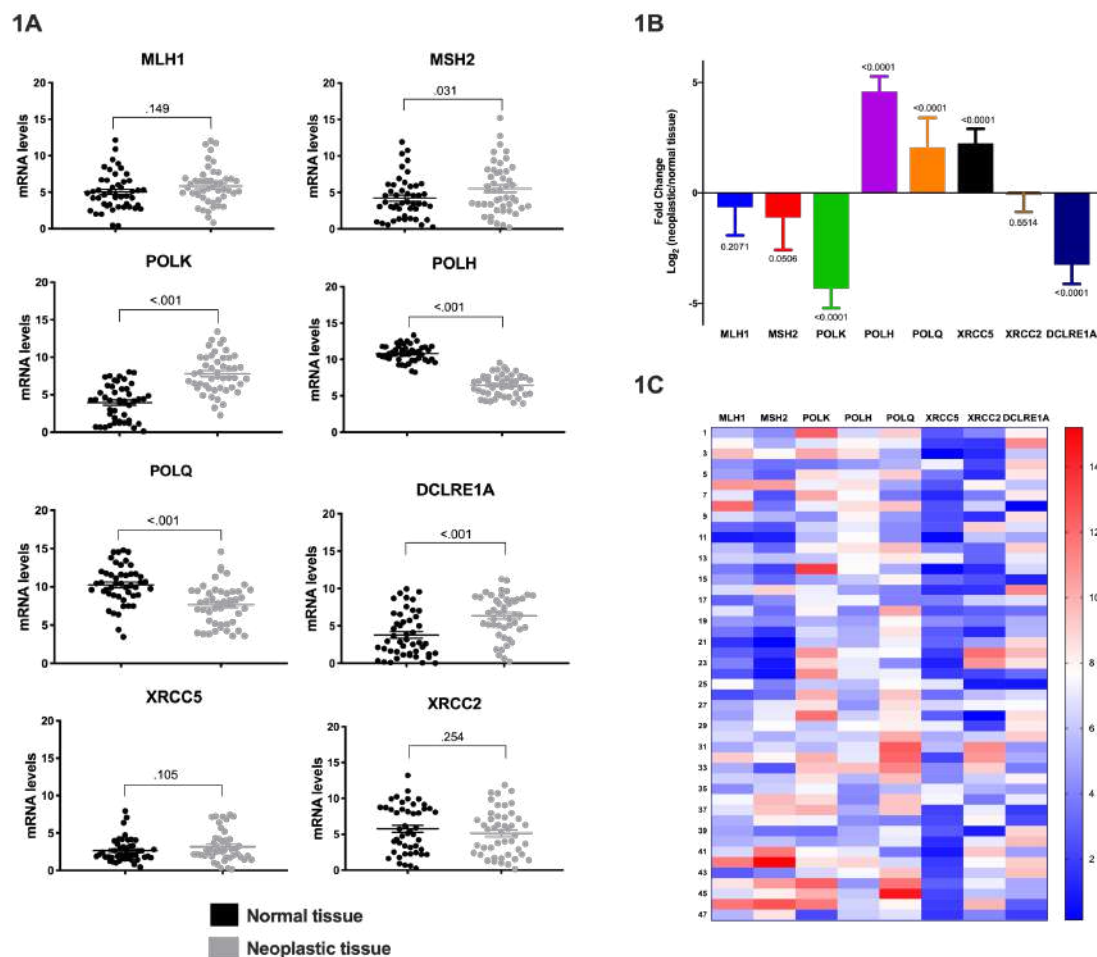


Figure 1: Molecular changes in DSBR, ICLR and DDT/TLS compared colonic normal tissue and CRC tumors. A. Gene expression was quantified for a panel of genes by real-time qPCR analysis in neoplastic and normal mucosal tissues from 47 patients with sporadic colorectal cancer. The following genes were examined: MLH1, MSH2, POLK, POLH, POLQ, XRCC2, XRCC2 and DCLRE1A. Gene expression data are shown as scatter diagrams. B. Fold Change between neoplastic and normal tissue quantified real-time qPCR analysis. C. 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. Gene expression means between normal and neoplastic tissue were compared using independent sample *t-Student* or Mann-Whitney tests after Kolmogorov-Smirnov tests.

In neoplastic tissue, nearly 85% of patients presented high protein levels of MLH1 and/or MSH2. Yet, 15% showed absent or low levels of MLH1 or MSH2 proteins. Polk and Ku80 levels were high in 55% of patients. Regarding proliferation markers expression, 68% of CRC patients presented low p53 levels and 85% of those same patients revealed high Ki67 expression (Table 2).

Table 2: Protein levels (Polk, Ku80, Mlh1, Msh2, Ki67 and p53), methylation (*POLH*, *POLK*, *XRCC5* and *DCLRE1A*) and BRAF mutation in neoplastic tissue.

Variable	n (%)	n (%)
Methylation	Unmethylated	Methylated
<i>POLH</i>	20 (57.1)	15 (42.9)
<i>POLK</i>	19 (52.8)	17(47.2)
<i>XRCC5</i>	25 (67.5)	12 (32.5)
<i>DCLRE1A</i>	17 (58.6)	12(41.4)
IHC	Low	High
XRCC5/Ku80	22 (46.8)	25 (53.2)
Pol k	21 (44.6)	26 (55.4)
MLH1	7 (14.9)	40 (85.1)
MSH2	6 (12.7)	41 (87.3)
p53	32 (68.1)	15 (31.9)
Ki67	7 (14.9)	40 (85.1)
	Wild	Mutated
BRAF	44 (93.6)	3 (6.4)

Low *XRCC5* gene expression was associated with promoter methylation ($p=0.015$) and low *XRCC5* (Ku80) protein expression ($p=0.0001$). *POLK* overexpression was associated with high correspondent protein contents ($p=0.0001$), but not with absence of promoter methylation ($p=0.581$) (Supplementary Table S1). Promoter methylation and gene expression of *POLH* and *DCLRE1A* were not associated (data not shown).

Supplementary Table S1: Association between gene expression of POLK and XRCC5 with methylation and IHC.

Variable	Gene Expression POLK		p value
	Low (%)	High (%)	
Unmetilated	55	52.9	0.581
Metilated	45	47.1	
IHC Low	73.9	16.7	0.0001
IHC High	26.1	83.3	

Variable	Gene Expression XRCC5		p value
	Low (%)	High (%)	
Unmetilated	88.2	50	0.015
Metilated	11.8	50	
IHC Low	73.9	20.8	0.0001
IHC High	26.1	79.2	

Associations of DNA repair gene expression, methylation and IHC were evaluated using chi-square (χ^2) test and Fisher's exact test.

3.3. Associations of DSBR, ICL repair and DDT/TLS key components with clinicopathological and molecular features of CRC patients

Tumors with low expression of *POLH* exhibited mucinous histology ($p=0.05$), but smaller invasive depth ($p=0.038$). Low tumour expression of *POLK* was associated with presence of distant metastases ($p=0.042$). Promoter methylation of *POLK* was associated to smaller invasive depth ($p=0.011$) and methylation of *POLH* to well differentiated tumors (0.023). In addition, *POLK* promoter methylation was associated with tumors with high Ki67 contents ($p=0.036$) and low expression of *DCLRE1A* was associated with tumors with low Ki67 contents ($p=0.042$) (Table 3). Overexpression of *POLK* was associated with tumors expressing *MLH1* ($p=0.042$) (Supplementary Tables S2, S3, S4). High tumor protein expression of *MSH2* was associated with absence of distant metastases ($p=0.035$), while overexpression of Ki67 with lower preoperative CEA levels ($p=0.042$) (Table 4). More detailed associations between clinicopathological features and molecular data are provided in supplementary tables S5, S6 and S7.

Table 3: Correlations between DNA gene repair expression of *POLH*, *POLK*, *POLQ*, *XRCC* and *XRCC5*, methylation of *POLH*, *POLK*, *XRCC5* and *DCLRE1A* and IHC of *XRCC5*, Pol k, MLH1, MSH2, p53 and Ki67 scores with clinical parameters.

Variable	GENE EXPRESSION						METHYLATION				IHC					
	<i>POLH</i>	<i>POLK</i>	<i>POLQ</i>	<i>XRCC2</i>	<i>XRCC5</i>	<i>DCLRE1A</i>	<i>POLH</i> (n=36)	<i>POLK</i> (n=37)	<i>XRCC5</i> (n=37)	<i>DCLRE1A</i> (n=32)	<i>XRCC5</i>	Pol k	MLH1	MSH2	p53	Ki67
Age, Y	0.548	0.095	0.452	0.452	0.143	0.318	0.347	0.419	0.176	0.261	0.408	0.115	0.285	0.169	0.363	0.6
Gender	0.318	0.143	0.452	0.095	0.452	0.238	0.224	0.603	0.228	0.314	0.169	0.117	0.6	0.535	0.16	0.285
CEA, ng/mL	0.075	0.340	0.340	0.580	0.580	0.207	0.127	0.175	0.165	0.602	0.503	0.413	0.447	0.092	0.393	0.042
Tumour location	0.544	0.092	0.310	0.237	0.310	0.544	0.205	0.627	0.102	0.398	0.391	0.123	0.499	0.372	0.241	0.499
Histology	0.452	0.548	0.548	0.318	0.548	0.548	0.023	0.341	0.051	0.630	0.169	0.117	0.133	0.209	0.363	0.4
Mucinous	0.050	0.288	0.679	0.288	0.679	0.679	0.457	0.562	0.704	0.452	0.257	0.61	0.512	0.568	0.381	0.488
T	0.038	0.402	0.402	0.337	0.598	0.337	0.168	0.011	0.311	0.579	0.228	0.104	0.417	0.151	0.415	0.243
N	0.557	0.443	0.234	0.095	0.443	0.557	0.500	0.209	0.243	0.149	0.562	0.448	0.525	0.646	0.46	0.525
M	0.525	0.042	0.190	0.190	0.475	0.525	0.251	0.072	0.350	0.650	0.426	0.377	0.057	0.035	0.054	0.296
Lymph vascular invasion	0.557	0.443	0.443	0.095	0.443	0.557	0.253	0.324	0.121	0.252	0.438	0.237	0.525	0.646	0.234	0.525
Perineural invasion	0.433	0.337	0.567	0.337	0.337	0.433	0.485	0.286	0.401	0.615	0.467	0.064	0.648	0.201	0.532	0.352
Chemotherapy	0.194	0.18	0.374	0.607	0.374	0.5	0.163	0.132	0.502	0.37	0.165	0.48	0.601	0.422	0.198	0.399
TNM stage	0.230	0.562	0.155	0.334	0.155	0.562	0.363	0.121	0.407	0.252	0.241	0.241	0.574	0.397	0.381	0.574

T: tumour; N: lymph node; M: metastase. Associations of DNA repair gene expression, methylation and IHC with clinical parameters were evaluated using chi-square (χ^2) test and Fisher's exact test. Statistically significant are highlighted ($p < 0.05$).

Supplementary Table S2: Association between DNA gene repair expression with BRAF mutation, IHC scores of MLH1, MSH2, p53 and Ki67.

Variable	POLH			POLK			POLQ			XRCC2			XRCC5			DCLRE1A		
	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value
BRAF																		
Wild	91.3	95.8	0.484	87	100	0.19	91.3	95.8	0.484	87	100	0.109	100	87.5	0.125	100	87.5	0.125
Mutated	8.7	4.2		13	0		8.7	4		13	0		0	12.5		0	12.5	
MLH1																		
Low	8.7	20.8	0.226	26.1	4.2	0.042	17.4	12.5	0.475	8.7	20.8	0.226	13	16.7	0.525	8.7	20.8	0.226
High	91.3	79.2		73.9	95.8		82.6	87.5		91.3	79.2		87	83.3		91.3	79.2	
MSH2																		
Low	13	12.5	0.646	21.7	4.2	0.085	17.4	8.3	0.312	13	12.5	0.646	13	12.5	0.646	8.7	16.7	0.354
High	87	87.5		78.3	95.8		82.6	91.7		87	87.5		87	87.5		91.3	83.3	
p53																		
Low	78.3	58.3	0.124	73.9	62.5	0.3	69.6	66.7	0.54	82.6	87.5	0.54	60.9	75	0.234	65.2	70.8	0.46
High	21.7	41.7		26.1	37.5		30.4	33.3		17.4	12.5		39.1	25		34.8	29.2	
Ki67																		
Low	78.3	91.7	0.19	87	83.3	0.525	91.3	79.2	0.226	82.6	87.5	0.475	78.3	91.7	0.19	73.9	95.8	0.042
High	21.7	8.3		13	16.7		8.7	20.8		17.4	12.5		21.7	8.3		26.1	4.2	

The data were evaluated using chi-square (χ^2) test and Fisher's exact test. Statistically significant are highlighted ($p < 0.05$).

Supplementary Table S3: Association between DNA repair gene methylation with BRAF mutation, IHC scores of MLH1, MSH2, p53 and Ki67.

Variable	POLH			POLK			XRCC5			DCRLE1A		
	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value
BRAF												
Wild	50	100	0.271	55.9	33.3	0.438	67.6	66.7	0.704	53.3	50	0.726
Mutated	50	0		44.1	66.7		32.4	33.3		46.7	50	
MLH1												
Low	66.7	50	0.386	83.3	48.4	0.13	80	65.6	0.47	50	53.6	0.65
High	33.3	50		16.7	51.6		20	34.4		50	46.4	
MSH2												
Low	66.7	51.5	0.543	60	53.1	0.58	75	66.7	0.609	0	56.7	0.212
High	33.3	48.5		40	46.9		25	33.3		100	43.3	
p53												
Low	53.8	50	0.564	53.8	54.5	0.627	68	66.7	0.609	59.1	40	0.267
High	46.2	50		46.2	45.5		32	33.3		40.9	60	
Ki67												
Low	53.1	50	0.655	60.6	0	0.036	66.7	75	0.609	55.2	33.3	0.452
High	46.9	50		39.4	100		33.3	25		44.8	66.7	

The data were evaluated using chi-square (χ^2) test and Fisher's exact test. Statistically significant are highlighted (p<0.05).

Supplementary Table S4: Associations of protein expression by IHC scores with BRAF mutation, IHC scores of MLH1, MSH2, p53 and ki67.

Variable	Pol k			XRCC5/Ku80		
	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value
BRAF						
Wild	85.7	100	0.082	95.5	92	0.549
Mutated	14.3	0		4.5	8	
MLH1						
Low	23.8	7.7	0.129	9.1	20	0.265
High	76.2	92.3		90.9	80	
MSH2						
Low	19	7.7	0.235	13.6	12	0.603
High	81	92.3		86.4	88	
p53						
Low	71.4	65.4	0.451	59.1	76	0.177
High	28.6	34.6		40.9	24	
Ki67						
Low	85.7	84.6	0.623	86.4	84	0.574
High	14.3	15.4		13.6	16	

The data were evaluated using chi-square (χ^2) test and Fisher's exact test.

Table 4: Correlations between DNA repair gene expression, methylation and IHC with BRAF mutation and IHC for MLH1, MSH2, p53 and Ki67.

Variable	GENE EXPRESSION						METHYLATION				IHC	
	POLH	POLK	POLQ	XRCC2	XRCC5	DCLRE1A	PolH (n=36)	PolK (n=37)	XRCC5 (n=37)	DCLRE1A (n=32)	XRCC5	Pol k
BRAF	0.484	0.19	0.484	0.109	0.125	0.125	0.271	0.438	0.704	0.726	0.082	0.549
MLH1	0.226	0.042	0.475	0.226	0.525	0.226	0.386	0.13	0.47	0.65	0.129	0.265
MSH2	0.646	0.085	0.312	0.646	0.646	0.354	0.543	0.58	0.609	0.212	0.235	0.603
p53	0.124	0.3	0.54	0.54	0.234	0.46	0.564	0.627	0.609	0.267	0.451	0.177
Ki67	0.19	0.525	0.226	0.475	0.19	0.042	0.655	0.036	0.609	0.452	0.623	0.574

The data were evaluated using chi-square (χ^2) test and Fisher's exact test. Statistically significant are highlighted ($p < 0.05$).

Supplementary Table S5: Associations of DNA repair gene expression with clinical parameters.

Variable	POLH			POLK			POLQ			XRCC2			XRCC5			DCLRE1A		
	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value
Age, Y																		
≤ 65	39.1	41.7	0.548	52.2	29.2	0.095	43.5	37.5	0.452	43.5	37.5	0.452	30.4	50.0	0.143	34.8	45.8	0.318
> 65	60.9	58.3		47.8	70.8		56.5	62.5		56.5	62.5		69.6	50.0		65.2	54.2	
Sex																		
Female	65.2	54.2	0.318	69.6	50.0	0.143	56.5	62.5	0.452	47.8	70.8	0.095	56.5	62.5	0.452	52.2	66.7	0.238
Male	34.8	45.8		30.4	50.0		43.5	37.5		52.2	29.2		43.5	37.5		47.8	33.3	
CEA, ng/mL																		
≤ 5	78.3	54.2	0.075	60.9	70.8	0.340	60.9	70.8	0.340	65.2	66.7	0.580	65.2	66.7	0.580	73.9	58.3	0.207
> 5	21.7	45.8		39.1	29.2		39.1	29.2		34.8	33.3		34.8	33.3		26.1	41.7	
Tumor location																		
Right side	34.8	37.5	0.544	47.8	25.0	0.092	30.4	41.7	0.310	43.5	29.2	0.237	30.4	41.7	0.310	34.8	37.5	0.544
Left side	65.2	62.5		52.2	75.0		69.6	58.3		56.5	70.8		69.6	58.3		65.2	62.5	
Histology																		
Well or moderately differentiated	56.5	62.5	0.452	60.9	58.3	0.548	60.9	58.3	0.548	65.2	54.2	0.318	60.9	58.3	0.548	60.9	58.3	0.548
Poorly differentiated	43.5	37.5		39.1	41.7		39.1	41.7		34.8	45.8		39.1	41.7		39.1	41.7	
Mucinous																		
No	82.6	100.0	0.050	87.0	95.8	0.288	91.3	91.7	0.679	87.0	95.8	0.288	91.3	91.7	0.679	91.3	91.7	0.679
Yes	17.4	0.0		13.0	4.2		8.7	8.3		13.0	4.2		8.7	8.3		8.7	8.3	
T																		
T1-T2	39.1	12.5	0.038	21.7	29.2	0.402	21.7	29.2	0.402	30.4	20.8	0.337	26.1	25.0	0.598	30.4	20.8	0.337
T3-T4	60.9	87.5		78.3	70.8		78.3	70.8		69.6	79.2		73.9	75.0		69.6	79.2	
N																		
N-	52.2	50.0	0.557	47.8	54.2	0.443	43.5	58.3	0.234	39.1	62.5	0.095	47.8	54.2	0.443	52.2	50.0	0.557
N+	47.8	50.0		52.2	45.8		56.5	41.7		60.9	37.5		52.2	45.8		47.8	50.0	
M																		
No	87.0	83.3	0.525	73.9	95.8	0.042	78.3	91.7	0.190	78.3	91.7	0.190	82.6	87.5	0.475	87.0	83.3	0.525
Yes	13.0	16.7		26.1	4.2		21.7	8.3		21.7	8.3		17.4	12.5		13.0	16.7	
Lymph vascular invasion																		
No	52.2	50.0	0.557	47.8	54.2	0.443	47.8	54.2	0.443	39.1	62.5	0.095	47.8	54.2	0.443	52.2	50.0	0.557
Yes	47.8	50.0		52.2	45.8		52.2	45.8		60.9	37.5		52.2	45.8		47.8	50.0	
Perineural invasion																		
No	60.9	54.2	0.433	52.2	62.5	0.337	56.5	58.3	0.567	52.2	62.5	0.337	52.2	62.5	0.337	60.9	54.2	0.433
Yes	39.1	45.8		47.8	37.5		43.5	41.7		47.8	37.5		47.8	37.5		39.1	45.8	
Chemotherapy																		
No	54.5	37.5	0.194	36.4	54.2	0.18	40.9	50	0.374	45.5	45.8	0.607	40.9	50	0.374	43.5	45.7	0.5
Yes	45.5	62.5		63.8	45.8		59.1	50		54.5	54.2		59.1	50		56.5	54.3	
TNM stage																		
I-II	60.9	45.8	0.230	52.2	54.2	0.562	43.5	62.5	0.155	47.8	58.3	0.334	43.5	62.5	0.155	52.2	54.2	0.562
III-IV	39.1	54.2		47.8	45.8		56.5	37.5		52.2	41.7		56.5	37.5		47.8	45.8	

Supplementary Table S6: Association between DNA repair gene methylation with clinical parameters.

Variable	POLH (N=36)			POLK (N=37)			XRCC5 (N=37)			DCLRE1A (N=32)		
	U(%)	M(%)	p value	U(%)	M(%)	p value	U(%)	M(%)	p value	U(%)	M(%)	p value
Age, Y												
≤ 65	47.4	35.3	0.347	50.0	41.2	0.419	36.0	58.3	0.176	29.4	46.7	0.261
> 65	52.6	64.7		50.0	58.8		64.0	41.7		70.6	53.3	
Sex												
Female	52.6	70.6	0.224	60.0	58.8	0.603	56.0	75.0	0.228	58.8	73.3	0.314
Male	47.4	29.4		40.0	41.2		44.0	25.0		41.2	26.7	
CEA, ng/mL												
≤ 5	52.6	76.5	0.127	50.0	70.6	0.175	52.0	75.0	0.165	64.7	66.7	0.602
> 5	47.4	23.5		50.0	29.4		48.0	25.0		35.3	33.3	
Tumor location												
Right side	42.1	23.5	0.205	35.0	35.3	0.627	44.0	16.7	0.102	29.4	40.0	0.398
Left side	57.9	76.5		65.0	64.7		56.0	83.3		70.6	60.0	
Histology												
Well or moderately differentiated	26.3	64.7	0.023	35.0	47.1	0.341	32.0	66.7	0.051	52.9	53.3	0.630
Poorly differentiated	73.7	35.3		65.0	52.9		68.0	33.3		47.1	46.7	
Mucinous												
No	94.7	88.2	0.457	90.0	94.1	0.562	92.0	91.7	0.704	94.1	86.7	0.452
Yes	5.3	11.8		10.0	5.9		8.0	8.3		5.9	13.3	
T												
T1-T2	15.8	35.3	0.168	5.0	41.2	0.011	20.0	33.3	0.311	23.5	26.7	0.579
T3-T4	84.2	64.7		95.0	58.8		80.0	66.7		76.5	73.3	
N												
N-	47.4	52.9	0.500	40.0	58.8	0.209	40.0	58.3	0.243	64.7	40.0	0.149
N+	52.6	47.1		60.0	41.2		60.0	41.7		35.3	60.0	
M												
No	73.7	88.2	0.251	70.0	94.1	0.072	80.0	9.7	0.350	88.2	86.7	0.650
Yes	26.3	11.8		30.0	5.9		20.0	8.3		11.8	13.3	
Lymph vascular invasion												
No	42.1	58.8	0.253	40.0	52.9	0.324	40.0	66.7	0.121	64.7	46.7	0.252
Yes	57.9	41.2		60.0	47.1		60.0	33.3		35.3	53.3	
Perineural invasion												
No	52.6	58.8	0.485	50.0	64.7	0.286	56.0	66.7	0.401	58.8	60.0	0.615
Yes	47.4	41.2		50.0	35.3		44.0	33.3		41.2	40.0	
Chemotherapy												
No	36.8	58.8	0.163	35	58.8	0.132	44	50	0.502	58.8	46.7	0.37
Yes	63.2	41.2		65	41.2		56	50		41.2	53.3	
TNM stage												
I-II	47.4	58.8	0.363	40.0	64.7	0.121	48.0	58.3	0.407	64.7	46.7	0.252
III-IV	52.6	41.2		60.0	35.3		52.0	41.7		35.3	53.3	

Supplementary Table S7: Association between IHC scores with clinical parameters.

Variable	XRCC5/Ku80			Polk k			MLH1			MSH2			BRAF			p53			Ki67		
	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Wild (%)	Mutated (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value	Low (%)	High (%)	p value
Age, Y																					
≤ 65	36.36	44	0.408	52.38	30.77	0.115	57.14	37.5	0.285	66.67	36.59	0.169	38.60	66.7	0.355	43.80	33.3	0.363	40.00	42.9	0.6
> 65	63.64	56		47.62	69.23		42.86	62.5		33.33	63.41		61.40	33.3		56.30	66.7		60.00	57.1	
Sex																					
Female	50.00	68	0.169	71.43	50.00	0.117	57.14	60	0.6	66.67	58.54	0.535	56.80	100	0.202	53.10	73.3	0.16	62.50	42.9	0.285
Male	50.00	32		28.57	50.00		42.86	40		33.33	41.46		43.20	0		46.90	26.7		37.50	57.1	
CEA, ng/mL																					
≤ 5	68.18	64	0.503	61.90	69.23	0.413	57.14	67.5	0.447	33.33	70.73	0.092	68.20	33.3	0.264	68.80	60	0.393	60.00	100	0.042
> 5	31.82	36		38.10	30.77		42.86	32.5		66.67	29.27		31.80	66.7		31.30	40		40.00	0	
Tumor location																					
Right side	31.82	40	0.391	47.62	26.92	0.123	42.86	35	0.499	50.00	34.15	0.372	36.40	33.3	0.706	31.30	46.7	0.241	35.00	42.9	0.499
Left side	68.18	60		52.38	73.08		57.14	65		50.00	65.85		63.60	66.7		68.80	53.3		65.00	57.1	
Histology																					
Well or moderately differentiated	50.00	32	0.169	28.57	50.00	0.117	14.29	45	0.133	16.67	43.90	0.209	40.90	33.3	0.645	43.80	33.3	0.363	42.50	28.6	0.4
Poorly differentiated	50.00	68		71.43	50.00		85.71	55		83.33	56.10		59.10	66.7		56.30	66.7		57.50	71.4	
Mucinous																					
No	86.36	96	0.257	90.48	92.31	0.61	100.00	90	0.512	100.00	90.24	0.568	90.90	100	0.761	93.80	86.7	0.381	92.50	85.7	0.488
Yes	13.64	4		9.52	7.69		0.00	10		0.00	9.76		9.10	0		6.30	13.3		7.50	14.3	
T																					
T1-T2	18.18	32	0.228	14.29	34.62	0.104	14.29	27.5	0.417	0.00	29.27	0.151	27.30	0	0.404	28.10	20	0.415	22.50	42.9	0.243
T3-T4	81.82	68		85.71	65.38		85.71	72.5		100.00	70.73		72.70	100		71.90	80		77.50	57.1	
N																					
N-	50.00	52	0.562	47.62	53.85	0.448	57.14	50	0.525	50.00	51.22	0.646	50.00	66.7	0.516	53.10	46.7	0.46	50.00	57.1	0.525
N+	50.00	48		52.38	46.15		42.86	50		50.00	48.78		50.00	33.3		46.90	48.9		50.00	42.9	
M																					
No	81.82	88	0.426	80.95	88.46	0.377	57.14	90	0.057	50.00	90.24	0.035	84.10	100	0.609	78.10	100	0.054	82.50	100	0.296
Yes	18.18	12		19.05	11.54		42.86	10		50.00	9.76		15.90	0		21.90	0		17.50	0	
Lymph vascular invasion																					
No	54.55	48	0.438	42.86	57.69	0.237	57.14	50	0.525	50.00	51.22	0.646	52.30	33.3	0.484	56.30	40	0.234	50.00	57.1	0.525
Yes	45.45	52		57.14	42.31		42.86	50		50.00	48.78		47.70	66.7		43.80	60		50.00	42.9	
Perineural invasion																					
No	54.55	60	0.467	42.86	69.23	0.064	57.14	57.5	0.648	33.33	60.98	0.201	59.10	33.3	0.387	56.30	60	0.532	55.00	71.4	0.352
Yes	45.45	40		57.14	30.77		42.86	42.5		66.67	39.02		40.90	66.7		43.80	40		45.00	28.6	
Chemotherapy																					
No	35	53.8	0.165	42.9	48	0.48	42.9	46.2	0.601	33.3	47.5	0.422	44.2	66.7	0.433	51.6	33.3	0.198	43.6	57.1	0.399
Yes	65	46.2		57.1	52		57.1	53.8		66.7	52.5		55.8	33.3		48.4	66.7		56.4	42.9	
TNM stage																					
I-II	45.45	60	0.241	47.62	57.69	0.241	57.14	52.5	0.574	66.67	51.22	0.397	52.30	66.7	0.549	56.30	46.7	0.381	52.50	57.1	0.574
III-IV	54.55	40		52.38	42.31		42.86	47.5		33.33	48.78		47.70	33.3		43.80	53.3		47.5	42.9	

3.4. Prognostic value of DNA repair component modulation in patients with CRC

Kaplan-Meier's survival analyses indicated that patients whose tumors harboured *POLK* promoter methylation presented better DFS ($p=0.005$). Statistical tendencies were found for *POLK* promoter methylation and better OS ($p=0.053$); overexpression of *POLQ* and better OS ($p=0.076$) and DFS ($p=0.068$); overexpression of *XRCC5* expression and better survival ($p=0.057$) (Figure 2). Other survival analyses are provided in supplementary figures S1, S2, S3, S4, S5, S6.

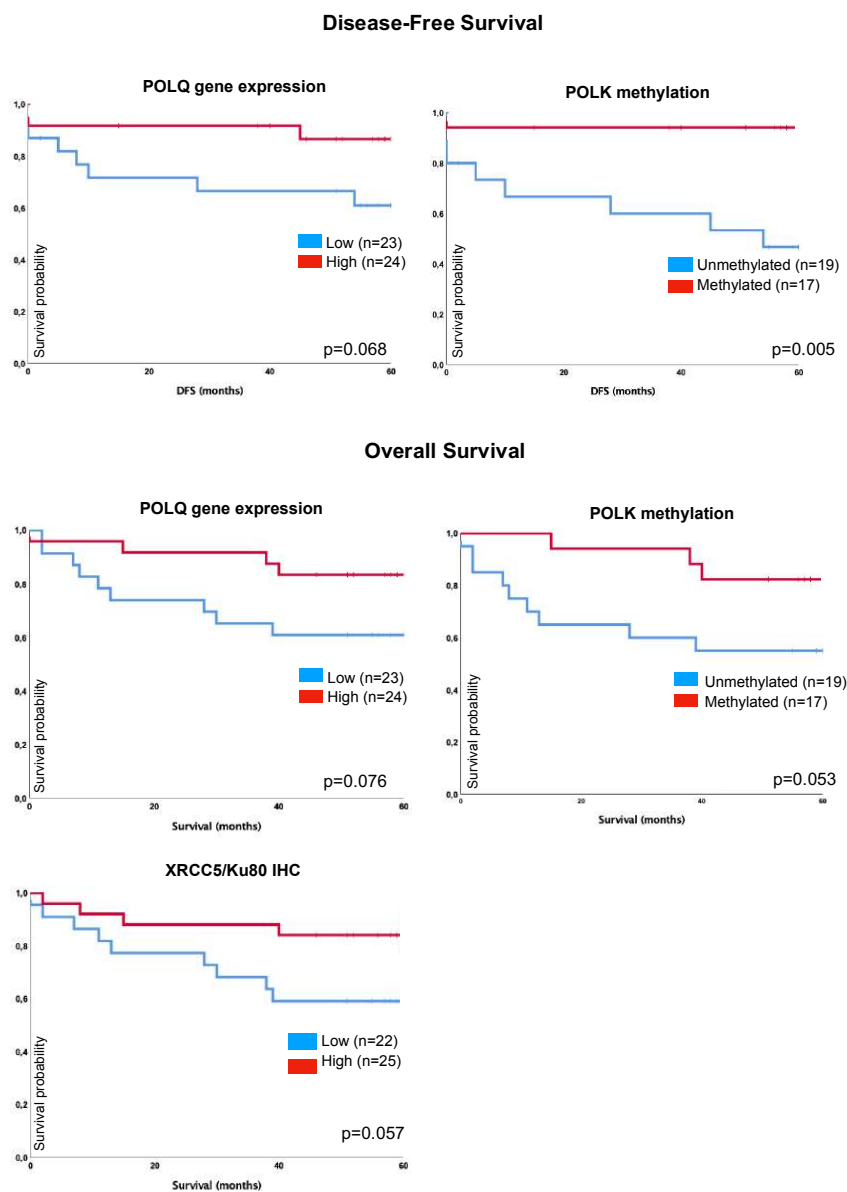
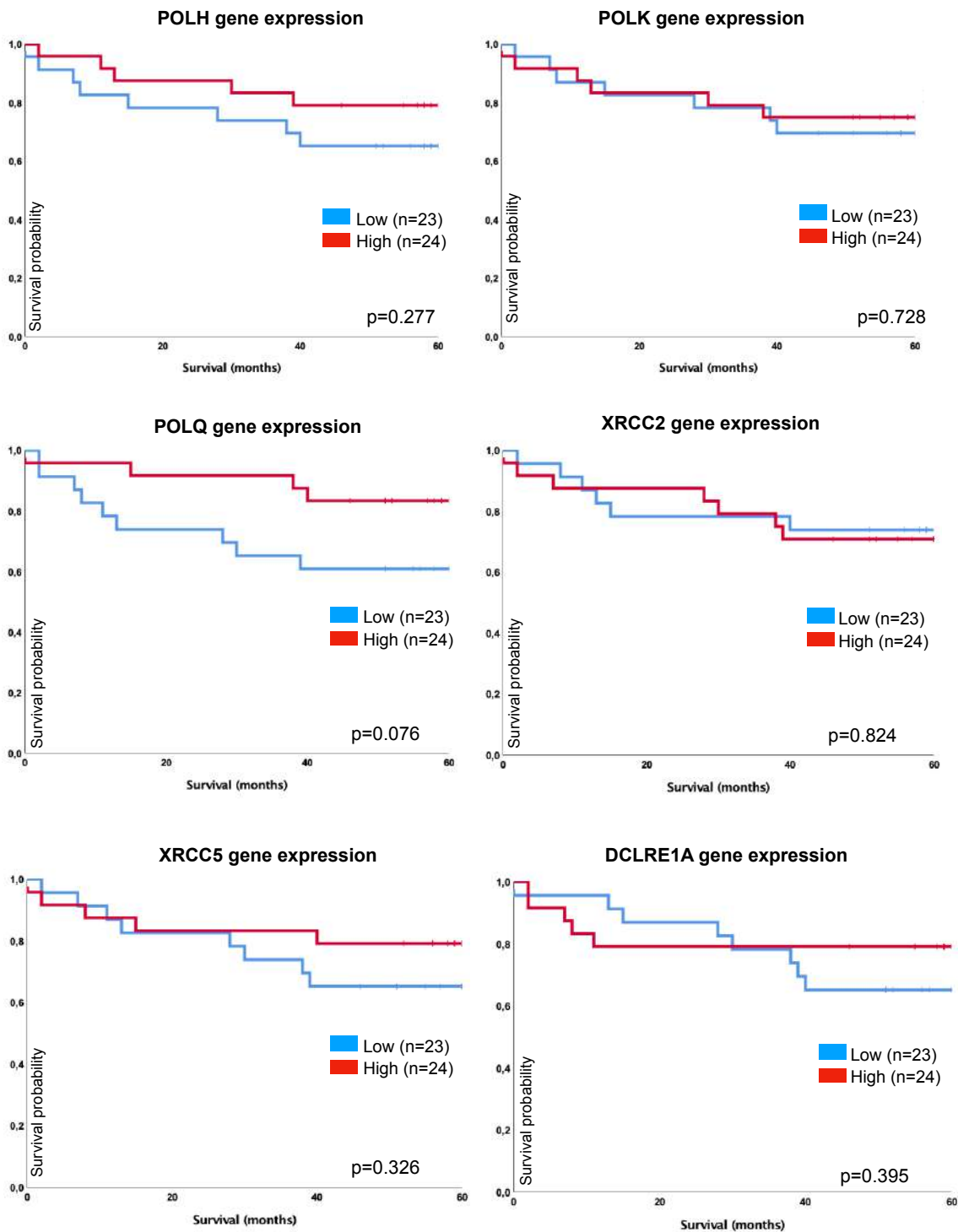
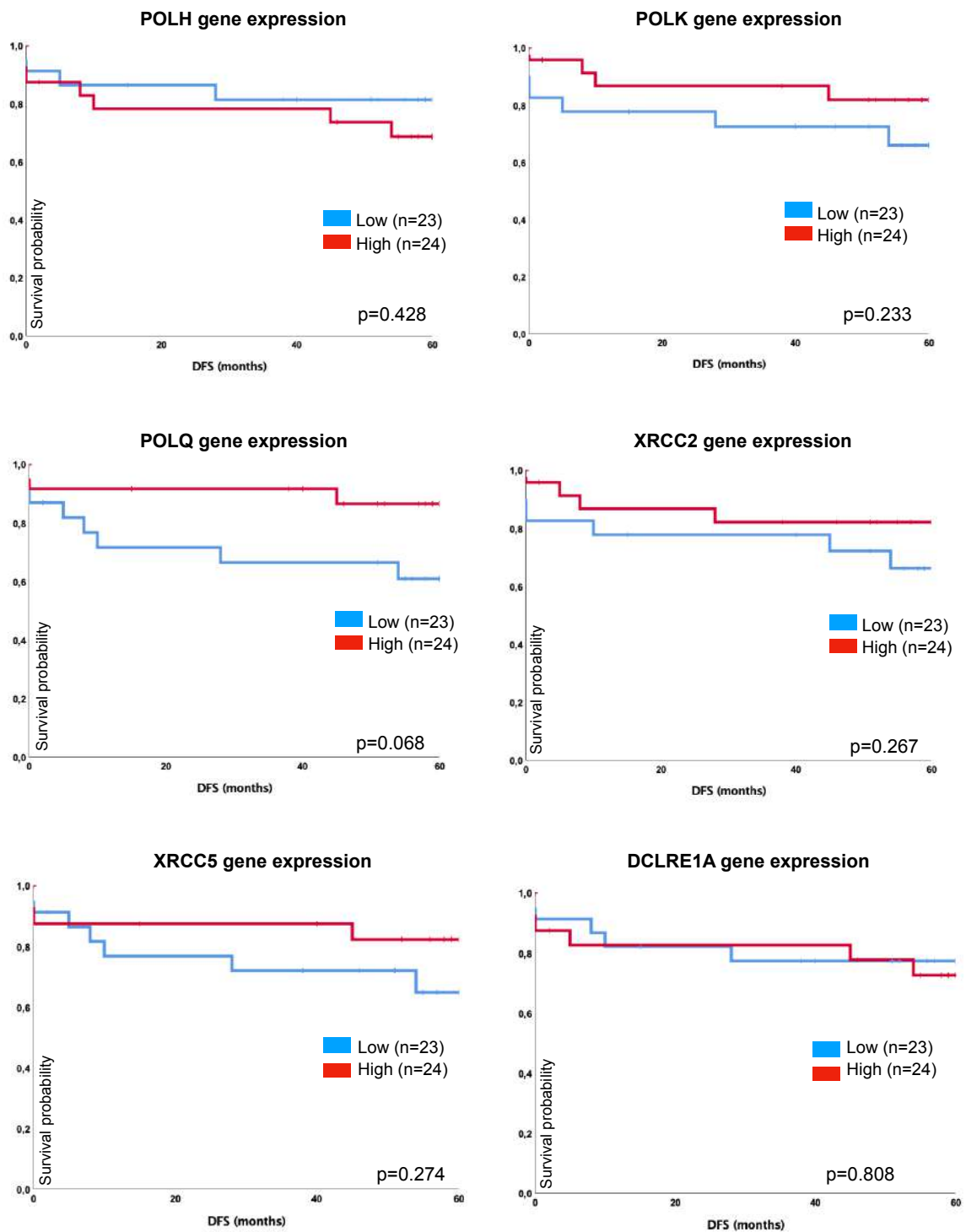


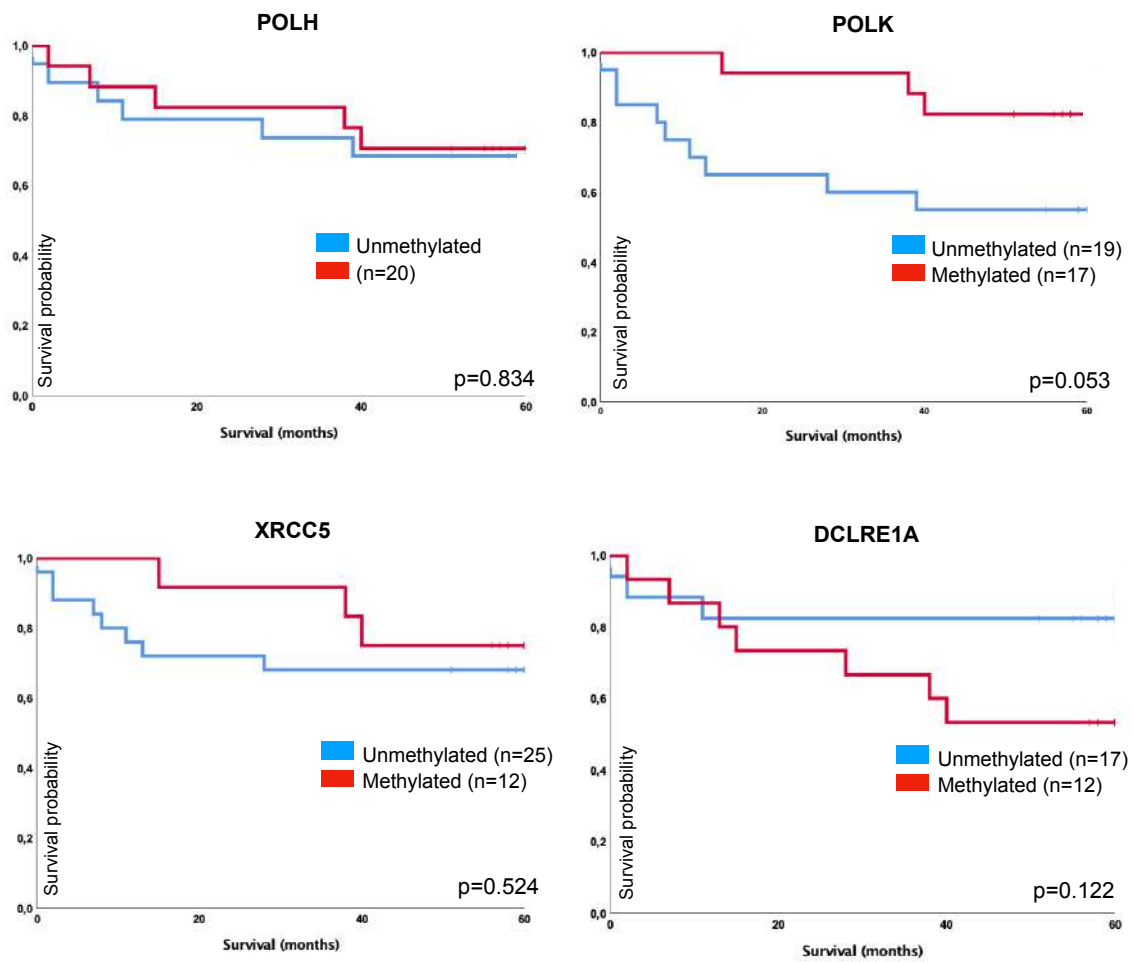
Figure 2: Overall and disease free-survival for *POLQ* gene expression, *POLK* methylation and IHC for *XRCC5*. The data were evaluated with Kaplan-Meier test.



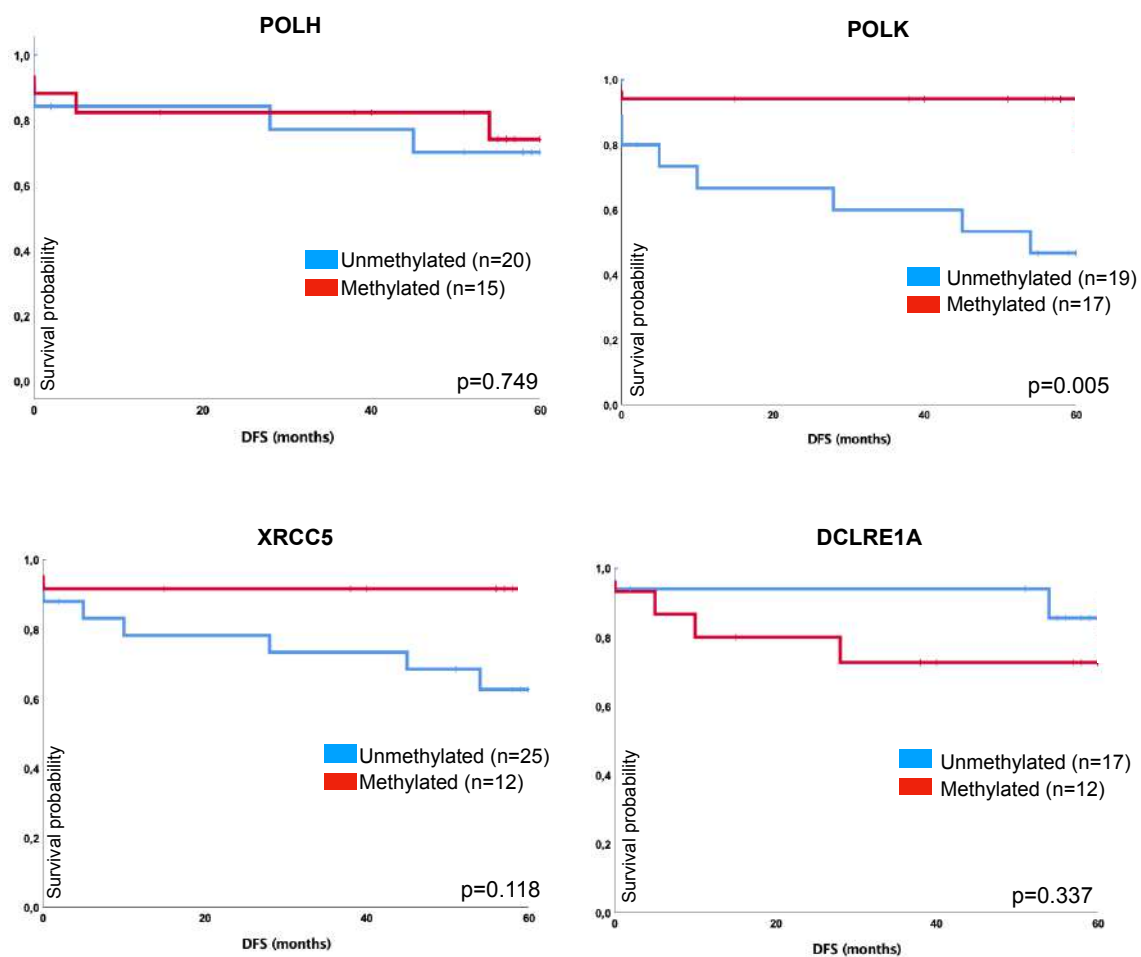
Supplementary Figure S1: Associations of overall survival of DNA repair gene expression of POLH, POLK, POLQ, XRCC2, XRCC5 and DCRLE1A utilizing Kaplan-Meier curve.



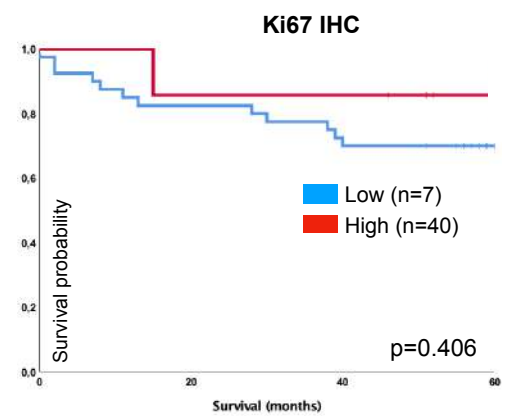
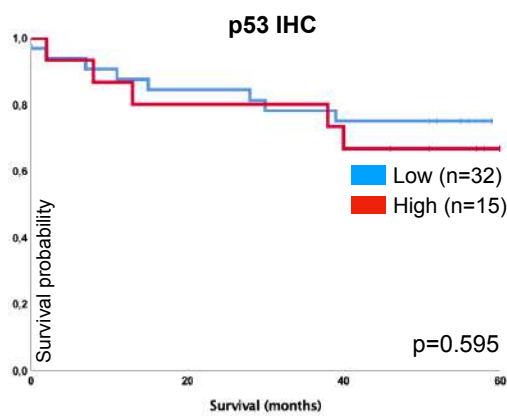
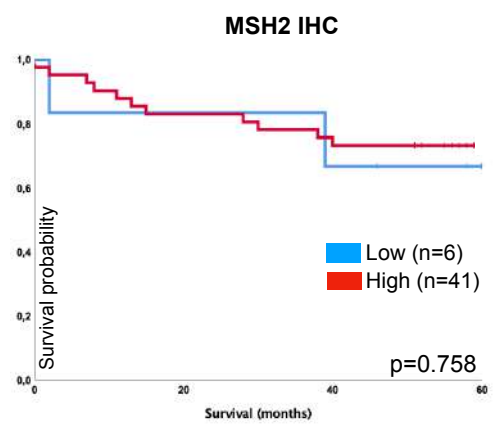
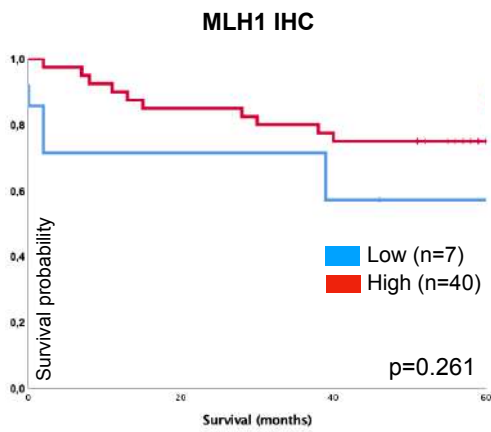
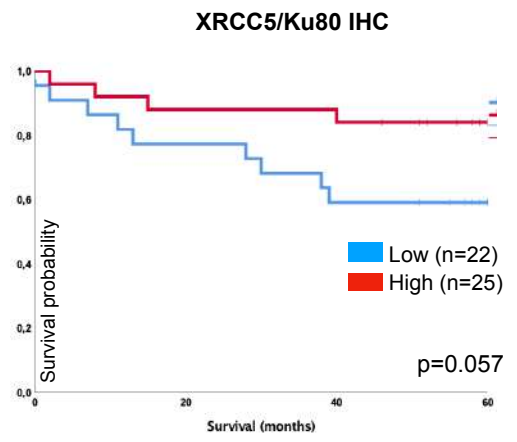
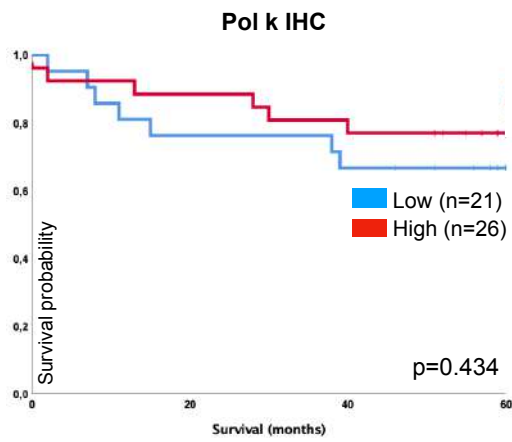
Supplementary Figure S2: Associations of disease free survival of DNA repair gene expression of POLH, POLK, POLQ, XRCC2, XRCC5 and DCLRE1A utilizing Kaplan-Meier curve.



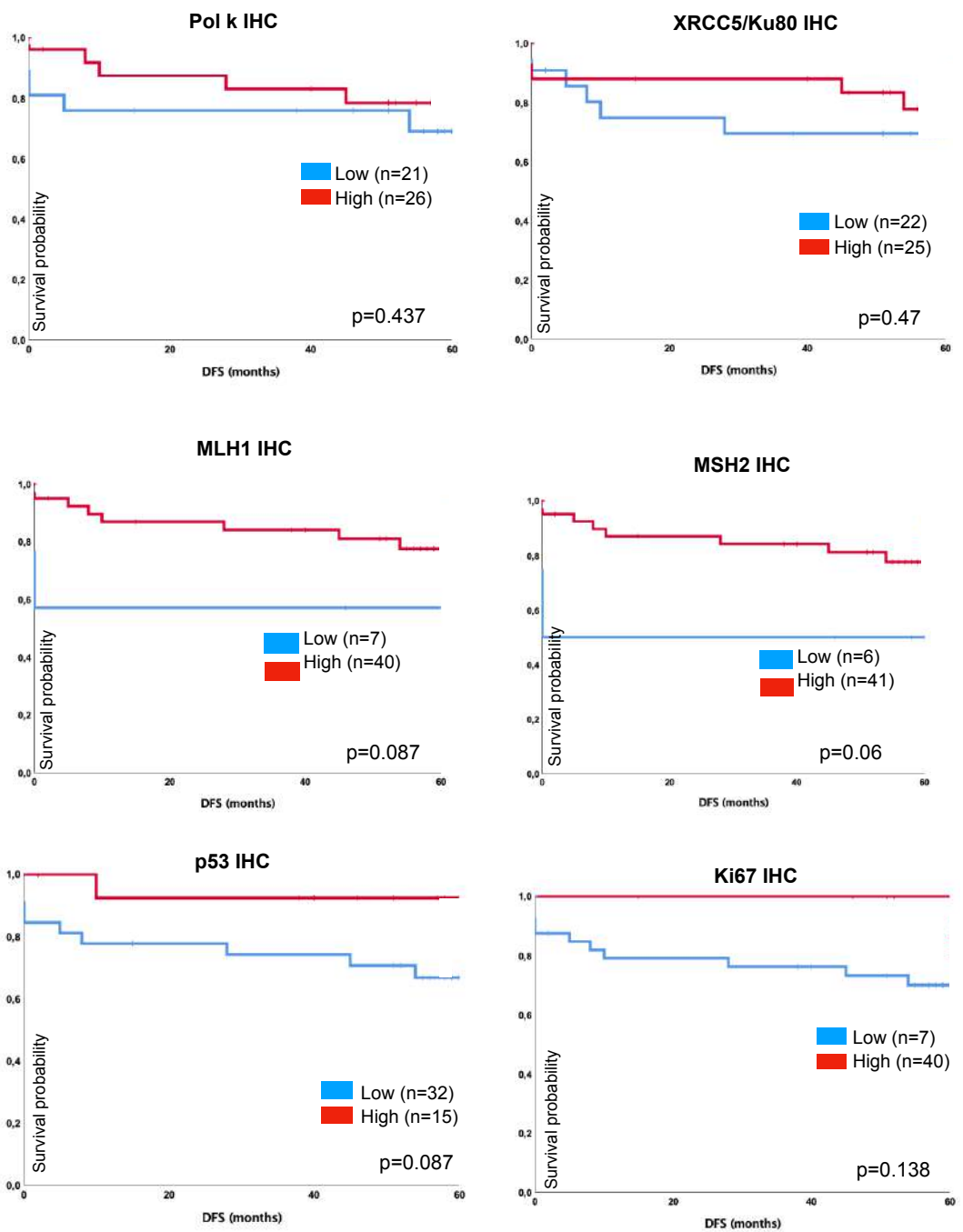
Supplementary Figure S3: Associations of overall survival of DNA repair gene methylation of POLH, POLK, XRCC5 and DCLRE1A utilizing Kaplan-Meier curve.



Supplementary Figure S4: Associations of disease free survival of DNA repair gene methylation of POLH, POLK, XRCC5 and DCRLE1A utilizing Kaplan-Meier curve.



Supplementary Figure S5: Associations of overall survival of IHC scores of Pol k, XRCC5/Ku80, MLH1, MSH2, p53 and Ki67 utilizing Kaplan-Meier curve.



Supplementary Figure S6: Associations of disease free survival of IHC scores of Pol k, XRCC5/Ku80, MLH1, MSH2, p53 and Ki67 utilizing Kaplan-Meier curve.

Univariate Cox regression analysis showed prognostic significance of N+, M+, lymph vascular invasion, perineural invasion, stages III and IV, low tumour *POLQ* gene expression, tumour unmethylated *POLK* gene promoter, and high XRCC5/Ku80 protein expression on overall survival. Unfortunately, these associations were not confirmed in our multivariate analysis (Table 5). For DFS, univariate analysis showed that male, preoperative CEA >5ng/mL, N+, lymph vascular invasion, perineural invasion, chemotherapy realized stages III, low expression of *POLQ*, unmethylated *POLK* promoter and low or absent MSH2 protein expression were predictors of poor DFS, but not confirmed in multivariate analysis (Table 6).

Table 5: Overall survival calculated with univariate and multivariate cox regression tests.

Variable	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	CI (95%)	p value	HR	CI (95%)	p value
Age > 65 years	1.708	(0.526-5.547)	0.373			
Male sex	1.917	(0.644-5.71)	0.242			
CEA > 5	1.234	(0.404-3.774)	0.712			
Left side	1.309	(0.403-4.253)	0.654			
Poor differentiated	1.534	(0.472-4.982)	0.477			
Mucinous	2.081	(0.461-9.394)	0.341			
T3-T4	5.034	(0.654-38.764)	0.121			
N+	4.021	(1.103-14.654)	0.035	1.983	(0.176-22.359)	0.58
M+	3.059	(0.938-9.976)	0.064	1.63	(0.443-6.004)	0.462
Lymph vascular invasion	4.021	(1.103-14.654)	0.035	1.394	(0.194-10.006)	0.741
Perineural invasion	3.582	(1.099-11.673)	0.034	2.54	(0.643-10.038)	0.184
Chemotherapy	2.911	(0.799-10.598)	0.105			
Stage III-IV	4.14	(1.136-15.087)	0.031	1.096	(0.144-8.353)	0.929
Low Exp POLH	1.839	(0.602-5.624)	0.285			
Low Exp POLK	1.213	(0.407-3.609)	0.729			
Low Exp POLQ	2.782	(0.855-9.055)	0.089	1.254	(0.215-7.33)	0.801
High Exp XRCC2	1.131	(0.38-3.368)	0.825			
Low Exp XRCC5	1.738	(0.568-5.32)	0.332			
Low Exp DCLRE1A	1.616	(0.528-4.944)	0.401			
Unmetilated POLH	1.134	(0.346-3.718)	0.835			
Unmetilated POLK	3.363	(0.908-12.46)	0.07	1.756	(0.306-10.062)	0.451
Unmetilated XRCC5	1.533	(0.406-5.786)	0.529			
Unmetilated DCLRE1A	2.778	(0.717-10.766)	0.139			
Pol k IHC Low	1.54	(0.517-4.586)	0.438			
XRCC5 IHC Low	2.968	(0.912-9.654)	0.071	1.802	(0.376-8.646)	0.461
BRAF mutated	1.363	(0.177-10.497)	0.766			
MLH1 IHC Low	2.06	(0.566-7.491)	0.273			
MSH2 IHC Low	1.266	(0.281-5.715)	0.759			
p53 IHC High	1.352	(0.442-4.135)	0.597			
Ki67 IHC Low	2.312	(0.301-17.785)	0.421			

T: tumor; N: lymph node; M: metastase; Exp: expression.

Table 6: Disease free survival calculated with univariate and multivariate cox regression tests.

Variable	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	CI (95%)	p value	HR	CI (95%)	p value
Age < 65 years	1.121	(0.342-3.677)	0.851			
Sex. male	2.878	(0.841-9.851)	0.092	2.287	(0.063-82.97)	0.652
CEA > 5	5.845	(1.538-22.068)	0.009	25.432	(0.258-2510.47)	0.258
Right side	1.425	(0.435-4.676)	0.559			
Poor differenciated	3.414	(0.736-15.838)	0.117			
Mucinous	1.139	(0.145-8.934)	0.901			
T3	36.142	(0.157-8313.8)	0.196			
N+	6.049	(1.295-28.245)	0.022	46.388	(0.083-25970.4)	0.235
Lymph vascular invasion	5.587	(1.201-25.998)	0.028	15.922	(0.026-9799.2)	0.398
Perineural invasion	4.323	(1.141-16.372)	0.021	16.76	(0.467-601.995)	0.123
Chemotherapy	4.678	(1.003-21.807)	0.049	6.629	(0.159-276.673)	0.32
Stage III	3.687	(0.971-14.005)	0.055	42.077	(0.201-8821.94)	0.17
High Exp POLH	1.621	(0.474-5.546)	0.442			
Low Exp POLK	2.05	(0.599-7.014)	0.253			
Low Exp POLQ	3.151	(0.834-11.906)	0.091	1.63	(0.244-10.867)	0.629
Low Exp XRCC2	1.955	(0.572-6.682)	0.285			
Low Exp XRCC5	1.936	(0.566-6.625)	0.293			
High Exp DCRLE1A	1.155	(0.351-3.797)	0.812			
Unmetilated POLH	1.23	(0.33-4.593)	0.758			
Unmetilated POLK	10.263	(1.292-81.531)	0.028	51.874	(0.221-12164.7)	0.156
Unmetilated XRCC5	4.438	(0.554-35.552)	0.16			
Metilated DCLRE1A	2.239	(0.409-12.26)	0.353			
Pol K IHC Low	1.581	(0.482-5.183)	0.45			
XRCC5 IHC Low	1.532	(0.467-5.031)	0.482			
BRAF wild	22.171	(0-1117704.6)	0.575			
MLH1 IHC Low	2.966	(0.776-11.334)	0.112			
MSH2 IHC Low	3.253	(0.857-12.35)	0.083	1.837	(0.343-9.842)	0.478
p53 IHC Low	4.888	(0.625-38.213)	0.13			
Ki67 IHC Low	26.615	(0.024-29262.2)	0.358			

T: tumour; N: lymph node; M: metastase; Exp: expression.

4. Discussion

A growing body of evidence has been strengthening the need for more accurate tools to minimize the inconsistencies of the TNM staging system as a prognostic and therapeutic guidance for CRC patients. Contribution of aberrant DNA repair and DNA damage response in carcinogenesis and its response to treatments is notoriously established. Furthermore, the study of DNA repair components as oncological molecular markers have already reached clinical practice, including *MGMT* promoter methylation status (glioblastoma) (23), *BRCA1/2* mutation (breast and ovarian cancer) (24-26) and MMR deficiency (colorectal, endometrial, ovarian and other cancer types) (27-32).

POLK and *POLH* encode members of DNA polymerase type-Y family of proteins, Pol κ and Pol η , respectively. Variations in expression or activity of Y-family DNA polymerases could possibly produce TLS pathway imbalance and, therefore, mutagenesis (33). However, the magnitude to which these alterations are oncogenic drivers or whether it impacts clinical outcomes is still unknown.

In our study, we found upregulation of *POLK* and downregulation of *POLH* in neoplastic tissues in comparison to paired normal tissues. The oncological relevance of pol κ and pol η in cancer is most firmly established concerning response to treatment. Upregulation of pol κ confers resistance to temozolomide in glioblastoma (34,35), and upregulation of pol η to platinum drugs in HNSCC, lung, gastric adenocarcinomas and ovarian cancers (36-38). Contrary to our results, low levels of *POLK* were previously observed in CRC (39,40). Conversely, others reported increase of pol κ expression in brain and lung cancers (41,42).

Low expression of *POLH* and *POLK* were found in tumors with mucinous histology and vascular metastasis, although in early stages of development. *POLK* promoter methylation was strongly associated with better DFS. Conversely, unmethylated *POLH* and *POLK* promoters were associated with more advanced and poorly differentiated tumors.

Despite finding more aggressive colorectal tumors harbouring high *POLK* levels, this fact was not a predictor of DFS and OS. In counterpart, *POLK* promoter methylation was associated with better DFS, but we could not confirm it as an

independent prognostic factor. Surprisingly, despite *POLK* gene and protein expression were associated ($p=0.001$), such connection was not found between *POLK* expression and promoter methylation. It may indicate that promoter methylation is not the main mechanism regulating *POLK* transcription.

On its turn, *POLQ* (A-family) encodes pol θ DNA polymerase and is a component of an end-joining pathway for DSB. Defects in *POLQ* lead to double-strand break-mediated genomic instability (43). Differently from previous reports (44,45), our patients presented downregulation of *POLQ*, but no association with clinicopathological parameters was detected. Overexpression of pol θ has been implicated as an indicator of poor prognosis and decreased survival in breast, colorectal and NSCLC (45-47). Nevertheless, to date, *POLQ* overexpression presented a weak association for better OS ($p=0.076$) and DFS ($p=0.068$).

DSBR (represented in our study by *XRCC2* and *XRCC5*) did not present alterations in gene expression between neoplastic and normal tissues nor associations with clinicopathological variables in CRC patients. To date, low *XRCC5*/Ku80 expression suggested poor OS in CRC patients included in our study ($p=0.057$). *XRCC5*/Ku80 is associated with risk of development of several tumors (48,49) and its activity may inhibit or promote the carcinogenic process, depending on the tumor type (50). In CRC, downregulation of *XRCC5* and/or its protein product (Ku80) was associated with poor prognosis and better response to radiotherapy (10,51-53). Regarding ICLR, despite *DCLRE1A* being upregulated in neoplastic tissues, it did not present associations with clinical features or survival in this study. *DCLRE1A* encodes SNM1A nuclease, and it has been linked to an important function in human ICL repair (54).

Finally, despite its sample size limitation, to the best of our knowledge, our study is one the few to report associations between *POLK*, *POLH* modulation and clinical features and prognosis of CRC patients. Furthermore, we believe that this is the first study to evaluate *DCLRE1A* gene expression and promoter methylation in colorectal tumors.

5. Conclusion

Components of the pathways involved in DSBR, DDT/TLS and ICLR are a new horizon in the DNA repair pathway discussion. There are few reports about these and the influence on clinico-pathological features and survival is still a big question. This study mainly revealed that low expression or unmethylated *POLH* and *POLK* were related do worse tumors. In this context, *POLK* methylated was strongly associated with better DFS with a propensity for a better OS. On the other hand, another interesting finding is the high score of XRCC5/Ku80 in IHQ suggests a better survival. Finally, even with little information about these pathways in relation to their clinicopathological influence and survival, this knowledge may help to clarify the utility of specific adjuvant treatments based on the individual's genotype in the future.

References:

1. Frederiksen BL, Jørgensen T, Brasso K, Holten I, Osler M. Socioeconomic position and participation in colorectal cancer screening. *Br J Cancer*. 2010;103(10):1496–501.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2019 Feb 24];68(6):394–424.
3. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal Cancer Statistics , 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):177–93.
4. Amin MB, Brookland RK, Compton CC, Gershenwald JE, Edge SB, Winchester DP, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93–9.
5. Huang Y, Kim BYS, Chan CK, Hahn SM, Weissman IL, Jiang W. Improving immune-vascular crosstalk for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):195–203.
6. Jang E, Chung DC. Hereditary colon cancer: Lynch syndrome. *Gut Liver*. 2010;4(2):77–88.
7. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. *J Clin Oncol* [Internet]. 2005;23(3):609–18.
8. Malesci A, Laghi L, Bianchi P, Montorsi M, Randolph A, Rosati R, et al. Reduced Likelihood of Metastases in Patients with Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(13):3831–9.
9. NCCN - Colon Cancer. Colon Cancer. NCCN Guidel [Internet]. 2018;1–832. Available from: www.nccn.org
10. Laporte GA, Leguisamo NM, Kalil AN, Saffi J. Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;126:168–85.

11. Mirza-Aghazadeh-Attari M, Darband SG, Kaviani M, Mihanfar A, Aghazadeh Attari J, Yousefi B, et al. DNA damage response and repair in colorectal cancer: Defects, regulation and therapeutic implications. *DNA Repair (Amst)*. 2018;69:34–52.
12. Bodor JN, Handorf EA, Feldman R, Hall MJ. Pathogenic somatic mutation (SM) of mismatch repair (MMR) genes and associations with microsatellite instability (MSI), tumor mutational burden (TMB) and SM in other DNA repair pathways in 24,223 tumor genomic profiles. *J Clin Oncol*. 2018 May 20;36(15_suppl):1505.
13. Shibata A, Jeggo PA. DNA Double-strand Break Repair in a Cellular Context. *Clin Oncol*. 2014;26(5):243–9.
14. Jekimovs C, Bolderson E, Suraweera A, Adams M, OByrne KJ, Richard DJ. Chemotherapeutic Compounds Targeting the DNA Double-Strand Break Repair Pathways: The Good, the Bad, and the Promising. *Front Oncol*. 2014;4(86):1–18.
15. Sale JE. Competition, collaboration and coordination - determining how cells bypass DNA damage. *J Cell Sci*. 2012;125(7):1633–43.
16. Zafar MK, Eoff RL. Translesion DNA Synthesis in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(11):1942–55.
17. 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(7 I):2101–8.
18. Xu K, Song X, Chen Z, Qin C, He Y, Zhan W. XRCC2 promotes colorectal cancer cell growth, regulates cell cycle progression, and apoptosis. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(28):e294.
19. Zhang YZ, An JH, Liu YX, Wu XC, Han SS, Ren XQ, et al. XRCC2-Deficient Cells are Highly Sensitive to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(3):1207–19.
20. Qin C-J, Song X-M, Chen Z-H, Ren X-Q, Xu K-W, Jing H, et al. XRCC2 as a predictive biomarker for radioresistance in locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative radiotherapy. *Oncotarget*. 2015;6(31):32193–204.
21. Cooper C. AJCC 8 th edition update *: Colorectal cancer Chapter 20.

22. McDonald JW, Pilgram TK. Nuclear expression of p53, p21 and cyclin D1 is increased in bronchioloalveolar carcinoma. *Histopathology*. 1999;34(5):439–46.
23. Binabaj MM, Bahrami A, ShahidSales S, Joodi M, Joudi Mashhad M, Hassanian SM, et al. The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *J Cell Physiol*. 2018;233(1):378–86.
24. Lee CK, Scott C, Lindeman GJ, Lieschke E, Boyle F, Hamilton A, et al. Phase 1 trial of olaparib and oral cyclophosphamide in BRCA breast cancer, recurrent BRCA ovarian cancer, non-BRCA triple-negative breast cancer, and non-BRCA ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2019;120(3):279–85.
25. Hoskins PJ, Gotlieb WH. Missed therapeutic and prevention opportunities in women with BRCA-mutated epithelial ovarian cancer and their families due to low referral rates for genetic counseling and BRCA testing: A review of the literature. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(6):493–506.
26. Baretta Z, Mocellin S, Goldin E, Olopade OI, Huo D. Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(40):e4975.
27. Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS, Paik S, Kirsch IR, Wolmark N, et al. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: A National Cancer Institute-national surgical adjuvant breast and bowel project collaborative study. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):767–72.
28. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:2449–60.
29. Kim MJ, Jeong S-Y, Choi S, Ryoo S-B, Park JW, Park KJ, et al. Survival Paradox Between Stage IIB/C (T4N0) and Stage IIIA (T1-2N1) Colon Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(2):505–12.
30. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509–20.
31. Le D, Durham J, Smith K, Wang H, Bartlett B, Aulakh L, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017;357(6349):409–13.

32. Halvarsson B, Anderson H, Domanska K, Lindmark G, Nilbert M. Clinicopathologic Factors Identify Sporadic Mismatch Repair–Defective Colon Cancers. *Am J Clin Pathol*. 2008;129(2):238–44.
33. Yang Y, Wang D, Jin L, Wu G, Bai Z, Wang J, et al. Prognostic value of the combination of microsatellite instability and BRAF mutation in colorectal cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:3911–29.
34. Bostian A, Maddukuri L, Reed M, Savenka T, Hartman J, Davis L, et al. Kynurenine signaling increases DNA polymerase kappa expression and promotes genomic instability in glioblastoma cells. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(1):101–8.
35. Peng C, Chen D, Wang H-W, Wang S, Qiu W, You Y, et al. The Error-Prone DNA Polymerase κ Promotes Temozolomide Resistance in Glioblastoma through Rad17-Dependent Activation of ATR-Chk1 Signaling. *Cancer Res*. 2016;76(8):2340–53.
36. Zhou W, Chen YW, Liu X, Chu P, Loria S, Wang Y, et al. Expression of DNA translesion synthesis polymerase η in head and neck squamous cell cancer predicts resistance to gemcitabine and cisplatin-based chemotherapy. *PLoS One*. 2013;8(12):1–10.
37. Teng KY, Qiu MZ, Li ZH, Luo HY, Zeng ZL, Luo RZ, et al. DNA polymerase η protein expression predicts treatment response and survival of metastatic gastric adenocarcinoma patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy. *J Transl Med*. 2010;8:1–9.
38. Ceppi P, Novello S, Cambieri A, Longo M, Monica V, Lo Iacono M, et al. Polymerase η mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(3):1039–45.
39. Lemée F, Bavoux C, Pillaire MJ, Bieth A, Machado CR, Pena SD, et al. Characterization of promoter regulatory elements involved in downexpression of the DNA polymerase κ in colorectal cancer. *Oncogene*. 2007;26(23):3387–94.
40. Pillaire MJ, Bétous R, Hoffmann JS. Role of DNA polymerase κ in the maintenance of genomic stability. *Mol Cell Oncol*. 2014;1(1).

41. Wang Y, Seimiya M, Kawamura K, Yu L, Ogi T, Nakagawara A, et al. Elevated expression of DNA polymerase κ in human lung cancer is associated with p53 inactivation: Negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int J Oncol*. 2004;25(17):161–5.
42. O-Wang J, Kawamura K, Tada Y, Ohmori H, Kimura H, Sakiyama S, et al. DNA polymerase κ , implicated in spontaneous and DNA damage-induced mutagenesis, is overexpressed in lung cancer. *Cancer Res*. 2001;61(14):5366–9.
43. Wood RD, Doublet S. DNA polymerase θ (POLQ), double-strand break repair, and cancer. *DNA Repair (Amst)*. 2016;44:22–32.
44. Kawamura K, Bahar R, Seimiya M, Chiyo M, Wada A, Okada S, et al. DNA polymerase is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. *Int J Cancer*. 2004;109(1):9–16.
45. Pillaire M-J, Selves J, Gordien K, Gouraud P-A, Gentil C, Danjoux M, et al. A ‘DNA replication’ signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. *Oncogene*. 2010;29(6):876–87.
46. Lemee F, Bergoglio V, Fernandez-Vidal A, Lacroix-Triki M, Pillaire M-J, Grimal F, et al. DNA polymerase up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(30):13390–5.
47. Allera-Moreau C, Rouquette I, Lepage B, Walschaerts M, Gordien K, Hoffmann JS, et al. DNA replication stress response involving PLK1, CDC6, POLQ, RAD51 and CLASPIN upregulation prognoses the outcome of early/mid-stage non-small cell lung cancer patients. *Oncogenesis*. 2012;1(e30):1–10.
48. Pucci S, Polidoro C, Joubert A, Mastrangeli F, Tolu B, Benassi M, et al. Ku70, Ku80, and sClusterin: A Cluster of Predicting Factors for Response to Neoadjuvant Chemoradiation Therapy in Patients With Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017;97(2):381–8.
49. Wang S, Wang M, Yin S, Fu G, Li C, Chen R, et al. A novel variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism containing Sp1 binding elements in the promoter of XRCC5 is a risk factor for human bladder cancer. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2008;638(1–2):26–36.

50. Xiao X, Xiao Y, Cheng W, Wang J, Liu Q, Wu T, et al. Ku80 cooperates with CBP to promote COX-2 expression and tumor growth. *Oncotarget*. 2015;6(10):8046–61.
51. Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, Matsumoto Y, Nakagawa K, Tsuno N, et al. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer*. 2002;95(6):1199–205.
52. Han L, Wu Z, Zhao Q. Revealing the molecular mechanism of colorectal cancer by establishing LGALS3-related protein-protein interaction network and identifying signaling pathways. *Int J Mol Med*. 2014;33(3):581–8.
53. Lu Y, Gao J, Lu Y. Down-expression pattern of Ku70 and p53 coexisted in colorectal cancer. *Med Oncol*. 2015;32(4):98.
54. Buzon B, Grainger R, Huang S, Rzedki C, Junop MS. Structure-specific endonuclease activity of SNM1A enables processing of a DNA interstrand crosslink. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(17):9057–66.

4. DISCUSSÃO

Mundialmente, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres, sendo a segunda causa de morte por câncer em países desenvolvidos (BRAY et al., 2018). No Brasil, estimou-se, para 2018, 36.360 novos casos. Estes valores correspondem a um risco estimado de 16,83 casos novos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres. A mortalidade estimada foi de 15.415 casos (INCA, 2018). A origem do CCR é multifatorial e complexa, resultando da interação entre fatores extrínsecos (ambientais) e intrínsecos (genéticos) (MALEKZADEH et al., 2009). Nos casos esporádicos, o tempo de desenvolvimento do CCR pode durar cerca de 10 anos, considerando desde o aparecimento da primeira mutação até a sua detecção clínica (BARDHAN & LIU, 2013). O tratamento primordial do CCR consiste na remoção cirúrgica do tumor primário em conjunto com a sua drenagem linfática e sua metástase em casos individualizados, sendo o paciente submetido a quimioterapia adjuvante e radioterapia de acordo com critérios como localização anatômica e estadiamento patológico (RÖDEL et al., 2015; XYNOS et al., 2016).

O estadiamento TNM é o principal parâmetro utilizado para determinação do prognóstico e da conduta terapêutica a ser empregada no CCR, sendo composto de características clinicopatológicas, as quais incluem avaliações quanto à invasividade tumoral mural, presença de comprometimento linfonodal e de metástases à distância. No entanto, este sistema revela apenas a manifestação clínica momentânea do tumor ao diagnóstico e não reflete a sua heterogeneidade molecular (BENSON et al., 2013; NIKOLOUZAKIS et al., 2018).

O principal efeito clínico das limitações do estadiamento TNM do CCR é o que resulta dos relatos que diversos pacientes classificados especificamente em estádios II e III pelo TNM, apresentam diferentes prognósticos e respostas ao tratamento, atualmente referido como “paradoxo da sobrevivência” (BENSON et al., 2013; DOTAN et al., 2012). Este paradoxo foi observado em pacientes com tumores de estágio IIB/C (T4N0) e estágio IIIa (T1-2N1), em 5 grandes estudos populacionais. Em três edições do SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*), a sobrevida de 5 anos identificada nos pacientes T4N0 foi de 72,2-70% e 83,4-87,7% para pacientes com tumores T1-2N1 (GUNDERSON et al., 2010; KIM et al., 2014; O’CONNELL et al.,

2008). A JSCCR (*Japanese Society of Cancer of the Colon and Rectum*) relatou sobrevida de 86,3 e 95,1%, respectivamente (WATANABE et al., 2018) e a AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) demonstrou resultados de sobrevida de 5 anos para o estágio IIIa de aproximadamente 70% e para o estágio IIB/C de 46-61% (AMIN et al., 2017; CHU et al., 2016b).

Os pacientes com CCR em estágio III são rotineiramente referenciados para quimioterapia adjuvante em razão do alto risco (50-60%) de recorrência metastática, apesar de uma ressecção cirúrgica potencialmente curativa do cólon (BENSON et al., 2004b; QUASAR COLLABORATIVE GROUP, 2007). Em contrapartida, pacientes com CCR estágio II não são encaminhados para terapia adjuvante pelas diretrizes atuais, uma vez que vários estudos não conseguiram demonstrar seu benefício (BENSON et al., 2013; O'CONNELL; MAGGARD & KO, 2004; QUASAR COLLABORATIVE GROUP, 2007). Todavia, pacientes com CCR estágio II são um grupo altamente heterogêneo e desafiador na estratificação de risco baseada no sistema TNM devido ao fato de apresentar um risco de 20 a 30% de recidiva (BENSON & HAMILTON, 2011; DOTAN & COHEN, 2011). Embora as recomendações sejam dadas para a consideração de terapia adjuvante em pacientes em estágio II com características clinicopatológicas de alto risco (tumores T4 (estádio IIB/IIC); histologia pouco diferenciada, invasão linfovascular e/ou perineural, presença de obstrução ou perfuração intestinal, margens positivas ou indeterminadas e amostragem inadequada de linfonodos (<12 linfonodos dissecados), as diretrizes internacionais consideram que esta definição permanece inadequada (SCHMOLL et al., 2015). Portanto, o “paradoxo da sobrevivência” no CCR pode ser explicado principalmente pela amostragem linfonodal inadequada (não identificando os pacientes com metástase linfonodal), assim como a não realização de quimioterapia sistêmica nos pacientes em estágio IIB/C (CHU et al., 2016b; HARI et al., 2013; O'CONNELL; MAGGARD & KO, 2004).

Assim, é fato que o estadiamento tradicional possui limitações, pois inclui somente fatores clinicopatológicos e ainda não abrange variáveis moleculares capazes de retratar comportamentos individuais deste tumores, o que implica em limitações sobre o prognóstico e ainda não permite a distinção entre possíveis subgrupos para a prescrição de terapias mais direcionadas (BENSON & HAMILTON, 2011). Estas inconsistências e limitações impulsionam uma série de estudos que

buscam identificar parâmetros moleculares prognósticos e preditivos como definidores de manejo.

Para tentar refinar o estadiamento clínico e equacionar as inconsistências entre as classificações do CCR baseadas nas alterações moleculares encontradas até então, foi descrita a classificação CMS (do inglês, *Consensus Molecular Subtypes*), a qual buscou compilar seis sistemas de classificação independentes previamente publicados (BUDINSKA et al., 2013; DE SOUSA E MELO et al., 2013; MARISA et al., 2013; ROEPMAN et al., 2014; SADANANDAM et al., 2013). Este estudo estratificou o CCR em quatro subtipos moleculares de acordo com assinaturas moleculares e características clínicas: CMS1 (subtipo instabilidade de microssatélite ou imune, com uma prevalência de 14%) caracterizado por ser hipermutado, com MSI e forte ativação imunológica, associado a pior sobrevida após recidiva; CMS2 (canônico, com uma prevalência de 37%), do tipo epitelial com ativação das vias WNT (do inglês, *Wingless/Integrated*) e MYC (do inglês, *myelocytomatosis*); CMS3 (subtipo metabólico, com uma prevalência de 13%), com presença de desregulação metabólica epitelial; e CMS4 (subtipo mesenquimal, com uma prevalência de 23%), com ativação proeminente do fator de crescimento transformador- β (TGF- β), invasão estromal e pronunciada angiogênese, assim como associado a pior sobrevida geral e sobrevida livre de doença. Há ainda amostras com características mistas (13%) possivelmente representando um fenótipo de transição ou heterogeneidade intratumoral (DIENSTMANN et al., 2017; GUINNEY et al., 2015).

Dentro deste contexto molecular, surge a relevância dos sistemas de reparo do DNA, os quais são essenciais para a correção dos danos decorrentes da exposição a agentes externos ou internos ou, ainda, aqueles oriundos dos próprios processos de replicação celular (LORD & ASHWORTH, 2012). Quando não reparadas adequadamente, estas lesões podem induzir as células, em um melhor cenário, à morte ou senescência ou podem ser as precursoras de processos carcinogênicos. As vias de reparo de DNA são didaticamente divididas de acordo com a natureza da lesão que irão reconhecer e corrigir. Contudo, cada vez mais evidências apontam para o *crosstalk* e a sobreposição entre elas no processamento de lesões ao DNA (FU; CALVO & SAMSON, 2012; MALAQUIN et al., 2015; MICHL; ZIMMER & TARSOUNAS, 2016; SIMONELLI et al., 2012).

Além da notória contribuição dos desequilíbrios na tumorigênese (REILLY et al., 2019), a própria terapia antineoplásica padrão do CCR (5-FU em combinação com a oxaplatina - FOLFOX - ou irinotecano – FOLFIRI -) se baseia na indução de danos ao DNA (HELLEDAY et al., 2008). Ainda, as vias de reparo do DNA já são utilizadas como marcadores moleculares prognósticos e definidores de tratamento em outros tipos de tumores como na neoplasia de mama (pesquisa de mutações em *BRCA1/2* para uso de olaparibe ou talazoparibe) (HOSKINS & GOTLIEB, 2017; LEE et al., 2019; LITTON et al., 2018) e no glioblastoma (pesquisa de metilação no promotor do gene *MGMT* para uso de temozolomida) (BINABAJ et al., 2018; HEGI et al., 2005).

A relevância clássica do estudo dos sistemas de reparo do DNA no CCR é oriunda da sua associação com a Síndrome de Lynch, a qual resulta de mutações germinativas nos genes do MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*), a presença elevada de instabilidade de microssatélites e responde por cerca de 2 a 4% dos casos dos tumores intestinais (AALTONEN et al., 1998; HAMPEL et al., 2005, 2008; LYNCH; CHAPELLE & DE LA CHAPELLE, 2003).

Em relação ao CCR esporádico, que responde por cerca de 85% dos casos (BOLAND & GOEL, 2010; FEARON & VOGELSTEIN, 1990), as vias de reparo de DNA têm ganhado destaque, principalmente com a pesquisa de MSI, uma vez que este fenótipo manifesta-se em 10-15% destes tumores (ALDUBAYAN et al., 2018; PEARLMAN & FRANKEL, 2017). Clinicamente, tumores colorretais com MSI são considerados de melhor prognóstico, com maior sobrevida, contudo os pacientes não se beneficiaram da quimioterapia adjuvante com 5-FU (POPAT; HUBNER & HOULSTON, 2005; THIBODEAU; BREN & SCHAID, 1993).

O capítulo I desta Tese apresentou uma revisão intitulada “*Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer*”, publicada no periódico *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (LAPORTE et al., 2018). Neste manuscrito, revisamos sistematicamente os valores preditivo e prognóstico das alterações na expressão de genes e proteínas de todas as vias do sistema de reparo do DNA que não MMR em tumores colorretais, incluindo trabalhos do nosso grupo (AZAMBUJA et al., 2017; LEGUISAMO et al., 2017; MEIRELLES, 2016). Através desta revisão foi possível demonstrar que a aplicabilidade clínica da modulação destas vias no CCR ainda não foi encontrada em virtude da heterogeneidade dos resultados publicados, o que reflete não somente a complexidade molecular desta doença como as dificuldades em se

encontrar candidatos a biomarcadores. Neste trabalho foi observado uma escassez de dados nas vias de tolerância ao dano/síntese translesão (TLS/DDT), reparo de quebras duplas (DSBR) e o reparo de ligações intercadeias ou *crosslinks* (ICLR). Adicionalmente, outro motivo para a escolha para o estudo destas vias na nossa população é o fato de que os danos ocasionados pela terapia adjuvante levam a geração de lesões processadas por estas vias, incluindo quebras duplas e *crosslinks* (LI et al., 2017; RAY; GUPTA & MEHROTRA, 2018; ZENG et al., 2017). Assim, o entendimento do comportamento molecular de componentes-chave destas vias pode fornecer informações visando a refinar o prognóstico e, em um outro momento, determinar o papel preditivo sobre a resposta terapêutica baseada nestes agentes.

Seguindo a perspectiva de explorar vias ainda pouco estudadas no CCR, o capítulo II desta tese apresenta o manuscrito intitulado “*The role of Double Strand Break Repair, Translesion Synthesis and Interstrand Crosslinks in Colorectal Cancer progression – clinicopathological data and survival*”, a ser submetido na *BMC Cancer*. Este trabalho objetivou identificar a associação entre a modulação dos genes e das proteínas das vias TLS/DDT, DSBR e ICLR. Nossos principais achados clinicopatológicos referem-se à associação entre baixa expressão gênica e presença de metilação dos promotores de *POLH* e *POLK* a tumores clinicamente considerados mais agressivos, enquanto a metilação do promotor de *POLK* em tumores colorretais foi associada à melhor sobrevida livre de doença. Um resumo dos achados deste estudo são apresentados no Diagrama (Figura 1).

No CCR, já há alguns consensos que recomendam o uso de marcadores moleculares, especialmente como direcionadores terapêuticos, como a pesquisa de mutação em *KRAS*, *NRAS* e, mais recentemente, em *BRAF* e também a identificação da presença de MSI (DE ROOCK et al., 2010; DOUILLARD et al., 2013; NCCN - COLON CANCER, 2018; SEPULVEDA et al., 2017; VAN CUTSEM et al., 2016c; WATANABE et al., 2018). Na prática clínica atual, pacientes com CCR metastático devem ser genotipados para mutações de *KRAS* e *NRAS* (exons 2, 3, 4) que, quando presentes, contraindicam a utilização de cetuximabe ou panitumumabe (FRATTINI et al., 2007; ROTH et al., 2010; THERKILDSEN et al., 2014). Contrariamente, a presença da mutação *BRAF*^{V600E} indica o uso de vemurafenibe em pacientes com CCR metastático, a qual ocorre entre 2,5-15% dos pacientes (CLANCY et al., 2013; LI et

al., 2011; OGINO et al., 2012; PRICE et al., 2011; SIRAJ et al., 2014; ZLOBEC et al., 2010). No nosso estudo, em apenas 4 pacientes foi identificada a mutação *BRAF*^{V600E}.

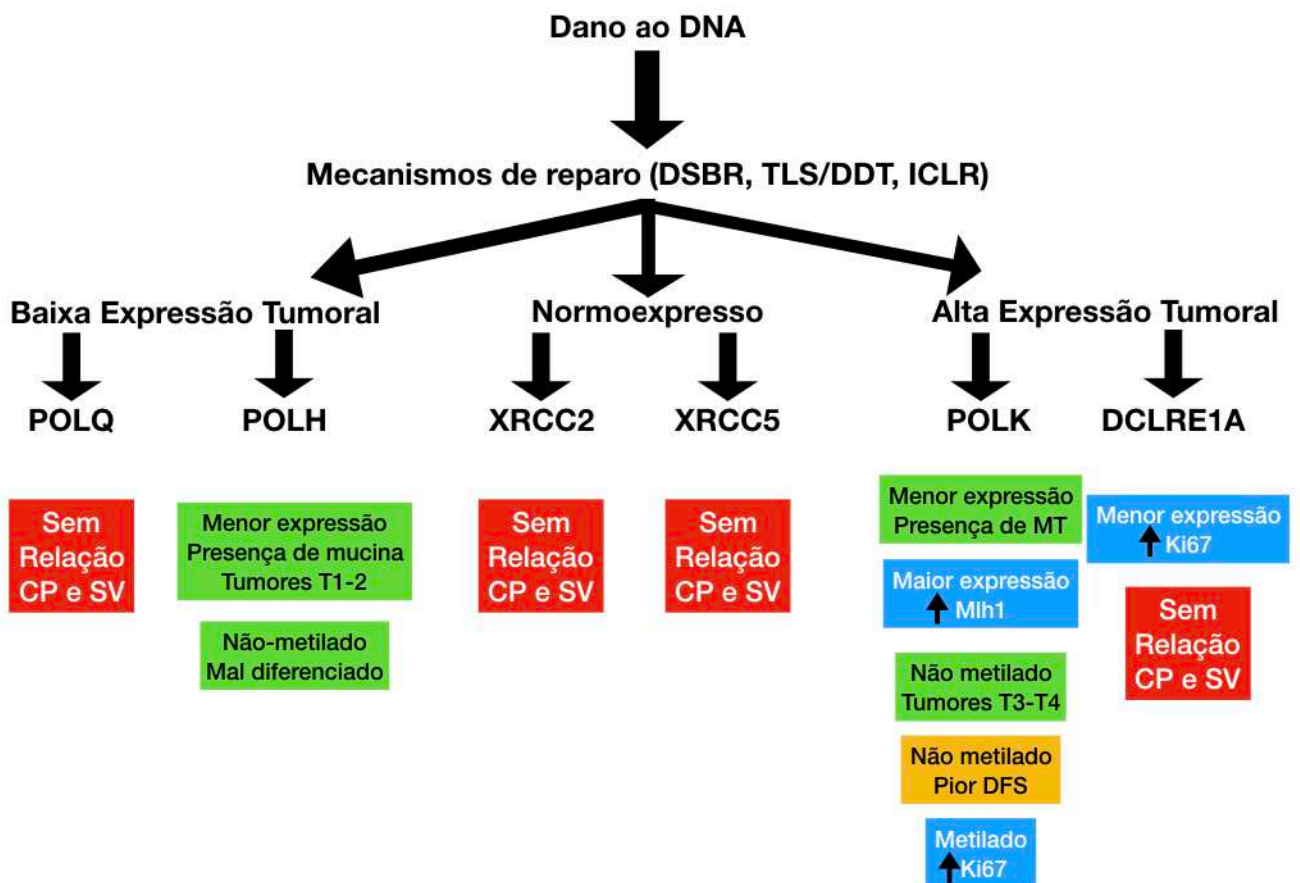


Figura 1: Diagrama que demonstra o resumo dos dados clinicopatológicos e sobrevida dos pacientes com CCR em relação aos genes pesquisados. DSBR: reparo de quebras duplas no DNA; TLS/DDT: síntese translesão; ICLR: reparo de ligação intercadeia; CP: clinicopatológico; SV: sobrevida; MT: metástase; DFS: sobrevida livre de doença; Cor vermelha: sem associação com sobrevida e dados clinicopatológicos; Cor verde: associação com dados clinicopatológicos; Cor amarela: associação com dados de sobrevida; Cor azul: associação com dados de IQH.

No CCR esporádico, a MSI pode estar presente em aproximadamente 15% dos pacientes, (HALVARSSON et al., 2008), sendo um dado fundamental para a decisão terapêutica em pacientes estágio II e IV (NCCN - COLON CANCER, 2018). Mutações e silenciamento por inativação epigenética nos genes da via MMR podem resultar em deficiência de uma ou mais das suas principais proteínas efetoras, *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* e *PMS6*, levando à inativação completa da via (MARKOWITZ & BERTAGNOLLI, 2009). Cerca de 15-20% dos tumores colorretais esporádicos

apresentam MSI por inativação epigenética de *MLH1* (HALVARSSON et al., 2008), sendo presente em 14,9% (*MLH1* por IHQ) e 12,8% (*MSH2* por IHQ) do nosso trabalho, sem modificação da sobrevida. Além disso, os tumores com MSI apresentam alta produção de antígenos tumorais com infiltração linfocitária tumoral e aumento da expressão de PD-L1 (GERMANO et al., 2018; LLOSA et al., 2015) sendo responsivos ao bloqueio imune com pembrolizumabe (GERMANO et al., 2017; LE et al., 2017b; LUKSKA et al., 2017; MCGRANAHAN et al., 2016; MOISEYENKO et al., 2018). Apesar da quantidade expressiva de estudos sobre a funcionalidade da via MMR e aspectos clínicos e terapêuticos do CCR, esta é a relevância mais consolidada da interação das vias de reparo de DNA nestes tumores. Ainda assim, a indicação de pesquisa de MSI restringe-se a um subgrupo específico de pacientes (estádio II e considerados de alto risco) e configura apenas um direcionador terapêutico, mas ainda de valor prognóstico discutível. Isto denota que a busca por biomarcadores e a estratificação molecular do CCR parece ser muito mais complexa.

A ligação entre TLS e a carcinogênese foi originalmente identificada através do estudo de *POLH* (MASUTANI et al., 1999). Neste estudo, foram descritas as polimerases *POLK* e *POLH* que codificam, respectivamente, as proteínas Pol κ e Pol η , membros da família de polimerases do tipo Y. Sabe-se que variações na expressão ou atividade de DNA polimerases da família Y possivelmente induzem um desequilíbrio na via TLS e, portanto, são consideradas mutagênicas (YANG et al., 2018). No entanto, a magnitude com que essas alterações são oncogênicas e que influenciam os resultados clínicos ainda é desconhecida. Nosso estudo observou superexpressão de *POLK* e menor expressão de *POLH* em tecidos neoplásicos em comparação aos tecidos saudáveis. A maior expressão de Pol κ confere resistência à temozolomida no glioblastoma (BOSTIAN et al., 2016; PENG et al., 2016), e a maior expressão de Pol η aos fármacos derivados da platina em tumores epidermóides de cabeça e pescoço, pulmão, adenocarcinomas gástricos e tumores epiteliais ovarianos (CEPPI et al., 2009; TENG et al., 2010; ZHOU et al., 2013). Em relação ao CCR, a baixa expressão de *POLK* foi previamente observada no CCR (LEMÉE et al., 2007; PILLAIRE; BÉTOUS & HOFFMANN, 2014), resultado diverso ao encontrado no nosso estudo, que pode ser explicado pela perda da heterozigosidade das células tumorais. (BAVOUX et al., 2005; PILLAIRE; BÉTOUS & HOFFMANN, 2014). Esta diferença também pode ser explicada pelas formas diversas de determinar a expressão gênica

entre os estudos e, especialmente, pelas formas diferentes de determinação dos pontos de corte que dicotomizam os tumores com alta e baixa expressão. Outro aspecto a se discutir é a verdadeira relevância biológica destas alterações sobre o desenvolvimento tumoral e se, de fato, se traduzem clinicamente.

No nosso estudo foi utilizada a técnica de transcrição quantitativa reversa PCR (RT-qPCR), sendo empregada a mediana do valor expresso nos tecidos tumorais para a análise de dados clinicopatológicos e de sobrevida. Este tipo de análise aumenta a validade interna deste estudo, no entanto a validade externa torna-se prejudicada pois existem diversas técnicas de análise de expressão de RNA, assim como cada grupo estudado terá sua própria mediana dependente da expressão gênica do grupo estudado. Foi optado pelo uso da mediana tumoral pois no dia-a-dia clínico a coleta de marcadores é rotineiramente feita diretamente das lesões retiradas ou biopsiadas, sendo o mais fidedigno para um futuro uso dos dados apresentados.

As baixas expressões de *POLH* e *POLK* foram encontradas em tumores com histologia mucinosa e metástase vascular, embora em estágios iniciais de desenvolvimento. A metilação do promotor de *POLK* foi fortemente associada à melhor sobrevida livre de doença. Por outro lado, tumores ausentes de metilação nos promotores de *POLH* e *POLK* apresentavam-se em estágios mais avançados e com baixo grau de diferenciação celular.

A base molecular da relação da alta expressão de Pol κ e a carcinogênese pode ser pelo efeito mutador. A alta fidelidade da replicação do DNA humano, aproximadamente um erro para cada 10^9 – 10^{11} nucleotídeos polimerizados, é um resultado de um processo de múltiplas etapas do sistema de reparo do DNA e suas polimerases. Uma das hipóteses consideradas é que uma maior expressão leva a uma mutagênese não direcionada ao longo das regiões não danificadas do DNA, contribuindo para a transformação de um fenótipo mutador que combinado a outras vias pode iniciar ou acelerar a progressão tumoral (BERGOGLIO et al., 2002; HOFFMANN & CAZAUX, 2010), ocasionada por um “*stress*” replicativo (PILLAIRE; BÉTOUS & HOFFMANN, 2014), podendo levar a quebras dupla no DNA, instabilidade genômica e mutações no p53, formação de micronúcleos e aneuploidias (BAVOUX et al., 2005; HALAZONETIS; GORGOULIS & BARTEK, 2008; JONES & PETERMANN, 2012) acarretando a perda de heterozigosidade (BAVOUX et al., 2005; PILLAIRE; BÉTOUS & HOFFMANN, 2014). Portanto, o excesso de Pol κ pode não apenas induzir

diretamente um fenótipo mutador, mas também pode modificar importantes parâmetros de replicação que, por sua vez, desencadeiam a instabilidade cromossômica. A menor expressão de Pol κ contribui para a instabilidade genética e a progressão do câncer. Esse mecanismo ocorre quando as células aumentam a formação de γ -H2AX (do inglês, *H2A histone family member X*) na fase S, que é indicativo da parada ou colapso da forquilha de replicação (como observado nas células no xeroderma pigmentoso (com deficiência no NER) e em situações de baixa concentração de oxigênio celular (BÉTOUS et al., 2013; BIARD et al., 2005), levando a uma redução do reparo, mantendo quebras de cadeias, por conseguinte a uma ausência na replicação do DNA (PILLAIRE; BÉTOUS & HOFFMANN, 2014; STANCEL et al., 2009).

Apesar de termos encontrado altos níveis de *POLK* nos tumores colorretais mais agressivos, esta característica não demonstrou valor prognóstico. Em contrapartida, a presença de metilação do promotor de *POLK* foi associada com melhor sobrevida livre de doença, mas não pudemos confirmá-lo como um fator prognóstico independente através da análise multivariada. Surpreendentemente, apesar da expressão do gene e da proteína Pol κ estarem associados ($p = 0,001$), não foi encontrada relação entre a expressão de *POLK* e a metilação do promotor, indicando que a metilação do promotor pode não ser o mecanismo principal que regula a transcrição de *POLK*.

A presença de metilação do promotor de *POLK* demonstrou estar em associação com a alta expressão de Ki67 neste grupo de pacientes estudados, sendo um dado estatístico encontrado a ser melhor estudado molecularmente. O Ki67 é utilizado como marcador de proliferação celular, sendo que a sua presença determina a fração de crescimento de uma dada população de células (MELLING et al., 2016; SCHOLZEN & GERDES, 2000). Ele é um antígeno nuclear, que é expresso em células em proliferação da fase G1 para a fase M do ciclo celular. Muitos estudos mostraram um papel preditivo do Ki67 em uma ampla gama de malignidades humanas, incluindo tumores estromais gastrointestinais, tumores neuroendócrinos gastrointestinais e câncer de próstata e de mama (DE AZAMBUJA et al., 2007; JONES et al., 2008; POLLACK et al., 2004; YAMAGUCHI et al., 2013; ZHAO et al., 2014). Existem poucos e contraditórios estudos sobre o papel prognóstico do Ki67 no CCR (PORSCHEN et

al., 1989; REIMERS et al., 2014; SALMINEN et al., 2005) e, até o momento, não há estudos que tenham reportado estas associações.

Por sua vez, *POLQ* codifica a DNA polimerase Pol θ , pertencente à família A Pol θ é um componente do BER e da TLS de danos exógenos que está implicada na estabilidade genômica (WOOD & DOUBLIE, 2016). A Pol θ tem um papel importante quando o HR ou NHEJ são deficientes, pois as células tornam-se mais dependentes do reparo mediado por esta para sua proliferação (BLACK et al., 2016). Ela possui a habilidade de processar sítios abásicos inserindo um resíduo de adenina, possuindo uma alta capacidade de estender a polimerização a partir deste resíduo, por possuir atividade de 5'-deoxiribose-fosfato-liase (dRp-liase) (YOUSEFZADEH & WOOD, 2014). Diferentemente do que foi reportado por outros autores (KAWAMURA et al., 2004; PILLAIRE et al., 2010), nossos pacientes apresentaram uma menor expressão de *POLQ*, mas sem associação com os parâmetros clinicopatológicos. No entanto, no grupo estudado, a expressão de *POLQ* apresentou fraca associação para melhor sobrevida geral ($p = 0,076$) e sobrevida livre de doença ($p = 0,068$). A superexpressão de pol θ tem sido implicada como um indicador de mau prognóstico e diminuição da sobrevida em câncer de mama, colorretal e tumores epidermóides de cabeça e pescoço (ALLERA-MOREAU et al., 2012; LEMEE et al., 2010; PILLAIRE et al., 2010).

As quebras duplas do DNA, quando não reparadas, são uma das formas mais tóxicas que ativam respostas de morte celular, promovendo instabilidade genômica através da geração de sucessivas translocações e aneuploidias (KREJCI et al., 2012). O DSBR (representado em nosso estudo por *XRCC2*, *XRCC5* e Ku80) não apresentou alterações na expressão gênica entre tecidos neoplásicos e normais nem associações com variáveis clinicopatológicas em pacientes com CCR. No grupo estudado, a baixa expressão de Ku80 sugeriu pior sobrevida geral em pacientes com CCR incluídos ($p=0,057$). As alterações de expressão de *XRCC5*/Ku80 estão associadas à carcinogênese de várias neoplasias (PUCCI et al., 2017; WANG et al., 2018) e sua atividade pode inibir ou promover este processo, o que varia de acordo com a origem e o tipo do tumor (XIAO et al., 2015). No CCR, a regulação negativa de *XRCC5* e/ou seu produto proteico (Ku80) foi associada a um mal prognóstico e melhor resposta à radioterapia (KOMURO et al., 2002; LAPORTE et al., 2018; LU; GAO & LU, 2014, 2015).

As ligações intercadeias (ICL) ou *crosslinks* são lesões que bloqueiam processos celulares essenciais, como a transcrição e a replicação (NOLL; MASON & MILLER, 2006). Estas lesões são a base da toxicidade de muitos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer, assim como também podem ser originadas de lesões endógenas e ambientais (GRILLARI; KATINGER & VOGLAUER, 2007; SCHÄRER, 2005). Nas células neoplásicas, o reparo de ICL é um mecanismo indesejável pelo qual os tumores podem adquirir resistência a quimioterápicos (MCHUGH; SPANSWICK & HARTLEY, 2001). Em relação a esta via, apesar de o *DCLRE1A* estar mais expresso nos tecidos neoplásicos, não apresentou associações com características clinicopatológicas ou sobrevida neste estudo. O *DCLRE1A* codifica a nuclease SNM1A e demonstrou desempenhar uma função importante na reparação do ICL humano (BUZON et al., 2018). Até onde se sabe, esse estudo é também o primeiro a avaliar a expressão do gene *DCLRE1A* e a metilação de seu promotor em tumores colorretais.

De modo a validar externamente este estudo, comparou-se a expressão gênica no CCR dos genes pesquisados nesse estudo, com dados do GDC (Genomic Data Commons) *TCGA* (The Cancer Genome Atlas) *Colon Cancer data através do portal Xena Functional Genomics Explorer* (<https://xenabrowser.net>), pertencente ao banco de dados do National Cancer Institute (<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-COAD>) e verificou-se semelhança nos resultados em relação a sobrevida geral, exceto o *DCLRE1A* (Figura 2).

Apesar da limitação do tamanho da amostra, até onde sabemos, nosso estudo é um dos poucos a relatar associações entre a modulação *POLK/Pol κ*, *POLH/Pol η*, características clinicopatológicas e o prognóstico de pacientes com CCR esporádico. O aumento da amostra poderia aumentar o poder estatístico, bem como poderia permitir a estratificação dos pacientes pelo estadiamento ou por subgrupos moleculares, podendo auxiliar na compreensão do paradoxo da sobrevivência dos pacientes nos estágios II e III. O pequeno número de pacientes incluídos neste estudo pode ser explicado pela restrição de pacientes que preenchem os critérios de inclusão do estudo, especificamente aqueles não submetidos a tratamento neoadjuvante e cujos prontuários estivessem completos.

A análise da expressão gênica também pode ser considerada uma limitação pelo fato do tumor ser heterogêneo, sendo este fator dependente da região do tumor

analisada. A heterogeneidade tumoral demonstrou que pode influenciar a estratificação dos pacientes em relação a seu prognóstico e resposta ao tratamento (DUNNE et al., 2017), assim como influenciar a classificação do subtipo molecular do CCR (DUNNE et al., 2016). Esta heterogeneidade decorre do microambiente tumoral (matriz extracelular, células estromais e células imunes) e interações do tumor com o hospedeiro, ocorrendo não apenas no local da lesão primária, mas também em todo o organismo, como resultado da metastatização, tornando cada pessoa com seu tumor, uma interatividade única e sem um padrão clínico e molecular definido (BLANCO-CALVO et al., 2015; ISELLA et al., 2015).

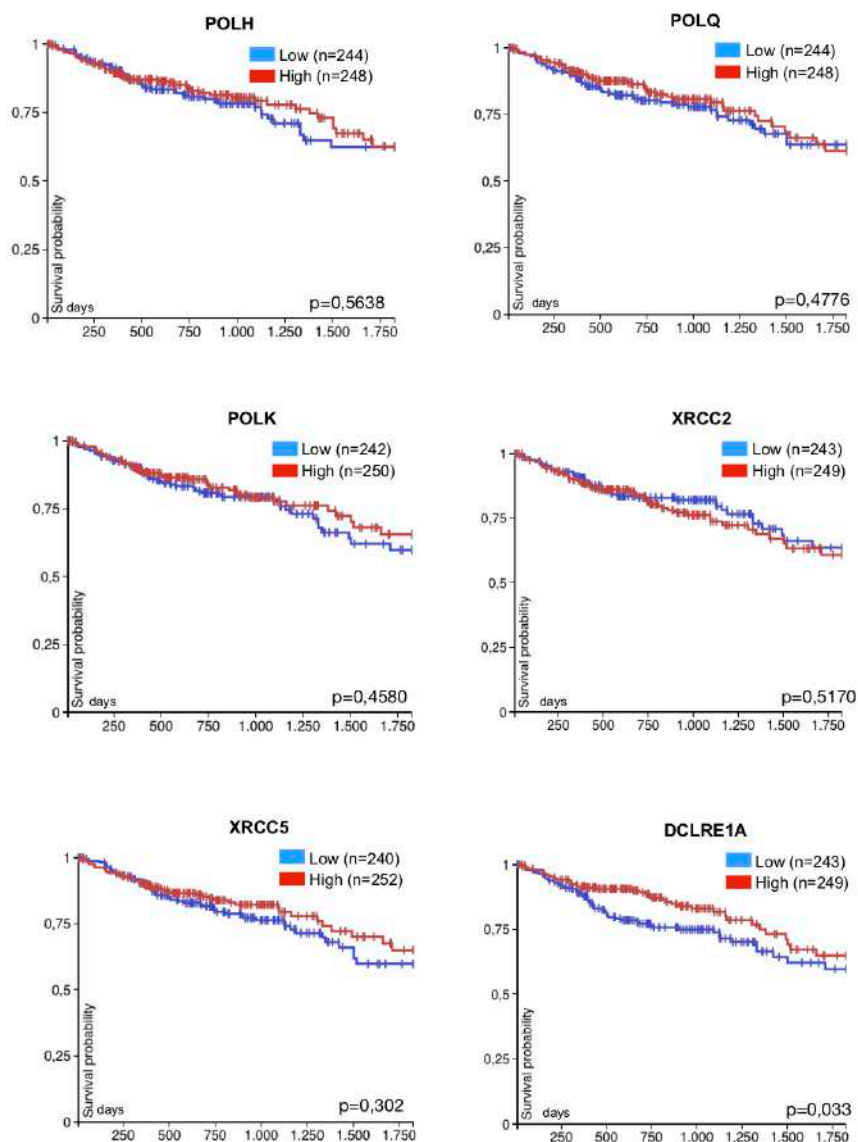


Figura 2: Sobrevida dos pacientes do *GDC TCGA Colon Cancer Data*, onde verificou-se semelhança nos resultados em relação a sobrevida geral, exceto o DCLRE1A.

Em suma, apesar do câncer colorretal ser um tumor prevalente mundialmente, ainda há muito a ser pesquisado acerca de seu comportamento biológico e a interação

com o tratamento com a identificação de novos fatores preditivos e prognósticos. Os componentes das vias envolvidas no DSB, DDT / TLS e ICLR são um novo horizonte na discussão da via de reparo do DNA, com poucos relatos na literatura em relação a sua influência nas características clinicopatológicas e de sobrevida, sendo assim uma grande questão a ser respondida. Este estudo demonstrou que a baixa expressão e a não metilação de *POLH* e *POLK* estavam relacionados com tumores com piores características clinicopatológicas. Adicionalmente, a metilação do promotor de *POLK* foi fortemente associada com melhor sobrevida livre de doença com uma propensão para uma melhor sobrevida geral. Por outro lado, outro achado interessante é que a alta expressão de *POLQ*, sugeriu uma correlação com melhor sobrevida geral e a alta expressão de *POLQ* e a metilação do promotor de *POLQ*, assim como *XRCC5/Ku80* na IHQ sugeriram uma associação com uma melhor sobrevida livre de doença. Finalmente, mesmo com poucas informações sobre essas vias em relação à sua influência clinicopatológica e sua influência na sobrevida, esse conhecimento pode ajudar, em um futuro próximo, a esclarecer a utilidade de tratamentos adjuvantes específicos baseados no genótipo do indivíduo de uma forma geral ou em um subgrupo de pacientes.

5. CONCLUSÃO

- Os componentes-chave das vias envolvidas no DSBR, TLS/DDT e ICLR podem representar um novo horizonte do estudo do reparo do DNA no CCR. Há poucos relatos sobre a influência da modulação destas vias sobre nas características clinicopatológicas e sobrevivência no CCR;

- Encontrou-se uma menor expressão de *POLH* no tecido neoplásico em relação ao tecido saudável pareado e associação entre a baixa expressão de *POLH* no tecido tumoral e tumores em estágios iniciais de desenvolvimento (T1-T2), mas agressivos (com presença de mucina). Em contrapartida, tumores com promotores de *POLH* não metilados foram associados a perfis mais agressivos (menor diferenciação celular). No entanto, nem as alterações na expressão gênica de *POLH* ou a metilação do seu promotor foram associadas à desfechos prognósticos;

- *POLK* apresentou-se superexpressa nos tecidos neoplásicos em relação aos tecidos normais pareados. Contudo, quando menor a sua expressão nos tumores, maior a força de associação com risco de metastatização. Adicionalmente, a metilação do promotor de *POLK* associou-se fortemente com melhor sobrevida livre de doença com uma propensão para uma melhor sobrevida global;

- *POLQ* apresentou menor expressão em tecidos normais, *XRCC2* e *XRCC5* encontraram-se normoexpressos e *DCLRE1A* hiperexpresso. Alterações na expressão gênica de *POLQ*, *XRCC2*, *DCLRE1A* não apresentaram associação com os achados clinicopatológicos e sobrevida., exceto altos scores da expressão proteica de *XRCC5* que sugeriram melhor sobrevida geral;

- Em relação aos dados de IHQ de MLH1, MSH2, p53, Ki67 e a mutação de BRAF V600E, verificou-se que a maior expressão de MSH2 foi associada a menor presença de metástases;

- Foi verificado que a correlação da expressão protéica de MLH1, MSH2, p53 e Ki67 em relação a expressão gênica de *POLH*, *POLQ*, *POLK*, *XRCC2*, *XRCC5* e *DCLRE1A*, padrões de metilação do promotor de *POLH*, *POLK*, *XRCC5* e *DCLRE1A* e a expressão proteica de *POLK* e *XRCC5/Ku80*, esteve presente quando maior expressão de *POLK* foi associada com maior expressão de MLH1 e a metilação de seu promotor com aumento da expressão do Ki67, no entanto quando menor expressão de *DCLRE1A* foi associada com maior expressão de Ki67;

- Finalmente, mesmo com grupo com tamanho amostral restrito e poucas informações sobre essas vias de reparo do DNA em relação à sua influência clinicopatológica e sobrevida no CCR, este novo conhecimento pode ajudar a esclarecer a utilidade destes marcadores moleculares como fatores prognósticos e no futuro serem preditivos no tratamento adjuvante baseado no genótipo do indivíduo.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho, há o planejamento do aumento do número de pacientes a ser incluído em futuros estudos, bem como o aumento da variedade de genes a serem pesquisados. Adicionalmente, está sendo realizada a pesquisa das alterações moleculares nas metástases dos tumores em comparação com o tumor primário com o objetivo de identificar alguma característica que podem conferir agressividade e alterar os resultados de sobrevida ou influenciar o tratamento adjuvante dos pacientes com CCR.

7. REFERÊNCIAS:

- AALTONEN, LAURI A. et al. Replication Errors in Benign and Malignant Tumors from Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Patients'. *Cancer Research*, v. 54, n. 17, p. 1645–48, 1994.
- AALTONEN, LAURI A. et al. Incidence of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and the. *New England Journal of Medicine*, v. 338, n. 21, p. 1481–1487, 1998.
- ABDUL AZIZ, NURUL AININ et al. A 19-Gene expression signature as a predictor of survival in colorectal cancer. *BMC Medical Genomics*, v. 9, n. 1, p. 58, 2016.
- AGHILI, MAHDI 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. 35–41, 2010.
- AIT OUAKRIM, DRISS et al. Trends in colorectal cancer mortality in Europe: retrospective analysis of the WHO mortality database. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 351, p. h4970, 2015.
- ALBERTELLA, MARK R. et al. A role for polymerase η in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. *Cancer Research*, v. 65, n. 21, p. 9799–9806, 2005.
- ALDUBAYAN, SAUD H. et al. Inherited DNA-Repair Defects in Colorectal Cancer. *American Journal of Human Genetics*, v. 102, n. 3, p. 401–414, 2018.
- ALLEGRA, CARMEN J. 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, n. 12, p. 2091–2096, 2009.
- ALLERA-MOREAU, C. et al. DNA replication stress response involving PLK1, CDC6, POLQ, RAD51 and CLASPIN upregulation prognoses the outcome of early/mid-stage non-small cell lung cancer patients. *Oncogenesis*, v. 1, n. e30, p. 1–10, 2012.
- AMIN, MAHUL B. et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 67, n. 2, p. 93–99, 2017.
- AMORIM, THIAGO RODRIGUES; MERCHÁN-HAMANN, EDGAR. Mortalidade por neoplasia maligna do fígado e vias biliares intra-hepáticas no Brasil, 1980-2010. *Cadernos De Saude Publica*, v. 29, n. 7, p. 1427–1436, 2013.
- ANDEREGGEN, ELISABETH et al. Outcome of surgery for rectal cancer in octogenarians. *Swiss Medical Weekly*, v. 136, n. 11–12, p. 185–188, 2006.
- ANDERS, MARCO et al. Evidence for hSNM1B/Apollo functioning in the HSP70 mediated DNA damage response. *Cell Cycle*, v. 8, n. 11, p. 1725–1732, 2009.
- ANDRÉ, THIERRY et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 350, n. 23, p. 2343–2351, 2004.
- ANDRÉ, THIERRY 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. 3109–3116, 2009.
- ANDREYEV, H. J. N. et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *British Journal of Cancer*, v. 85, n. May, p. 692–696, 2001.

- APEL, KLAUS; HIRT, HERIBERT. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- APRILE G, MACERELLI M, DE MAGLIO G, PIZZOLITTO S, FASOLA G. The relevance of BRAF and extended RAS mutational analyses for metastatic colorectal cancer patients. *OA Molecular Oncology*, v. 1, p. 1–7, 2013.
- ARNOLD, MELINA et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*, v. 66, n. 4, p. 683–691, 2017.
- ARVELO, FRANCISCO; SOJO, FELIPE; COTTE, CARLOS. Biology of colorectal cancer. *Cancer Journal*, v. 9, n. 9, p. 520, 2015.
- AZAMBUJA, DANIEL B. et al. Prognostic impact of changes in base excision repair machinery in sporadic colorectal cancer. *Pathology Research and Practice*, n. November, 2017.
- BALTHAZAR EJ, MEGIBOW AJ, HUINICK D, NAIDION DP. Carcinoma of the colon :Detection oand preoperative staging by CT. *AJT Am J Roentgenology*, v. 150, p. 301–306, 1998.
- BARDHAN, KANKANA; LIU, KEBIN. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers*, v. 5, n. 2, p. 676–713, 2013.
- BARROS, MARIANA CASTRO et al. Evolução Da Mortalidade Por Câncer De Fígado E Colorretal Segundo Sexo E Regiões Do Brasil De 1990 a 2014. *Revista Ceuma Perspectivas*, v. 29, n. 1, p. 88, 2017.
- BASTIDE, NADIA M.; PIERRE, FABRICE H. F.; CORPET, DENIS E. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: A meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prevention Research*, v. 4, n. 2, p. 177–184, 2011.
- BATTERSBY, NICHOLAS J. et al. Prospective validation of a low rectal cancer magnetic resonance imaging staging system and development of a local recurrence risk stratification model: The mercury II study. *Annals of Surgery*, v. 263, n. 4, p. 751–760, 2016.
- BAVOUX, CLARISSE et al. Up-regulation of the error-prone DNA polymerase κ promotes pleiotropic genetic alterations and tumorigenesis. *Cancer Research*, v. 65, n. 1, p. 325–330, 2005.
- BENATTI, P. Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. *Clinical Cancer Research*, v. 11, n. 23, p. 8332–8340, 2005.
- BENSON, AL et al. Localized Colon Cancer , Version 3 . 2013 Featured Updates to the NCCN Guidelines. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v. 11, n. 5, p. 519–528, 2013.
- BENSON, AL B. et al. Recommended Guidelines for the Treatment of Cancer Treatment-Induced Diarrhea. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 14, p. 2918–2926, 2004. a.
- BENSON, AL B. et al. American Society of Clinical Oncology Recommendations on Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 16, p. 3408–3419, 2004. b.
- BENSON, AL B.; HAMILTON, STANLEY R. Path Toward Prognostication and Prediction: An Evolving Matrix. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 35, p. 4599–

4601, 2011.

BERGOGLIO, V. et al. Localisation of human DNA polymerase kappa to replication foci. *Journal of Cell Science*, v. 115, n. 23, p. 4413–4418, 2002.

BERTELSEN, C. A. et al. Short-term outcomes after complete mesocolic excision compared with “conventional” colonic cancer surgery. *British Journal of Surgery*, v. 103, n. 5, p. 581–589, 2016.

BESSHO, T.; MU, D.; SANCAR, A. Initiation of DNA interstrand cross-link repair in humans: the nucleotide excision repair system makes dual incisions 5' to the cross-linked base and removes a 22- to 28-nucleotide-long damage-free strand. *Molecular and Cellular Biology*, v. 17, n. 12, p. 6822–6830, 1997.

BÉTOUS, REMY et al. Role of TLS DNA polymerases eta and kappa in processing naturally occurring structured DNA in human cells. *Mol Carcinog*, v. 48, n. 4, p. 369–378, 2009.

BÉTOUS, RÉMY et al. DNA polymerase κ -dependent DNA synthesis at stalled replication forks is important for CHK1 activation. *EMBO Journal*, v. 32, n. 15, p. 2172–2185, 2013.

BIAGI, JAMES J. et al. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer a systematic review and meta-analysis. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 305, n. 22, p. 2335–2342, 2011.

BIARD, D. S. F. et al. Development of New EBV-Based Vectors for Stable Expression of Small Interfering RNA to Mimick Human Syndromes: Application to NER Gene Silencing. *Molecular Cancer Research*, v. 3, n. 9, p. 519–529, 2005.

BINABAJ, MARYAM MORADI et al. The prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma: A meta-analysis of clinical trials. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 1, p. 378–386, 2018.

BIRBECK, KEVIN F. et al. Rates of circumferential resection margin involvement vary between surgeons and predict outcomes in rectal cancer surgery. *Annals of Surgery*, v. 235, n. 4, p. 449–457, 2002.

BLACK, SAMUEL J. et al. DNA polymerase θ : A unique multifunctional end-joining machine. *Genes*, v. 7, n. 9, 2016.

BLANCO-CALVO, MOISÉS et al. Colorectal cancer classification and cell heterogeneity: A systems oncology approach. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 6, p. 13610–13632, 2015.

BOHGAKI, TOSHIYUKI; BOHGAKI, MIYUKI; HAKEM, RAZQALLAH. DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome Integrity*, v. 1, n. 1, p. 15, 2010.

BOLAND, C. RICHARD; GOEL, AJAY. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, v. 138, n. 6, p. 2073–2087.e3, 2010.

BOLAND, PATRICK M.; FAKIH, MARWAN. The emerging role of neoadjuvant chemotherapy for rectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, v. 5, n. 5, p. 362–373, 2014.

BOSTIAN, APRIL et al. Kynurenine signaling increases DNA polymerase kappa expression and promotes genomic instability in glioblastoma cells. *Chemical Research in Toxicology*, v. 29, n. 1, p. 101–108, 2016.

- BOTTERI, EDOARDO et al. Smoking and Colorectal Cancer. *Jama*, v. 300, n. 23, p. 2765, 2008.
- BRANDES, JOHANN C. et al. CHFR promoter hypermethylation in colon cancer correlates with the microsatellite instability phenotype. *Carcinogenesis*, v. 26, n. 6, p. 1152–1156, 2005.
- BRAY, FREDDIE et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BUDINSKA, EVA et al. Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *Journal of Pathology*, v. 231, n. 1, p. 63–76, 2013.
- BUERKLE, ALEXANDER. ChemInform Abstract: PARP-1: A Regulator of Genomic Stability Linked with Mammalian Longevity. *ChemInform*, v. 32, n. 49, p. no-no, 2010.
- BUZON, BEVERLEE et al. Structure-specific endonuclease activity of SNM1A enables processing of a DNA interstrand crosslink. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. 17, p. 9057–9066, 2018.
- CALDECOTT, KEITH W. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*, v. 2, n. 9, p. 955–969, 2003.
- CALDECOTT, KEITH W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, v. 9, n. 6, p. 619–631, 2008.
- CANAVAN, C.; ABRAMS, K. R.; MAYBERRY, J. Meta-analysis: Colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 23, n. 8, p. 1097–1104, 2006.
- 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*, v. 22, n. 12, p. 2604–2609, 2011.
- CEPPI, PAOLO et al. Polymerase η mRNA expression predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 3, p. 1039–1045, 2009.
- CHANG, GEORGE J. 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. 433–441, 2007.
- CHAPUIS, P. H. et al. Adverse histopathological findings as a guide to patient management after curative resection of node-positive colonic cancer. *British Journal of Surgery*, v. 91, n. 3, p. 349–354, 2004.
- CHAPUIS, PIERRE H.; CHAN, CHARLES; DENT, OWEN F. Clinicopathological staging of colorectal cancer: Evolution and consensus-an Australian perspective. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, v. 26, n. SUPPL. 1, p. 58–64, 2011.
- CHRISTMANN, MARKUS et al. Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology*, v. 193, n. 1–2, p. 3–34, 2003.
- CHU, QUYEN D. et al. Positive surgical margins contribute to the survival paradox between patients with stage IIB/C (T4N0) and stage IIIA (T1-2N1, T1N2a) colon cancer. *Surgery (United States)*, v. 160, n. 5, p. 1333–1343, 2016. a.

CHU, QUYEN D. et al. Poor survival in stage IIB/C (T4N0) compared to stage IIIA (T1-2 N1, T1N2a) colon cancer persists even after adjusting for adequate lymph nodes retrieved and receipt of adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.

CHUA, W. et al. Neutrophil/lymphocyte ratio predicts chemotherapy outcomes in patients with advanced colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, v. 104, n. 8, p. 1288–1295, 2011.

CHUN, ABEL CHIU SHUN; KOK, KIN HANG; JIN, DONG YAN. REV7 is required for anaphase-promoting complex-dependent ubiquitination and degradation of translesion DNA polymerase REV1. *Cell Cycle*, v. 12, n. 2, p. 365–378, 2013.

CLANCY, C. et al. BRAF mutation is associated with distinct clinicopathological characteristics in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Colorectal Disease*, v. 15, n. 12, p. 711–718, 2013.

CLEAVER, J. E.; REVET, I. Clinical implications of the basic defects in Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum and the DNA lesions responsible for cancer, neurodegeneration and aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 129, n. 7–8, p. 492–497, 2008.

CLEAVER, JAMES E.; LAM, ERNEST T.; REVET, INGRID. Disorders of nucleotide excision repair: The genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 11, p. 756–768, 2009.

COIMBRA, JOSÉ FELIPE FERNÁNDEZ et al. Avanços no tratamento cirúrgico das metástases hepáticas colorretais. *Rev Assoc Med Bras*, v. 57, n. 2, p. 220–227, 2011.

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

COMPTON, C. C.; GREENE, F. L. The Staging of Colorectal Cancer: 2004 and Beyond. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 54, n. 6, p. 295–308, 2004.

COMPTON, CAROLYN C. Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic, and molecular features. *Modern Pathology*, v. 16, n. 4, p. 376–388, 2003.

CROSS, AMANDA J. et al. Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*, v. 35, n. 7, p. 1516–1522, 2014.

CUNNINGHAM, DAVID et al. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 351, n. 4, p. 337–345, 2004.

CURTIN, NICOLA J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 12, p. 801–817, 2012.

D'AMOURS, DAMIEN; JACKSON, STEPHEN P. The Mre11 complex: At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 3, n. 5, p. 317–327, 2002.

DA SILVA, FELIPE CARNEIRO et al. Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: Analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. *Familial Cancer*, v. 9, n. 4, p. 563–570, 2010.

DASARI, SHALOAM; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, v. 740, n. 1, p. 364–378,

2014.

DAVIES, HELEN et al. 6-Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, v. 417, n. 6892, p. 949–54, 2002.

DE AZAMBUJA, E. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *British Journal of Cancer*, v. 96, n. 10, p. 1504–1513, 2007.

DE GRAMONT, A. et al. Oxaliplatin with high-dose leucovorin and 5-fluorouracil 48-hour continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer Part A*, v. 33, n. 2, p. 214–219, 1997.

DE GRAMONT, A. et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.*, v. 18, n. 16, p. 2938–47, 2000.

DE JAGER, MARTIJN et al. Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Molecular Cell*, v. 8, n. 5, p. 1129–1135, 2001.

DE LA CHAPELLE, ALBERT; PALOMAKI, GLENN; HAMPEL, HEATHER. Identifying Lynch Syndrome Albert. *Int J Cancer*, v. 125, n. 6, p. 1492–1493, 2009.

DE LAAT, W. L. et al. DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair. *Genes & Development*, v. 12, n. 16, p. 2598–2609, 2008.

DE ROOCK, WENDY 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, 2010.

DE SILVA, I. U. et al. Defining the Roles of Nucleotide Excision Repair and Recombination in the Repair of DNA Interstrand Cross-Links in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, n. 21, p. 7980–7990, 2000.

DE SOUSA E MELO, FELIPE et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nature Medicine*, v. 19, n. 5, p. 614–618, 2013.

DEMUTH, ILJA; DIGWEED, MARTIN; CONCANNON, PATRICK. Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation. *Oncogene*, v. 23, n. 53, p. 8611–8618, 2004.

DERWINGER, KRISTOFFER; GUSTAVSSON, BENGT. A study of lymph node ratio in stage IV colorectal cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, v. 6, p. 1–6, 2008.

DIANOV, GRIGORY L.; HÜBSCHER, ULRICH. Mammalian base excision repair: The forgotten archangel. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 6, p. 3483–3490, 2013.

DIENSTMANN, RODRIGO et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2017.

DIETEL, M. et al. A 2015 update on predictive molecular pathology and its role in targeted cancer therapy: a review focussing on clinical relevance. *Cancer Gene Therapy*, v. 22, n. 9, p. 417–430, 2015.

DIETVORST, MARIA H. P.; ESKENS, FERRY A. L. M. Current and Novel Treatment Options for Metastatic Colorectal Cancer: Emphasis on Aflibercept. *Biologics in*

therapy, v. 3, n. 1, p. 25–33, 2013.

DIFILIPPANTONIO, MICHAEL J. et al. Evidence for Replicative Repair of DNA Double-Strand Breaks Leading to Oncogenic Translocation and Gene Amplification. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 196, n. 4, p. 469–480, 2002.

DOLES, J. et al. Suppression of Rev3, the catalytic subunit of Pol δ , sensitizes drug-resistant lung tumors to chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 48, p. 20786–20791, 2010.

DONIGAN, KATHERINE A. et al. Human POLB gene is mutated in high percentage of colorectal tumors. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 28, p. 23830–23839, 2012.

DOTAN, EFRAT et al. A phase II study of capecitabine, oxaliplatin, and cetuximab with or without bevacizumab as frontline therapy for metastatic colorectal cancer. A fox chase extramural research study. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, v. 43, n. 4, p. 562–569, 2012.

DOTAN, EFRAT; COHEN, STEVEN J. Challenges in the management of stage II colon cancer Efrat. *Semin Oncol*, v. 38, n. 4, p. 511–520, 2011.

DOUILLARD, J. Y. et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone. as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*, v. 355, n. 9209, p. 1041–1047, 2000.

DOUILLARD, JEAN-YVES et al. Panitumumab–FOLFOX4 Treatment and *RAS* Mutations in Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 369, n. 11, p. 1023–1034, 2013.

DRONKERT, M. L. G. et al. Disruption of Mouse SNM1 Causes Increased Sensitivity to the DNA Interstrand Cross-Linking Agent Mitomycin C. *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, n. 13, p. 4553–4561, 2002.

DUNNE, PHILIP D. et al. Challenging the cancer molecular stratification dogma: Intratumoral heterogeneity undermines consensus molecular subtypes and potential diagnostic value in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 22, n. 16, p. 4095–4104, 2016.

DUNNE, PHILIP D. et al. Cancer-cell intrinsic gene expression signatures overcome intratumoural heterogeneity bias in colorectal cancer patient classification. *Nature Communications*, v. 8, n. 15657, p. 1–12, 2017.

DYNAN, WILLIAM S.; YOO, SUNGHAN. Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, v. 26, n. 7, p. 1551–1559, 1998.

EADEN, J. A.; ABRAMS, K. R.; MAYBERRY, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis : a. p. 526–535, 2001.

EIDE, PETER W. et al. CMScaller: An R package for consensus molecular subtyping of colorectal cancer pre-clinical models. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

ELHADI, AHMED et al. Effect of social deprivation on the stage and mode of presentation of colorectal cancer. *Annals of Coloproctology*, v. 32, n. 4, p. 128–132, 2016.

ERLICHMAN, C. et al. A randomized trial of fluorouracil and folinic acid in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the*

- American Society of Clinical Oncology, v. 6, n. 3, p. 469–475, 1988.
- FAIVRE, SANDRINE et al. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 66, n. 2, p. 225–237, 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*, v. 13, n. 12, p. 1377–1383, 2011.
- FARHOUD, SAMER et al. Variáveis clínicas e macroscópicas que influenciam o prognóstico do carcinoma colorretal. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 39, n. 3, p. 163–172, 2002.
- FEARON, ERIC FT; VOGELSTEIN, BERT. A Genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, v. 61, n. 1, p. 759–767, 1990.
- FEARON, ERIC R. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 6, n. 1, p. 479–507, 2011.
- FIDLER, MIRANDA M.; SOERJOMATARAM, ISABELLE; BRAY, FREDDIE. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. *International Journal of Cancer*, v. 139, n. 11, p. 2436–2446, 2016.
- FIGUEREDO, A.; MUKHERJEE, SD; ZBUK, K. Adjuvant Therapy for completely resected stage II Colon Cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 4, 2008.
- FOLPRECHT, GUNNAR et al. Irinotecan/fluorouracil combination in first-line therapy of older and younger patients with metastatic colorectal cancer: combined analysis of 2,691 patients in randomized controlled trials. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 26, n. 9, p. 1443–51, 2008.
- FRANKO, JAN et al. Treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis with systemic chemotherapy: A pooled analysis of North Central Cancer Treatment Group phase III trials N9741 and N9841. *Journal of Clinical Oncology*, v. 30, n. 3, p. 263–267, 2012.
- FRANSÉN, KARIN et al. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, v. 25, n. 4, p. 527–533, 2004.
- FRATTINI, M. et al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, v. 97, n. 8, p. 1139–1145, 2007.
- FREIBAUM, BRIAN D.; COUNTER, CHRISTOPHER M. hSnm1B is a novel telomere-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 22, p. 15033–15036, 2006.
- FRIDMAN, WOLF HERMAN et al. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 4, p. 298–306, 2012.
- FRIEDBERG, ERROL C. DNA damage and Repair. *Nature*, v. 421, n. January, p. 436–440, 2003.
- FRIEDBERG, ERROL C. et al. DNA repair: From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair*, v. 5, n. 8, p. 986–996, 2006.
- FU, DRAGONY; CALVO, JENNIFER A.; SAMSON, LEONA D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer*, v. 12, n. 2, p. 104–120, 2012.
- FUJITA, SHIN et al. Prospective Evaluation of Prognostic Factors in Patients With

Colorectal Cancer Undergoing Curative Resection. *Journal of Surgical Oncology*, v. 84, n. 3, p. 127–131, 2003.

FUKUI, KENJI. DNA Mismatch Repair in Eukaryotes and Bacteria. *Journal of Nucleic Acids*, v. 2010, n. c, p. 1–16, 2010.

GALON, JÉRÔME et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, v. 313, n. 5795, p. 1960–1964, 2006.

GALON, JÉRÔME et al. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer / J. Galon [et al.]. // *J. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 10, № 1. – P. 1-4. p. 2–5, 2012.

GERMANO, GIOVANNI et al. Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature*, v. 552, n. 7683, p. 116–120, 2017.

GERMANO, GIOVANNI et al. The clinical impact of the genomic landscape of mismatch repair-deficient cancers. *Cancer Discovery*, v. 8, n. 12, p. 1518–1528, 2018.

GILL, SHARLENE 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*, v. 22, n. 10, p. 1797–1806, 2004.

GLIMELIUS, BENGT. Optimal Time Intervals between Pre-Operative Radiotherapy or Chemoradiotherapy and Surgery in Rectal Cancer? *Frontiers in Oncology*, v. 4, n. April, p. 1–11, 2014.

GOLD, P.; FREEDMAN, S. O. Demonstration of Tumor-Specific Antigens in Human Colonic Carcinomata By Immunological Tolerance and Absorption Techniques. *The Journal of experimental medicine*, v. 121, p. 439–62, 1965.

GONZALEZ-PONS, MARIA; CRUZ-CORREA, MARCIA. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.

GRADY, WILLIAMM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 23, n. 1–2, p. 11–27, 2004.

GREGG, SIOBHÁN; ROBINSON, ANDRIA RASILE; NIEDERNHOFER, LAURA. Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease. *DNA Repair*, v. 10, n. 7, p. 781–791, 2011.

GRILLARI, JOHANNES; KATINGER, HERMANN; VOGLAUER, REGINA. Contributions of DNA interstrand cross-links to aging of cells and organisms. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. 22, p. 7566–7576, 2007.

GROTNEY, AXEL et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, v. 381, n. 9863, p. 303–312, 2013.

GUINNEY, JUSTIN et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, v. 21, n. 11, p. 1350–1356, 2015.

GUNDERSON, LEONARD L. et al. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 2, p. 264–271, 2010.

GUSTAVSSON, BENGT et al. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, v. 14, n. 1, p. 1–10,

2015.

GUTTMACHER, ALAN E. et al. Hereditary Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 10, p. 919–932, 2003.

HABER, JAMES. Partners and pathways repairing a double-strand break. *TIG*, v. 16, n. 6, p. 259–264, 2000.

HALAZONETIS, THANOS D.; GORGOULIS, VASSILIS G.; BARTEK, JIRI. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development Thanos D. Halazonetis, . *Science*, v. 319, p. 1352–1355, 2008.

HALF, ELIZABETH E.; BRESALIER, ROBERT S. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 20, p. 32–42, 2004.

HALLER, DANIEL G. et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 11, p. 1465–1471, 2011.

HALVARSSON, BRITTA et al. Clinicopathologic Factors Identify Sporadic Mismatch Repair–Defective Colon Cancers. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 129, n. 2, p. 238–244, 2008.

HALVORSEN, T. B.; SEIM, E. Degree of differentiation in colorectal adenocarcinomas: a multivariate analysis of the influence on survival. *Journal of Clinical Pathology*, v. 41, n. 5, p. 532–537, 1988.

HAMPEL, HEATHER et al. Screening for the Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) Heather. *New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 18, p. 1851–1860, 2005.

HAMPEL, HEATHER et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 26, n. 35, p. 5783–5788, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, DOUGLAS; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANAWALT, PHILIP C.; SPIVAK, GRACIELA. Transcription-coupled DNA repair: Two decades of progress and surprises. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, n. 12, p. 958–970, 2008.

HARI, DANIELLE M. et al. AJCC cancer staging manual 7th edition criteria for colon cancer: Do the complex modifications improve prognostic assessment? *Journal of the American College of Surgeons*, v. 217, n. 2, p. 181–190, 2013.

HE, XIAOHONG et al. REV1 Genetic Variants Associated with the Risk of Cervical Carcinoma. v. 23, n. 6, p. 403–409, 2008.

HEALD, R. J.; RYALL, R. D. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet*, v. 1, n. 8496, p. 1479–1482, 1986.

HEGI, MONIKA E. et al. MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, v. 352, p. 997–1003, 2005.

HELLEDAY, THOMAS et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 8, n. 3, p. 193–204, 2008.

HELLEDAY, THOMAS; ESHTAD, SAEED; NIK-ZAINAL, SERENA. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers Europe PMC Funders Group. *Nat Rev Genet*, v. 15, n. 9, p. 585–598, 2014.

HENKLER, FRANK; STOLPMANN, KRISTIN; LUCH, ANDREAS. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology Health Public Access*, v. 101, n. August, p. 133–164, 2012.

HEYER, WOLF-DIETRICH; EHMSSEN, KIRK; LIU, JIE. Regulation of homologous recombination in eukaryotes Wolf-Dietrich. *Annu Rev Genet*, v. 44, p. 113–139, 2010.

HIGGINS, GEOFF S. et al. Overexpression of POLQ Confers a Poor Prognosis in Early Breast Cancer Patients. *Oncotarget*, v. 1, n. 3, p. 175–184, 2010.

HILBERS, FLORENTINE S. et al. Functional Analysis of Missense Variants in the Putative Breast Cancer Susceptibility Gene XRCC2. *Human Mutation*, v. 37, n. 9, p. 914–925, 2016.

HITOMI, KENICHI; IWAI, SHIGENORI; TAINER, JOHN A. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: Implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *DNA Repair*, v. 6, n. 4, p. 410–428, 2007.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, v. 411, n. 6835, p. 366–74, 2001.

HOEIJMAKERS, JAN H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 361, n. 15, p. 1475–1485, 2009.

HOFF, PAULO M. et al. Comparison of Oral Capecitabine Versus Intravenous Fluorouracil Plus Leucovorin as First-Line Treatment in 605 Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results of a Randomized Phase III Study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 19, n. 8, p. 2282–2292, 2001.

HOFF, PAULO MARCELO GEHM. EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO CLÍNICO DO Evolução do Tratamento Clínico. 2016. ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA, 2016.

HOFFMANN, JEAN SEBASTIEN; CAZAUX, CHRISTOPHE. Aberrant expression of alternative DNA polymerases: A source of mutator phenotype as well as replicative stress in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, v. 20, n. 5, p. 312–319, 2010.

HOHENBERGER, WERNER et al. Standardized surgery for colonic cancer: Complete mesocolic excision and central ligation - Technical notes and outcome. *Colorectal Disease*, v. 11, n. 4, p. 354–364, 2009.

HOMMA, MIWAKO KATO; HOMMA, YOSHIMI. Regulatory role of CK2 during the progression of cell cycle. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 274, n. 1–2, p. 47–52, 2005.

HOSKINS, PAUL J.; GOTLIEB, WALTER H. Missed therapeutic and prevention opportunities in women with BRCA-mutated epithelial ovarian cancer and their families due to low referral rates for genetic counseling and BRCA testing: A review of the literature. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 67, n. 6, p. 493–506, 2017.

HSIEH, PEGGY; YAMANE, KAZUHIKO. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 129, n. 7–8, p. 391–407, 2008.

HUANG, ZHAOHUI et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, v. 127, n. 1, p. 118–

126, 2010.

HUNDT, S.; HAUG, U.; BRENNER, H. Blood Markers for Early Detection of Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 16, n. 10, p. 1935–1953, 2007.

HURWITZ, HERBERT et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluoracil, and leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *The New England journal of medicine*, v. 350, n. 23, p. 2335–2342, 2004.

IACOPETTA, BARRY; GRIEU, FABIENNE; AMANUEL, BENHUR. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, v. 6, n. 4, p. 260–269, 2010.

IKENOUE, TSUNEO et al. Functional Analysis of Mutations within the Kinase Activation Segment of B-Raf in Human Colorectal Tumors. *Cancer Research*, v. 63, n. 23, p. 8132–8137, 2003.

INAMURA, KENTARO. *Colorectal Cancers : An Update on Their*. 2018.

INCA. Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil. [s.l: s.n.].

INCA. Instituto Nacional do Cancer - Estimativa 2018. Ministério Da Saúde, 2018.

IRAHARA, N. et al. NRAS mutations are rare in colorectal cancer. *Diagnostic Molecular Pathology*, v. 19, n. 3, p. 157–163, 2010.

IRIGARAY, PHILIPPE; BELPOMME, DOMINIQUE. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 2, p. 135–148, 2010.

ISELLA, CLAUDIO et al. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nature Genetics*, v. 47, n. 4, p. 312–319, 2015.

IYAMA, TERUAKI; WILSON, DAVID M. DNA Repair Mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, v. 12, n. 8, p. 620–636, 2013.

JACKSON, DOBA et al. Analysis of the human replication protein A:Rad52 complex: Evidence for crosstalk between RPA32, RPA70, Rad52 and DNA. *Journal of Molecular Biology*, v. 321, n. 1, p. 133–148, 2002.

JACKSON, STEPHEN P.; BARTEK, JIRI. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 2009.

JACOBS, ANGELIKA L.; SCHÄR, PRIMO. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond. *Chromosoma*, v. 121, n. 1, p. 1–20, 2012.

JAFARABADI, MOHAMAD ASGHARI 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.

JASS, J. R. et al. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *European Journal of Cancer*, v. 38, n. 7, p. 858–866, 2002.

JASS, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, v. 50, n. 1, p. 113–130, 2007.

JIRICNY, JOSEF. Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 5, n. 4, p. 1–23, 2013.

- JOHNS, LOUISE E.; HOULSTON, RICHARD S. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 96, n. 10, p. 2992–3003, 2001.
- JONES, REBECCA M.; PETERMANN, EVA. Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochemical Journal*, v. 443, n. 1, p. 13–26, 2012.
- JONES, ROBIN L. et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 116, p. 53–68, 2008.
- JOVER, RODRIGO et al. Defective Mismatch-Repair Colorectal Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 122, n. 3, p. 389–394, 2004.
- KACHLIK, DAVID; BACA, VACLAV; STINGL, JOSEF. The spatial arrangement of the human large intestinal wall blood circulation. *Journal of Anatomy*, v. 216, n. 3, p. 335–343, 2010.
- KAMEL, HALA FAWZY MOHAMED; AL-AMODI, HIBA SAEED A. BAGADE. Exploitation of Gene Expression and Cancer Biomarkers in Paving the Path to Era of Personalized Medicine. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, v. 15, n. 4, p. 220–235, 2017.
- KAWAMURA, KIYOKO et al. DNA polymerase is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. *International Journal of Cancer*, v. 109, n. 1, p. 9–16, 2004.
- KEMENY, NANCY E. et al. KRAS Mutation Influences Recurrence Patterns in Patients Undergoing Hepatic Resection of Colorectal Metastase. *Cancer*, v. 120, n. 24, p. 3965–3971, 2014.
- KIM, MIN JUNG et al. Survival Paradox Between Stage IIB/C (T4N0) and Stage IIIA (T1-2N1) Colon Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, v. 22, n. 2, p. 505–512, 2014.
- KIM, MIN JUNG et al. Survival Paradox Between Stage IIB/C (T4N0) and Stage IIIA (T1-2N1) Colon Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, v. 22, n. 2, p. 505–512, 2015.
- KLOOR, MATTHIAS. Lymphocyte infiltration and prognosis in colorectal cancer. *The Lancet Oncology*, v. 10, n. 9, p. 840–841, 2009.
- KOBAYASHI, TAISUKE et al. Successful radiotherapy in a patient with primary rectal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma without the API2-MALT1 fusion gene: A case report and review of the literature. *Leukemia Research*, v. 32, n. 1, p. 173–175, 2008.
- KOHNO, TAKASHI et al. Association of polymorphisms in the MTH1 gene with small cell lung carcinoma risk. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 12, p. 2448–2454, 2006.
- KOMURO, YASUHIRO et al. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer*, v. 95, n. 6, p. 1199–1205, 2002.
- KREJCI, LUMIR et al. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. 13, p. 5795–5818, 2012.
- KUEBLER, J. PHILIP et al. Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: Results from NSABP C-07. *Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 16, p. 2198–2204, 2007.

KUMAR, SANDEEP et al. Combination of microsatellite instability and lymphocytic infiltrate as a prognostic indicator for adjuvant therapy in colon cancer. *Archives of Surgery*, v. 144, n. 9, p. 835–839, 2009.

KURUMIZAKA, HITOSHI et al. Homologous Pairing and Ring and Filament Structure Formation Activities of the Human Xrcc2·Rad51D Complex. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 16, p. 14315–14320, 2002.

LANGE, SABINE S.; TAKATA, KEI-ICHI; WOOD, RICHARD D. DNA polymerases and cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 11, n. 2, p. 96–110, 2011.

LAO, VICTORIA VALINLUCK; GRADY, WILLIAM M. Epigenetics and colorectal cancer. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 8, n. 12, p. 686–700, 2011.

LAPORTE, GUSTAVO A. et al. Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 126, p. 168–185, 2018.

LE, DUNG et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*, v. 357, n. 6349, p. 409–413, 2017. a.

LE, DUNG T. et al. Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*, v. 357, n. 6349, p. 409–413, 2017. b.

LE PAGE, FLORENCE 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 β . *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 20, p. 18471–18477, 2003.

LE VOYER, T. E. 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*, v. 21, n. 15, p. 2912–2919, 2003.

LEE, CHEE KHOON et al. Phase 1 trial of olaparib and oral cyclophosphamide in BRCA breast cancer, recurrent BRCA ovarian cancer, non-BRCA triple-negative breast cancer, and non-BRCA ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, v. 120, n. 3, p. 279–285, 2019.

LEE, CHIA CHIA et al. The excision of 3' penultimate errors by DNA polymerase I and its role in endonuclease V-mediated DNA repair. *DNA Repair*, v. 12, n. 11, p. 899–911, 2013.

LEE, CHIA CHIA et al. Deoxyinosine repair in nuclear extracts of human cells. *Cell and Bioscience*, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015.

LEE, SUN IL; PARK, YOON AH; SOHN, SEUNG KOOK. A survey on the impact of operation volume on rectal cancer management. *Journal of Korean Medical Science*, v. 22, n. SUPPL., p. 86–90, 2007.

LEGOLVAN, MARK P.; RESNICK, MURRAY. Pathobiology of colorectal cancer hepatic metastases with an emphasis on prognostic factors. *Journal of Surgical Oncology*, v. 102, n. 8, p. 898–908, 2010.

LEGUIAMO, NATALIA M. et al. Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy. *Oncotarget*, v. 8, n. 33, p. 54199–54214, 2017.

LEMEE, F. et al. DNA polymerase up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication, and promotes genetic instability. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences, v. 107, n. 30, p. 13390–13395, 2010.
- LEMÉE, F. et al. Characterization of promoter regulatory elements involved in downexpression of the DNA polymerase κ in colorectal cancer. *Oncogene*, v. 26, n. 23, p. 3387–3394, 2007.
- LENAIN, CHRISTELLE et al. The Apollo 5' Exonuclease Functions Together with TRF2 to Protect Telomeres from DNA Repair. *Current Biology*, v. 16, n. 13, p. 1303–1310, 2006.
- LÉVI, FRANCIS et al. A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump. High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer. *Cancer*, v. 69, n. 4, p. 893–900, 1992.
- LEVIN, THEODORE R.; CORLEY, DOUGLAS A. High-Value Health Care — A Sustainable Proposition. *New England Journal of Medicine*, v. 369, n. 12, p. 1163–1164, 2013.
- LI, GUO-MIN. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, v. 18, n. 1, p. 85–98, 2008.
- LI, HONG TAO et al. KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in human colorectal cancer: Relationship with metastatic colorectal cancer. *Oncology Reports*, v. 25, n. 6, p. 1691–1697, 2011.
- LI, MU-XING et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, v. 134, n. 10, p. 2403–2413, 2014.
- LI, PAN et al. Systematic immunohistochemical screening for mismatch repair and ERCC1 gene expression from colorectal cancers in China: Clinicopathological characteristics and effects on survival. *Plos One*, v. 12, n. 8, p. e0181615, 2017.
- LIANG, PETER S.; CHEN, TING-YI; GIOVANNUCCI, EDWARD. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, v. 124, n. 10, p. 2406–2415, 2009.
- LIEBER, MICHAEL R. et al. The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair*, v. 3, n. 8–9, p. 817–826, 2004.
- LIEBIG, CATHERINE et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 27, n. 31, p. 5131–5137, 2009.
- LIMBO, OLIVER et al. Ctp1 is a Cell Cycle-Regulated Protein that Functions with Mre11 Complex to Control Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination. *Mol Cell*, v. 28, n. 1, p. 134–146, 2007.
- LIN, X. et al. Human REV1 Modulates the Cytotoxicity and Mutagenicity of Cisplatin in Human Ovarian Carcinoma Cells. *Molecular Pharmacology*, v. 69, n. 5, p. 1748–1754, 2006.
- LINNEKAMP, JANNEKE F. et al. Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models. *Cell Death and Differentiation*, v. 25, n. 3, p. 616–633, 2018.
- LIPKIN, STEVEN M. et al. 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. 389–396, 2001.

- LITTON, JENNIFER K. et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation . *New England Journal of Medicine*, v. 379, n. 8, p. 753–763, 2018.
- LIU, HUANTING et al. Europe PMC Funders Group Structure of the DNA repair helicase XPD. *Cell*, v. 133, n. 5, p. 801–812, 2008.
- LIU, XIAOMEI et al. Preoperative serum TMAO level is a new prognostic marker for colorectal cancer. *Biomarkers in Medicine*, v. 11, n. 5, p. 443–447, 2017.
- LLOSA, NICOLAS J. et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discovery*, v. 5, n. 1, p. 43–51, 2015.
- LO, DOROTHY S. et al. Prognostic significance of mesenteric tumor nodules in patients with stage III colorectal cancer. *Cancer*, v. 112, n. 1, p. 50–54, 2008.
- LOCKER, GERSHON Y. et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 24, n. 33, p. 5313–5327, 2006.
- LONGATTO-FILHO, ADHEMAR 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, 2007.
- LORD, CHRISTOPHER J.; ASHWORTH, ALAN. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, v. 481, n. 7381, p. 287–294, 2012.
- LOUGHREY, MAURICE B.; SHEPHERD, NEIL A. Problematic Colorectal Polyps: Is It Cancer and What Do I Need to Do About It? *Surgical Pathology Clinics*, v. 10, n. 4, p. 947–960, 2017.
- LOUVET, C. et al. Phase II Study of Oxaliplatin, Fluorouracil, and Folinic Acid in Locally Advanced or Metastatic Gastric Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*, v. 20, n. 23, p. 4543–4548, 2002.
- LU, YUANFANG; GAO, JINGYAN; LU, YUANMING. Downregulated ku70 and ATM associated to poor prognosis in colorectal cancer among Chinese patients. *OncoTargets and Therapy*, v. 7, p. 1955–1961, 2014.
- LU, YUANFANG; GAO, JINGYAN; LU, YUANMING. Down-expression pattern of Ku70 and p53 coexisted in colorectal cancer. *Medical Oncology*, v. 32, n. 4, p. 98, 2015.
- LUKSKA, MARTA et al. A neoantigen fitness model predicts tumor response to checkpoint blockade immunotherapy. *Nature*, v. 551, n. 7681, p. 517–520, 2017.
- LUPARI, ELIANA et al. Pol kappa partially rescues MMR-dependent cytotoxicity of O 6-methylguanine. *DNA Repair*, v. 11, n. 6, p. 579–586, 2012.
- LYNCH, HENRY T. HT; CHAPELLE, A. DE LA; DE LA CHAPELLE, ALBERT. Hereditary colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, v. 348, n. 10, p. 919–32, 2003.
- MAGUIRE, AOIFE; SHEAHAN, KIERAN. Controversies in the pathological assessment of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 29, p. 9850–9861, 2014.
- MAJEK, ONDREJ et al. Sex Differences in Colorectal Cancer Survival: Population-Based Analysis of 164,996 Colorectal Cancer Patients in Germany. *PLoS ONE*, v. 8,

n. 7, p. 1–7, 2013.

MALAQUIN, NICOLAS et al. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Frontiers in Genetics*, v. 5, n. FEB, p. 1–8, 2015.

MALEKZADEH, REZA et al. Epidemiology and molecular genetics of colorectal cancer in Iran: A review. *Archives of Iranian Medicine*, v. 12, n. 2, p. 161–169, 2009.

MARIATOS, GEORGE et al. Inactivating Mutations Targeting the chfr Mitotic Checkpoint Gene in Human Lung Cancer. *Cancer Research*, v. 63, n. 21, p. 7185–7189, 2003.

MARISA, LAETITIA et al. Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLoS Medicine*, v. 10, n. 5, 2013.

MARKOWITZ, SANFORD D.; BERTAGNOLLI, MONICA M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 361, p. 2449–2460, 2009.

MARKS, K. M. et al. Clinicopathological, genomic and immunological factors in colorectal cancer prognosis. *British Journal of Surgery*, v. 105, n. 2, p. e99–e109, 2018.

MÁRMOL, INÉS et al. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 1, 2017.

MARTEIJN, JURGEN A. et al. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 7, p. 465–481, 2014.

MARTINEZ-USEROS, JAVIER; GARCIA-FONCILLAS, JESUS. Obesity and colorectal cancer: Molecular features of adipose tissue. *Journal of Translational Medicine*, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2016.

MASSON, JEAN YVES et al. Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes and Development*, v. 15, n. 24, p. 3296–3307, 2001.

MASUTANI, C. et al. Xeroderma Pigmentosum Variant: From a Human Genetic Disorder to a Novel DNA Polymerase. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. 65, p. 71–80, 2000.

MASUTANI, CHIKAHIDE et al. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *EMBO Journal*, v. 18, n. 12, p. 3491–3501, 1999.

MATSUDA, TAKAHISA et al. Size does not determine the grade of malignancy of early invasive colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v. 15, n. 22, p. 2708–2713, 2009.

MATUO, RENATA 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, 2010.

MAZUMDER, TARIKUL HUDA et al. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Prognosis using molecular approach. *Central European Journal of Biology*, v. 9, n. 6, p. 593–613, 2014.

MCDONALD, J. W.; PILGRAM, T. K. Nuclear expression of p53, p21 and cyclin D1 is

increased in bronchioloalveolar carcinoma. *Histopathology*, v. 34, n. 5, p. 439–446, 1999.

MCGRANAHAN, NICHOLAS et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*, v. 351, n. 6280, p. 1463–1469, 2016.

MCHUGH, PETER J.; SPANSWICK, VICTORIA J.; HARTLEY, JOHN A. Repair of DNA interstrand crosslinks: Molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncology*, v. 2, n. 8, p. 483–490, 2001.

MEGUID, ROBERT A. et al. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Annals of Surgical Oncology*, v. 15, n. 9, p. 2388–2394, 2008.

MEINDL, ALFONS et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nature Genetics*, v. 42, n. 5, p. 410–414, 2010.

MEIRELLES, NATALIA MOTTA LEGUISAMO. Influência do sistema de reparo do DNA sobre o prognóstico e a resposta à quimioterapia no câncer colorretal. p. 202, 2016.

MELLING, NATHANIEL et al. High Ki67 expression is an independent good prognostic marker in colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*, v. 69, n. 3, p. 209–214, 2016.

MENCK, CARLOS F. M.; MUNFORD, VERIDIANA. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genetics and Molecular Biology*, v. 37, n. 1 SUPPL. 1, p. 220–233, 2014.

MERCURY, STUDY GROUP. Diagnostic accuracy of preoperative magnetic resonance imaging in predicting curative resection of rectal cancer: Prospective observational study. *British Medical Journal*, v. 333, n. 7572, p. 779–782, 2006.

MICHELS, KARIN B. et al. Coffee, tea, and caffeine consumption and incidence of colon and rectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 97, n. 4, p. 282–292, 2005.

MICHL, JOHANNA; ZIMMER, JUTTA; TARSOUNAS, MADALENA. Interplay between Fanconi anemia and homologous recombination pathways in genome integrity. *The EMBO Journal*, v. 35, n. 9, p. 909–923, 2016.

MINOO, PARHAM. Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of Telomere Length. *Frontiers in Oncology*, v. 3, n. October, p. 1–4, 2013.

MOISEYENKO, VLADIMIR M. et al. First-Line Cetuximab Monotherapy in KRAS/NRAS/BRAF Mutation-Negative Colorectal Cancer Patients. *Clinical Drug Investigation*, v. 38, n. 6, p. 553–562, 2018.

MOORE, KEITH L. MOORE / ARTHUR F. DALLEY / MOORE, Keith L. *Anatomia orientada para a clínica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 2014, 2014.

MORAES, MARIA CAROLINA S. et al. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Letters*, v. 314, n. 1, p. 108–118, 2012.

MORCHIKH, MEHDI et al. HEXIM1 and NEAT1 Long Non-coding RNA Form a Multi-subunit Complex that Regulates DNA-Mediated Innate Immune Response. *Molecular Cell*, v. 67, n. 3, p. 387–399.e5, 2017.

MORRIS, E. J. A. et al. Wide Variation in the Use of Radiotherapy in the Management of Surgically Treated Rectal Cancer Across the English National Health Service. *Clinical Oncology*, v. 28, n. 8, p. 522–531, 2016.

MOSHOUS, DESPINA et al. Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency. *Cell*, v. 105, n. 2, p. 177–186, 2001.

NAGEL, Z. D. et al. Multiplexed DNA repair assays for multiple lesions and multiple doses via transcription inhibition and transcriptional mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 111, n. 18, p. E1823–E1832, 2014.

NAGTEGAAL, IRIS D. et al. Tumor deposits in colorectal cancer: Improving the value of modern staging—a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*, v. 35, n. 10, p. 1119–1127, 2017.

NAIR, M.; SANDHU, S. S.; SHARMA, A. K. Prognostic and Predictive Biomarkers in Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, v. 14, n. 5, p. 477–504, 2014.

NCCN - COLON CANCER. Colon Cancer. NCCN Guidelines, p. 1–832, 2018.

NEWLAND, R. C. et al. Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients. *Cancer*, v. 73, n. 8, p. 2076–2082, 1994.

NICHOLSON, BRIAN D. et al. Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*, v. 12, n. 12, p. 1–214, 2015.

NIKOLOUZAKIS, TAXIARCHIS et al. Improving diagnosis, prognosis and prediction by using biomarkers in CRC patients (Review). *Oncology Reports*, v. 39, p. 2455–2472, 2018.

NISSAN, AVIRAM et al. Predictors of recurrence in patients with T2 and early T3, N0 adenocarcinoma of the rectum treated by surgery alone. *Journal of Clinical Oncology*, v. 24, n. 25, p. 4078–4084, 2006.

NOLL, DAVID M.; MASON, TRACEY MCGREGOR; MILLER, PAUL S. Formation and Repair of Interstrand Cross-Links in DNA. *Chemical Reviews*, v. 106, n. 2, p. 277–301, 2006.

O-WANG, JIYANG et al. DNA polymerase κ , implicated in spontaneous and DNA damage-induced mutagenesis, is overexpressed in lung cancer. *Cancer Research*, v. 61, n. 14, p. 5366–5369, 2001.

O'CONNELL, JESSICA B.; MAGGARD, MELINDA A.; KO, CLIFFORD Y. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 96, n. 19, p. 1420–1425, 2004.

O'CONNELL, MICHAEL J. et al. Survival following recurrence in stage II and III colon cancer: Findings from the ACCENT data set. *Journal of Clinical Oncology*, v. 26, n. 14, p. 2336–2341, 2008.

O'DRISCOLL, M. et al. An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome. *DNA Repair*, v. 3, n. 8–9, p. 1227–1235, 2004.

OGINO, S. et al. CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut*, v. 55, n. 7, p. 1000–1006, 2006.

- OGINO, SHUJI 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. 305–314, 2007.
- OGINO, SHUJI et al. Predictive and Prognostic Roles of BRAF Mutation in Stage III Colon Cancer: Results from Intergroup Trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res*, v. 18, n. 3, p. 890–900, 2012.
- OHBA, TARO et al. Expression of an X-family DNA polymerase, pol lambda, in the respiratory epithelium of non-small cell lung cancer patients with habitual smoking. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 677, n. 1–2, p. 66–71, 2009.
- OKUDA, T. Suppression of hREV1 Expression Reduces the Rate at Which Human Ovarian Carcinoma Cells Acquire Resistance to Cisplatin. *Molecular Pharmacology*, v. 67, n. 6, p. 1852–1860, 2005.
- OLIVEIRA, MAX MOURA DE et al. Disparidades na mortalidade de câncer colorretal nos estados brasileiros. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 21, n. 0, 2018.
- OVERMAN, MICHAEL J.; HOFF, PAULO M. EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, v. 50, n. 8, p. 1259–1270, 2007.
- PAN, QIANGRONG et al. Down-regulation of DNA polymerases κ , η , ι , and ζ in human lung, stomach, and colorectal cancers. *Cancer Letters*, v. 217, n. 2, p. 139–147, 2005.
- PANNICKE, ULRICH et al. Functional and biochemical dissection of the structure-specific nuclease ARTEMIS. *EMBO Journal*, v. 23, n. 9, p. 1987–1997, 2004.
- PAPAMICHAEL, DEMETRIS et al. Treatment of the elderly colorectal cancer patient: SIOG expert recommendations. *Annals of Oncology*, v. 20, n. 1, p. 5–16, 2009.
- PARIKH, NISHA I.; VASAN, RAMACHANDRAN S. Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. *Biomarkers in Medicine*, v. 1, n. 3, p. 419–436, 2007.
- PARSONS, JASON L.; DIANOV, GRIGORY L. Co-ordination of base excision repair and genome stability. *DNA Repair*, v. 12, n. 5, p. 326–333, 2013.
- PASSARDI, ALESSANDRO et al. Immune checkpoints as a target for colorectal cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 6, 2017.
- PAZ-ELIZUR, TAMAR et al. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: Potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Letters*, v. 266, n. 1, p. 60–72, 2008.
- PEARLMAN, RACHEL; FRANKEL, WENDY L. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*, v. 3, n. 4, p. 464–471, 2017.
- PENG, CHENGHAO et al. The Error-Prone DNA Polymerase κ Promotes Temozolomide Resistance in Glioblastoma through Rad17-Dependent Activation of ATR-Chk1 Signaling. *Cancer Research*, v. 76, n. 8, p. 2340–2353, 2016.
- PENG, GUANG. Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. *World Journal of Clinical Oncology*, v. 2, n. 2, p. 73–79, 2011.
- PEREZ, RODRIGO OLIVA 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. 757–765, 2008.

- PETRELLI, N. et al. A prospective randomized trial of 5-fluorouracil versus 5-fluorouracil and high-dose leucovorin versus 5-fluorouracil and methotrexate in previously untreated patients with advanced colorectal carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, v. 5, n. 10, p. 1559–1565, 1987.
- PETUKHOVA, GALINA; STRATTO, SABRINA; SUNG, PATRICK. Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature*, v. 393, n. May, p. 91–94, 1998.
- PFEIFFER, P.; GOEDECKE, WOLFGANG; OBE, GÜNTER. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, v. 15, n. 4, p. 289–302, 2000.
- PILLAIRE, M. J. et al. A 'DNA replication' signature of progression and negative outcome in colorectal cancer. *Oncogene*, v. 29, n. 6, p. 876–887, 2010.
- PILLAIRE, MARIE JEANNE; BÉTOUS, RÉMY; HOFFMANN, JEAN SÉBASTIEN. Role of DNA polymerase κ in the maintenance of genomic stability. *Molecular and Cellular Oncology*, v. 1, n. 1, 2014.
- PINHO, MAURO; ROSSI, BENEDITO MAURO. Conceitos Atuais Sobre a Carcinogênese. *Rev Bras Coloproct*, v. 19, n. 1, p. 57–60, 1999.
- PINO, MARIA S.; CHUNG, DANIEL C. NIH Public Access THE CHROMOSOMAL INSTABILITY PATHWAY IN COLON. v. 138, n. 6, p. 2059–2072, 2010.
- POINSIGNON, CATHERINE et al. The Metallo- β -Lactamase/ β -CASP Domain of Artemis Constitutes the Catalytic Core for V(D)J Recombination. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 199, n. 3, p. 315–321, 2004.
- POLLACK, A. et al. Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group trial 92-02. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 11, p. 2133–2140, 2004.
- POPAT, S.; HUBNER, R.; HOULSTON, R. S. Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 3, p. 609–618, 2005.
- PORSCHEN, RAINER et al. Assessment of cell proliferation in colorectal carcinomas using the monoclonal antibody KI-67. Correlation with pathohistologic criteria and influence of irradiation. *Cancer*, v. 64, n. 12, p. 2501–2505, 1989.
- PÖSCHL, GUDRUN et al. Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 63, n. 01, p. 65–71, 2004.
- PRANDI, MARIO et al. Prognostic evaluation of stage B colon cancer patients is improved by an adequate lymphadenectomy: Results of a secondary analysis of a large scale adjuvant trial. *Annals of Surgery*, v. 235, n. 4, p. 458–463, 2002.
- PRICE, TIMOTHY J. et al. Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer. v. 29, n. 19, 2011.
- PRIVETTE, LISA M. et al. Altered expression of the early mitotic checkpoint protein, CHFR, in breast cancers: Implications for tumor suppression. *Cancer Research*, v. 67, n. 13, p. 6064–6074, 2007.

- PUCCI, SABINA et al. Ku70, Ku80, and sClusterin: A Cluster of Predicting Factors for Response to Neoadjuvant Chemoradiation Therapy in Patients With Locally Advanced Rectal Cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 97, n. 2, p. 381–388, 2017.
- QUAH, HAK-MIEN et al. Identification of Patients with High-Risk Stage II Colon Cancer for Adjuvant Therapy. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 51, n. 5, p. 503–507, 2008.
- QUASAR COLLABORATIVE GROUP. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *The Lancet*, v. 370, n. 9604, p. 2020–2029, 2007.
- QUIRKE, PHIL et al. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. *The Lancet*, v. 373, n. 9666, p. 821–828, 2009.
- RAHBARI, NUH N. et al. Molecular detection of tumor cells in regional lymph nodes is associated with disease recurrence and poor survival in node-negative colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*, v. 30, n. 1, p. 60–70, 2012.
- RASKOV, HANS et al. Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 48, p. 18151–18164, 2014.
- RAVANAT, JEAN LUC; DOUKI, THIERRY; CADET, JEAN. 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, 2001.
- RAY, BHUMIKA; GUPTA, BHUMIKA; MEHROTRA, RANJANA. Binding of platinum derivative, oxaliplatin to deoxyribonucleic acid: structural insight into antitumor action. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, p. [Epub ahead of print], 2018.
- RECHKOBLIT, OLGA et al. trans -Lesion Synthesis Past Bulky Benzo[a]pyrene Diol Epoxide N 2 -dG and N 6 -dA Lesions Catalyzed by DNA Bypass Polymerases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 34, p. 30488–30494, 2002.
- REILLY, NICOLE M. et al. Exploiting DNA repair defects in colorectal cancer. *Molecular Oncology*, p. [Epub ahead of print], 2019.
- REIMERS, M. S. et al. Combined analysis of biomarkers of proliferation and apoptosis in colon cancer: An immunohistochemistry-based study using tissue microarray. *International Journal of Colorectal Disease*, v. 29, n. 9, p. 1043–1052, 2014.
- RENKAWITZ, JÖRG; LADEMANN, CLAUDIO A.; JENTSCH, STEFAN. Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 6, p. 369–383, 2014.
- RENZI, C. et al. Do colorectal cancer patients diagnosed as an emergency differ from non-emergency patients in their consultation patterns and symptoms? A longitudinal data-linkage study in England. *British Journal of Cancer*, v. 115, n. 7, p. 866–875, 2016.
- RICH, TINA; ALLEN, RACHEL L.; WYLLIE, ANDREW H. Defying death after DNA damage. *Nature*, v. 407, n. October, p. 777–783, 2000.
- RICHARDS, SALLY et al. Triplex targeted genomic crosslinks enter separable deletion and base substitution pathways. *Nucleic Acids Research*, v. 33, n. 17, p. 5382–5393, 2005.

- ROBERTS, STEVEN et al. Ku is a 5'dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature*, v. 464, n. 7292, p. 1214–1217, 2010.
- RÖDEL, CLAUS 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. *The Lancet Oncology*, v. 16, n. 8, p. 979–989, 2015.
- ROEPMAN, PAUL et al. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *International Journal of Cancer*, v. 134, p. 552–562, 2014.
- ROGERS, A. C. et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, v. 115, n. 7, p. 831–840, 2016.
- ROOCK, WENDY DE 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, 2011.
- ROOS, WYNAND P.; THOMAS, ADAM D.; KAINA, BERND. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, v. 16, n. 1, p. 20–33, 2016.
- ROSSI, BENEDITO MAURO et al. A survey of the clinicopathological and molecular characteristics of patients with suspected Lynch syndrome in Latin America. *BMC Cancer*, v. 17, n. 1, p. 1–26, 2017.
- ROTH, ARNAUD D. et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 3, p. 466–474, 2010.
- ROUGIER, PHILIPPE et al. Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet*, v. 352, n. 9138, p. 1407–1412, 1998.
- RYAN, E. et al. The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 116, p. 38–57, 2017.
- SADANANDAM, ANGURAJ et al. A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nature Medicine*, v. 19, n. 5, p. 619–625, 2013.
- SAFFRAN, WILMA A. et al. DNA repair defects channel interstrand DNA cross-links into alternate recombinational and error-prone repair pathways. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 35, p. 36462–36469, 2004.
- SALAZAR, RAMON et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 1, p. 17–24, 2011.
- SALMINEN, EEVA et al. Increased proliferation activity measured by immunoreactive Ki67 is associated with survival improvement in rectal/recto sigmoid cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v. 11, n. 21, p. 3245–3249, 2005.
- SAMOWITZ, W. S. et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research*,

cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, v. 10, n. 9, p. 917–923, 2001.

SAMOWITZ, WADE S. et al. Relationship of Ki- ras Mutations in Colon Cancers to Tumor Location , Stage , and Survival : A Population-based Study Relationship of Ki- ras Mutations in Colon Cancers to Tumor Location ,. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 9, n. November, p. 1193–1197, 2000.

SANDERS, TINA; SCANLON, VALERIE C. *Essentials of Anatomy and Physiology*. [s.l: s.n.].

SANZ-PAMPLONA, REBECA et al. Clinical Value of Prognosis Gene Expression Signatures in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, p. e48877, 2012.

SCHÄRER, ORLANDO D. DNA interstrand crosslinks: Natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *ChemBioChem*, v. 6, n. 1, p. 27–32, 2005.

SCHÄRER, ORLANDO D. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 5, p. 1–9, 2013.

SCHMOLL, HANS JOACHIM et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: Final Results of the NO16968 randomized controlled phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*, v. 33, n. 32, p. 3733–3740, 2015.

SCHOENMAKERS, ERIC F. P. M.; HUYSMANS, CHRISTEL; VAN DE VEN, WIM J. M. Allelic knockout of novel splice variants of human recombination repair gene RAD51B in t(12;14) uterine leiomyomas. *Cancer Research*, v. 59, n. 1, p. 19–23, 1999.

SCHOLZEN, THOMAS; GERDES, JOHANNES. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *Journal of Cellular Physiology*, v. 182, p. 311–322, 2000.

SCHRAG, DEBORAH et al. Adjuvant chemotherapy use for medicare beneficiaries with stage II colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 20, n. 19, p. 3999–4005, 2002.

SCOLNICK, DANIEL M.; HALAZONETIS, THANOS D. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature*, v. 406, n. 6794, p. 430–435, 2000.

SEDELNIKOVA, A. OLGA et al. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*, v. 704, n. 1–3, p. 152–159, 2010.

SEPULVEDA, ANTONIA R. et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from The American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*, v. 35, n. 13, p. 1453–1496, 2017.

SEYMOUR, M. T. et al. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet*, v. 370, n. 9582, p. 143–152, 2007.

SHACHAR, SIGAL et al. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO Journal*, v. 28, n. 4, p. 383–393, 2009.

SHARPLESS, NORMAN E. et al. Impaired nonhomologous end-joining provokes soft

tissue sarcomas harboring chromosomal translocations, amplifications, and deletions. *Molecular Cell*, v. 8, n. 6, p. 1187–1196, 2001.

SHEN, STEVEN S. et al. Number of lymph nodes examined and associated clinicopathologic factors in colorectal carcinoma. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 133, n. 5, p. 781–786, 2009.

SHO, SHONAN et al. A prognostic mutation panel for predicting cancer recurrence in stages II and III colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, v. 116, n. 8, p. 996–1004, 2017.

SIEGEL, REBECCA L. et al. Colorectal Cancer Statistics , 2017. *CA Cancer J Clin*, v. 67, n. 3, p. 177–193, 2017.

SIMONELLI, VALERIA et al. Reprint of: Gene susceptibility to oxidative damage: From single nucleotide polymorphisms to function. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 736, n. 1–2, p. 104–116, 2012.

SINICROPE, FRANK A. et al. Prognostic Impact of Microsatellite Instability and DNA Ploidy in Human Colon Carcinoma Patients. *Gastroenterology*, v. 131, n. 3, p. 729–737, 2006.

SINICROPE, FRANK A.; SARGENT, DANIEL J. Molecular pathways: Microsatellite instability in colorectal cancer: Prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clinical Cancer Research*, v. 18, n. 6, p. 1506–1512, 2012.

SIRAJ, ABDUL K. et al. A very low incidence of BRAF mutations in Middle Eastern colorectal carcinoma. *Molecular Cancer*, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2014.

SLOOTHAAK, D. A. M. et al. The prognostic value of micrometastases and isolated tumour cells in histologically negative lymph nodes of patients with colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology*, v. 40, n. 3, p. 263–269, 2014.

SLUPPHAUG, GEIR; KAVLI, BODIL; KROKAN, HANS E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 531, n. 1–2, p. 231–251, 2003.

SMEATON, MICHAEL B. et al. Effect of Cross-Link Structure on DNA Interstrand Cross-Link Repair Synthesis. v. 22, n. 7, p. 1285–1297, 2009.

SMITH, J. J. et al. Social deprivation and outcomes in colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, v. 93, n. 9, p. 1123–1131, 2006.

SMITH, LUCY K.; POPE, CATHERINE; BOTHA, JOHANNES L. Patients' help-seeking experiences and delay in cancer presentation: A qualitative synthesis. *Lancet*, v. 366, n. 9488, p. 825–831, 2005.

SØNDENAA, K. et al. The rationale behind complete mesocolic excision (CME) and a central vascular ligation for colon cancer in open and laparoscopic surgery: Proceedings of a consensus conference. *International Journal of Colorectal Disease*, v. 29, n. 4, p. 419–428, 2014.

SONODA, EIICHIRO et al. Multiple roles of Rev3, the catalytic subunit of polζ in maintaining genome stability in vertebrates. *EMBO Journal*, v. 22, n. 12, p. 3188–3197, 2003.

SPIVAK, GRACIELA; GANESAN, ANN K. The complex choreography of transcription-coupled repair. *DNA Repair*, v. 19, p. 64–70, 2014.

- SRIVASTAVA, AMIT KUMAR et al. Enhanced expression of DNA polymerase η contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 14, p. 4411–4416, 2015.
- SRIVASTAVA, G. et al. Prospective Multicenter Study of the Impact of Oncotype DX Colon Cancer Assay Results on Treatment Recommendations in Stage II Colon Cancer Patients. *The Oncologist*, v. 19, n. 5, p. 492–497, 2014.
- STACKER, STEVEN A.; BALDWIN, MEGAN E.; ACHEN, MARC G. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 16, n. 9, p. 922–934, 2002.
- STANCEL, NICOLE K. et al. Polk Mutant Mice Have a Spontaneous Mutator Phenotype. *DNA Repair*, v. 8, n. 12, p. 1355–1362, 2009.
- STARCEVIC, DANIELA; DALAL, SHIBANI; SWEASY, JOANN B. Is there a link between DNA polymerase β and cancer? *Cell Cycle*, v. 3, n. 8, p. 998–1001, 2004.
- STOFFEL, ELENA M.; KASTRINOS, FAY. Familial colorectal cancer, beyond lynch syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 12, n. 7, p. 1059–1068, 2014.
- STRACKER, TRAVIS H. et al. The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: The importance of communicating and holding things together. *DNA Repair*, v. 3, n. 8–9, p. 845–854, 2004.
- SUZUKI, NAOMI et al. Translesion synthesis by human DNA polymerase κ on a DNA template containing a single stereoisomer of dG-(+)- or dG-(-)-anti-N2-BPDE (7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene). *Biochemistry*, v. 41, n. 19, p. 6100–6106, 2002.
- SYMINGTON, LORRAINE S.; GAUTIER, JEAN. Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. *Annual Review of Genetics*, v. 45, n. 1, p. 247–271, 2011.
- TAKAGAWA, RYO et al. Preoperative serum carcinoembryonic antigen level as a predictive factor of recurrence after curative resection of colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*, v. 15, n. 12, p. 3433–3439, 2008.
- TAKAHASHI, YUTAKA et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer research*, v. 55, n. 18, p. 3964–8, 1995.
- TANAKA, TAKUJI et al. Biomarkers for colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, n. 9, p. 3209–3225, 2010.
- TENG, KAI YUAN et al. DNA polymerase η protein expression predicts treatment response and survival of metastatic gastric adenocarcinoma patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy. *Journal of Translational Medicine*, v. 8, p. 1–9, 2010.
- THERKILDSEN, CHRISTINA et al. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncologica*, v. 53, n. 7, p. 852–864, 2014.
- THIBODEAU, S. N.; BREN, G.; SCHAID, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, v. 260, n. 5109, p. 816–819, 1993.
- THOMA, BRIAN S. et al. Human XPC-hHR23B interacts with XPA-RPA in the recognition of triplex-directed psoralen DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Research*, v. 33, n. 9, p. 2993–3001, 2005.

TOKUHARA, KATSUJI et al. Outcomes of neoadjuvant chemoradiotherapy in Japanese locally advanced rectal carcinoma patients. *World Journal of Surgical Oncology*, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2016.

TOURNIGAND, CHRISTOPHE et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 2, p. 229–237, 2004.

TSODIKOV, OLEG V. et al. Structural basis for the recruitment of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA. *EMBO Journal*, v. 26, n. 22, p. 4768–4776, 2007.

TUDEK, BARBARA; SPEINA, ELZBIETA. Oxidatively damaged DNA and its repair in colon carcinogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 736, n. 1–2, p. 82–92, 2012.

TURNER, FIONA B. et al. Phosphorylation of Histone H4 Serine 1 during DNA Damage Requires Casein Kinase II in *S. cerevisiae*. *Current Biology*, v. 15, n. 7, p. 656–660, 2005.

TUTEJA, N. et al. Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *The EMBO Journal*, v. 13, n. 20, p. 4991–5001, 1994.

TWELVES, C. et al. Capecitabine (*Xeloda*™) improves medical resource use compared with 5-fluorouracil plus leucovorin in a phase III trial conducted in patients with advanced colorectal carcinoma. *European Journal of Cancer*, v. 37, 2001.

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. 1190–1197, 2012.

UENO, HIDEKI et al. Extramural cancer deposits without nodal structure in colorectal cancer: Optimal categorization for prognostic staging. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 127, n. 2, p. 287–294, 2007.

UMAR, ASAD et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J Natl Cancer Inst*, v. 96, n. 4, p. 261–268, 2014.

VACCARO, CARLOS ALBERTO et al. From colorectal cancer pattern to the characterization of individuals at risk: Picture for genetic research in Latin America. *International Journal of Cancer*, v. 9, p. 1–9, 2018.

VAN CUTSEM, ERIC et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, v. 27, n. 8, p. 1386–1422, 2016. a.

VAN CUTSEM, ERIC et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, v. 27, n. 8, p. 1386–1422, 2016. b.

VAN CUTSEM, ERIC et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, v. 27, n. 8, p. 1386–1422, 2016. c.

VAN EEGHEN, ELMER E. et al. Impact of age and comorbidity on survival in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, v. 6, n. 6, p. 605–612, 2015.

- VAN OVERBEEK, MEGAN; DE LANGE, TITIA. Apollo, an Artemis-Related Nuclease, Interacts with TRF2 and Protects Human Telomeres in S Phase. *Current Biology*, v. 16, n. 13, p. 1295–1302, 2006.
- VAUTHEY, JN et al. RAS mutation status predicts survival and patterns of recurrence in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg*, v. 258, n. 4, 2013.
- 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, 2012.
- VINEIS, PAOLO; WILD, CHRISTOPHER P. Global cancer patterns: Causes and prevention. *The Lancet*, v. 383, n. 9916, p. 549–557, 2014.
- VIRAG, L., SZABO, C. The Therapeutic Potential of Poly (ADP-Ribose). *Pharmalogical Reviews*, v. 54, n. 3, p. 375–429, 2002.
- VOGELSTEIN, BERT et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine*, v. 319, n. 9, p. 525–532, 1988.
- VOLKER, MARCEL et al. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Molecular Cell*, v. 8, n. 1, p. 213–224, 2001.
- WALTHER, AXEL et al. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, n. 7, p. 489–499, 2009.
- WANG, ANDERSON et al. Human SNM1A and XPF–ERCC1 collaborate to initiate DNA interstrand cross-link repair. *Genes & Development*, v. 25, p. 1859–1870, 2011.
- WANG, GUI HUA et al. BRCA1 and BRCA2 expression patterns and prognostic significance in digestive system cancers. *Human Pathology*, v. 71, p. 135–144, 2018.
- WANG, JINGWEN et al. Polymorphisms in DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XPD, and colorectal cancer risk: A case-control study in an Indian population. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 136, n. 10, p. 1517–1525, 2010.
- WANG, LIHUA; BROYDE, SUSE; ZHANG, YINGKAI. Polymerase-tailored variations in the Water-Mediated and Substrate-Assisted Mechanism for Nucleotidyl Transfer: Insights from a Study of T7 DNA Polymerase. *J Mol Biol*, v. 389, n. 4, p. 787–796, 2009.
- WANG, X. et al. Involvement of Nucleotide Excision Repair in a Recombination-Independent and Error-Prone Pathway of DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Molecular and Cellular Biology*, v. 21, n. 3, p. 713–720, 2001.
- WANG, YANQING et al. Elevated expression of DNA polymerase κ in human lung cancer is associated with p53 inactivation: Negative regulation of POLK promoter activity by p53. *International Journal of Oncology*, v. 25, n. 17, p. 161–165, 2004.
- WASHINGTON, MARY KAY et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 133, n. 10, p. 1539–51, 2009.
- WATANABE, TOSHIAKI et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 20, n. 2, p. 207–239, 2015.
- WATANABE, TOSHIAKI et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum

(JSCCR) guidelines 2016 for the treatment of colorectal cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 1, p. 1–34, 2018.

WATERS, LAUREN S. et al. Eukaryotic Translesion Polymerases and Their Roles and Regulation in DNA Damage Tolerance. v. 73, n. 1, p. 134–154, 2009.

WEISENBERGER, DANIEL J. et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nature Genetics*, v. 38, n. 7, p. 787–793, 2006.

WEITZ, JÜRGEN et al. Colorectal Cancer. *Lancet*, v. 365, p. 153–165, 2005.

WEST, NICHOLAS P. et al. Pathology grading of colon cancer surgical resection and its association with survival: a retrospective observational study. *The Lancet Oncology*, v. 9, n. 9, p. 857–865, 2008.

WEST, NICHOLAS P. et al. Complete mesocolic excision with central vascular ligation produces an oncologically superior specimen compared with standard surgery for carcinoma of the colon. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 2, p. 272–278, 2010.

WHITBY, MATTHEW C.; OSMAN, FEKRET; DIXON, JULIE. Cleavage of model replication forks by fission yeast Mus81-Eme1 and budding yeast Mus81-Mms4. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 9, p. 6928–6935, 2003.

WHO. Media centre Cancer. World Health Organization, n. February, p. 1–7, 2017.

WIBE, A. et al. A national strategic change in treatment policy for rectal cancer--implementation of total mesorectal excision as routine treatment in Norway. A national audit. *Dis Colon Rectum*, v. 45, n. 7, p. 857–866, 2002.

WILLIS, DAVID M. et al. Regulation of Osteocalcin Gene Expression by a Novel Ku Antigen Transcription Factor Complex. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 40, p. 37280–37291, 2002.

WONG, SIU KIN C. et al. Direct tumor invasion in colon cancer: Correlation with tumor spread and survival. *Diseases of the Colon and Rectum*, v. 51, n. 9, p. 1331–1338, 2008.

WOOD, RICHARD D.; DOUBLIE, SYLVIE. DNA polymerase θ (POLQ), double-strand break repair, and cancer. *DNA Repair*, v. 44, p. 22–32, 2016.

WU, FANG et al. DNA polymerase ζ regulates cisplatin cytotoxicity, mutagenicity, and the rate of development of cisplatin resistance. *Cancer Research*, v. 64, n. 21, p. 8029–8035, 2004.

WU, QI et al. Mismatch repair participates in error-free processing of DNA interstrand crosslinks in human cells. *EMBO Reports*, v. 6, n. 6, p. 551–556, 2005.

WU, ZHENZHEN; WANG, YUMING. Studies of lncRNAs in DNA double strand break repair: what is new? *Oncotarget*, v. 8, n. 60, p. 102690–102704, 2017.

XIAO, XIANGSHENG et al. Ku80 cooperates with CBP to promote COX-2 expression and tumor growth. *Oncotarget*, v. 6, n. 10, p. 8046–8061, 2015.

XIE, K. et al. Error-prone translesion synthesis mediates acquired chemoresistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 48, p. 20792–20797, 2010.

XU-WELLIVER, MENG; PEGG, ANTHONY E. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, v. 23, n.

5, p. 823–30, 2002.

XU, X. et al. Enhancing tumor cell response to chemotherapy through nanoparticle-mediated codelivery of siRNA and cisplatin prodrug. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 46, p. 18638–18643, 2013.

XYNOS, EVAGHELOS et al. Clinical practice guidelines for the surgical management of colon cancer: A consensus statement of the hellenic and cyriot olorectal cancer study group by the HeSMO. *Annals of Gastroenterology*, v. 29, n. 1, p. 3–17, 2016.

YAEGER, R. et al. RAS Mutations Affect Pattern of Metastatic Spread and Increase Propensity for Brain Metastasis in Colorectal Cancer Rona. *Cancer*, v. 121, n. 8, p. 1195–1203, 2015.

YAMAGUCHI, TAKESHI et al. Clinical validation of the gastrointestinal NET grading system: Ki67 index criteria of the WHO 2010 classification is appropriate to predict metastasis or recurrence. *Diagnostic Pathology*, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2013.

YAN, YIYI et al. The multifunctional SNM1 gene family: not just nucleases . *Future Oncology*, v. 6, n. 6, p. 1015–1029, 2010.

YANG, CAI-GUANG; GARCIA, KRISTEL; HE, CHUAN. Damage Detection and Base Flipping in Direct DNA Alkylolation Repair. *Chembiochem*, v. 10, n. 13, p. 417–423, 2009.

YANG, JIN et al. Altered DNA Polymerase ϵ Expression in Breast Cancer Cells Leads to a Reduction in DNA Replication Fidelity and a Higher Rate of Mutagenesis. *Cancer Research*, v. 64, n. 16, p. 5597–5607, 2004.

YANG, YINGCHI et al. Prognostic value of the combination of microsatellite instability and BRAF mutation in colorectal cancer. *Cancer Management and Research*, v. 10, p. 3911–3929, 2018.

YANG, YUCHONG et al. Prognostic Value of Perineural Invasion in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, v. 19, n. 6, p. 1113–1122, 2015.

YOUSEFZADEH, MATTHEW J.; WOOD, RICHARD D. DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage. *DNA Repair*, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2014.

ZAFAR, MAROOF K.; EOFF, ROBERT L. Translesion DNA Synthesis in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Chemical Research in Toxicology*, v. 30, n. 11, p. 1942–1955, 2017.

ZENG, LING et al. Combining Chk1/2 Inhibition with Cetuximab and Radiation Enhances In Vitro and In Vivo Cytotoxicity in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther*, v. 16, n. 4, p. 591–600, 2017.

ZHANG, YANBIN et al. Activities of human DNA polymerase κ in response to the major benzo[a]pyrene DNA adduct: Error-free lesion bypass and extension synthesis from opposite the lesion. *DNA Repair*, v. 1, n. 7, p. 559–569, 2002.

ZHAO, JUNHUA et al. Mismatch repair and nucleotide excision repair proteins cooperate in the recognition of DNA interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 13, p. 4420–4429, 2009.

ZHAO, WEN YI et al. Prognostic value of Ki67 index in gastrointestinal stromal tumors. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 7, n. 5, p. 2298–2304, 2014.

- ZHAO, Y. et al. Structural basis of human DNA polymerase δ -mediated chemoresistance to cisplatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 19, p. 7269–7274, 2012.
- ZHENG, H. et al. Nucleotide Excision Repair- and Polymerase δ -Mediated Error-Prone Removal of Mitomycin C Interstrand Cross-Links. *Molecular and Cellular Biology*, v. 23, n. 2, p. 754–761, 2003.
- ZHOU, BIN-BING; ELLEDGE, STEPHEN. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, v. 408, n. November, p. 433–439, 2000.
- ZHOU, WENDI et al. Expression of DNA translesion synthesis polymerase η in head and neck squamous cell cancer predicts resistance to gemcitabine and cisplatin-based chemotherapy. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. 1–10, 2013.
- ZHU, FENG; ZHANG, MING. DNA polymerase ζ : New insight into eukaryotic mutagenesis and mammalian embryonic development. *World Journal of Gastroenterology*, v. 9, n. 6, p. 1165–1169, 2003.
- ZHU, HUIFANG et al. Response of human DNA polymerase ι promoter to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 29, n. 1, p. 79–86, 2010.
- ZHU, HUIFANG et al. Characterization of human DNA polymerase κ promoter in response to benzo[a]pyrene diol epoxide. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 33, n. 2, p. 205–211, 2012.
- ZHUANG, LUHONG 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, INTI et al. Multimarker phenotype predicts adverse survival in patients with lymph node-negative colorectal cancer. *Cancer*, v. 112, n. 3, p. 495–502, 2008.
- ZLOBEC, INTI et al. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, v. 127, n. 11, p. 2569–2575, 2010.

8. ANEXOS

8.1. Anexo I: Normas da revista: BMC Cancer

BMC Cancer

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':
Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state “Not applicable” in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person’s data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state “Not applicable” in this section.

Availability of data and materials

All manuscripts must include an ‘Availability of data and materials’ statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each authors' competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a

major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

Examples of the Vancouver reference style are shown below.

See our [editorial policies](#) for author guidance on good citation practice

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine.* 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology.* London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem.* 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness.* 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects.* Royal Society of Chemistry. 1999. http://www.rsc.org/dose/title_of_subordinate_document. Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. *US Pharmacopeia,* Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

8.2. Anexo II: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA do projeto inicial.

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

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 833.555

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 da 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 de DNA, 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

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

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

Página 04 de 04

8.3. Anexo III: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA do projeto inicial.

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 TECNOLÓGICO
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-partícipe ISCMPA.

Objetivo da Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Endereço: Rua Sarmiento 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



Continuação do Parecer: 511.724

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 Sarmiento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS


Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303 -8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Página 02 de 02

8.4. Anexo IV: 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 da modulação da expressão das polimerases translesão sobre o prognóstico de pacientes com câncer colorretal

Pesquisador: ANTONIO NOCCHI KALIL

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 58299916.3.0000.5335

Instituição Proponente: ISCMPA

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.730.328

Apresentação do Projeto:

Já descritos no parecer consubstanciado anterior do CEP.

Objetivo da Pesquisa:

Já descritos no parecer consubstanciado anterior do CEP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentados e adequados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As pendências solicitadas no TCLE e no Projeto na Plataforma, foram atendidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados e adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências solicitadas no TCLE e no Projeto na Plataforma, foram atendidas e esta pesquisa respeita as normas vigentes para pesquisa clínica no Brasil.

Endereço: R. Prof. Arnês Dias, 395 Hosp. Dom Vicente Scherer			
Bairro: 6º andar - Centro		CEP: 90.030-090	
UF: RS	Município: PORTO ALEGRE		
Telefone: (51)3214-0571	Fax: (51)3214-0571	E-mail: cep@santacasa.tche.br	

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Qualificação do Parecer: 1.733.028

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_730544.pdf	14/09/2016 10:54:20		Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_140916.pdf	14/09/2016 10:53:53	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ISCMPA_Versao2.docx	14/09/2016 10:44:03	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Gustavo_Laporte_Versao_1.docx	28/07/2016 19:03:02	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	TCLE_UFCSPA_Versao1.pdf	28/07/2016 18:41:42	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Termodecompromisso_UFCSPA.pdf	28/07/2016 18:34:14	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Termodeanuencia_Lab_UFCSPA.pdf	28/07/2016 18:33:11	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Formulario_de_Inscricao.pdf	28/07/2016 18:32:31	Natalia Motta Leguisamo	Aceito

Endereço: R. Prof. Almeida Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: S'ander - Centro CEP: 90.025-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 Fax: (51)3214-8571 E-mail: cep@servicos.isc.br

Página 02 de 04

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.730.328

Outros	Formulario_de_Inscricao.pdf	28/07/2016 18:32:31	Meireles	Aceito
Outros	Chefa_Lab_GenToxicol.pdf	28/07/2016 18:30:58	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Cronograma	Cronograma_Detalhado_Gustavo_Versao2.pdf	28/07/2016 18:25:34	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ISCMPA_Versao2.pdf	28/07/2016 18:23:52	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	04/07/2016 14:01:06	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Orçamento	Orcamento_Detalhado_Gustavo.pdf	13/06/2016 09:54:11	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Outros	Lattes_Laporte.pdf	06/06/2016 19:26:19	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Outros	Lattes_Jenifer.pdf	06/06/2016 19:25:34	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Outros	Lattes_Kalli.pdf	06/06/2016 19:25:14	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Outros	Lattes_Daniel.pdf	06/06/2016 19:17:44	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Outros	Lattes_Helena.pdf	06/06/2016 19:17:29	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Outros	Lattes_Natalia.pdf	06/06/2016 19:17:13	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Outros	Declaracao_de_Autorizacao_da_Chefa_responsavel_Cirurgia_Onco.pdf	06/06/2016 17:08:21	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Outros	Declaracao_de_Autorizacao_da_Chefa_responsavel_Coloproctolog.pdf	06/06/2016 17:03:59	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_confidencialidade_do_sujeito_no_estudo.pdf	06/06/2016 17:01:10	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Isencao_de_Onus_a_instituicao.pdf	06/06/2016 16:59:55	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito

Endereço: R. Prof. Annes Dias, 295 Hoop Dom Vicente Scherer

Bairro: 9º andar - Centro

CEP: 90.020-090

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3214-8571

Fax: (51)3214-8571

E-mail: cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.730.318

Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Uso_de_Dados_e_Materiais.pdf	06/06/2016 16:59:40	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Uso_e_Publicacao_de_dados.pdf	06/06/2016 16:59:02	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados_e_prontuarios.pdf	06/06/2016 16:58:29	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:


Não

PORTO ALEGRE, 16 de Setembro de 2016

Assinado por:
ELIZETE KEITEL
(Coordenador)

Endereço: R. Prof. Amos Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 8º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-0571 Fax: (51)3214-0571 E-mail: cep@iscmpa.br

8.5. Anexo V: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
Elaborado pela Instituição Coparticipante	
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Avaliação da modulação da expressão das polimerases translesão sobre o prognóstico de pacientes com câncer colorretal	
Pesquisador: ANTONIO NOCCHI KALIL	
Área Temática: Genética Humana (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);	
Versão: 1	
CAAE: 5829816.3.3001.5345	
Instituição Proponente: ISCMPA	
Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre Financiamento Próprio	
DADOS DO PARECER	
Número do Parecer: 1.790.209	
Apresentação do Projeto:	
<p>O câncer colorretal (CCR) é a terceira causa de morte por câncer no mundo. Cerca de 85% dos casos de CCR são esporádicos. A capacidade de reparo do DNA é determinante não apenas no desenvolvimento de uma neoplasia, mas também na avaliação do prognóstico e na resposta individual frente a terapia. A maior evidência do envolvimento do sistema de reparo do DNA na patogênese do CCR está na distúrcia no reparo de mal pareamento encontrado nas versões hereditárias do CCR e em cerca de 15 a 20% dos casos esporádicos. Alado a isto, em razão de o epitélio colônico estar sujeito a constantes injúrias relacionadas a substâncias exógenas e por possuir um elevado metabolismo celular e a grande produção de espécies reativas de oxigênio. Torna-se plausível o envolvimento das vias de reparo por excisão de bases (BER) e nucleotídicas (NER) na patogênese colorretal. De fato, estudos apontam que alterações na expressão de genes do BER estão envolvidas com pior prognóstico, e que uma expressão mais baixa de NER está relacionada a um maior risco de desenvolvimento de CCR. Já a via de síntese translesão (TLS) é uma via sujeita a erro (error-prone) e pode levar a maior instabilidade genômica, podendo estar ligada a carcinogênese colorretal. Por tanto, tendo em vista a importância de MMR, BER e NER para</p>	
Endereço: Rua Sarmiento Lote 245 Bairro: Sarmiento CEP: 91.060-170 UF: RS Município: PORTO ALEGRE Telefone: (51)3303-6804 E-mail: cep@ufcspa.edu.br	

Página 11 de 20

CCR, a ligação de TLS com a instabilidade genômica e a possível interação entre essas vias de acordo com as diferentes DNA polimerases, acreditamos que TLS pode apresentar influência em CCR. A compreensão do perfil do reparo do DNA nestes tumores poderá servir para a proposição de marcadores moleculares e diagnósticos. **Objetivo:** Avaliar a expressão genica e proteica de proteínas envolvidas na síntese translesão, assim como o perfil de expressão proteica da via de mau pareamento em amostras tumorais de adenocarcinomas colorretais ressecados durante o procedimento cirurgico desta patologia. **Metodologia:** Amostras de adenocarcinomas colorretais ressecadas após cirurgia de remoção do tumor de pacientes e amostras de mucosas intestinais saudáveis serão submetidas a extração de RNA e DNA, quantificação da expressão genica e avaliação da metilação dos genes Pol, Pol e Pol através de RT-PCR Array. Além disso, será feita imunistoquímica para avaliar a expressão proteica das proteínas MLH1 e MSH2 da via de reparo por malpareamento. Os dados obtidos serão relacionados com as variáveis clínicas e com os critérios atuais de estadiamento. A análise estatística será realizada no programa SPSS 22.0 de acordo com a variável em questão, p será considerado significativo quando $<0,05$.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão genica e proteica da síntese translesão (TLS) e do reparo por junção de extremidades não-homologas (NHEJ), em amostras tumorais de adenocarcinomas colorretais ressecados durante o procedimento cirurgico desta patologia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Conforme a resolução vigente 466/12, toda a pesquisa apresenta riscos mínimos como o vazamento de alguma informação.

Benefícios:

Os benefícios desta pesquisa serão obtidos em longo prazo, através de estudos diagnósticos. A partir deste trabalho, serão propostos possíveis marcadores moleculares para refinamento do diagnóstico, prognóstico e sensibilidade ao tratamento quimioterápico do câncer colorretal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os documentos apresentados atenderam às solicitações feitas pelo Comitê de Ética da ISCMPA a partir da emissão de parecer substanciado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram incluídos.

Endereço: Rua Serrano Leite, 240
Bairro: Serrano
CEP: 91.280-110
UF: RS
Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8834
E-mail: cep@ufscv.edu.br

Continuação do Parecer: 1.730.328

Recomendações:

Recomenda-se aprovação, após análise dos documentos apresentados e do Parecer Consubstanciado No. 1.730.328, emitido pelo Comitê de Ética da ISCMPA.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_730544.pdf	14/06/2016 10:54:20		Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_140916.pdf	14/06/2016 10:53:53	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ISCMPA_Versao2.docx	14/06/2016 10:44:03	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_730544.pdf	28/07/2016 19:07:41		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Gustavo_Laporte_Versao_1.docx	28/07/2016 19:03:02	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Outros	TCLE_UFCSPA_Versao1.pdf	28/07/2016 18:41:42	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Outros	Termodecompromisso_UFCSPA.pdf	28/07/2016 18:34:14	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Outros	Termodeanuencia_Lab_UFCSPA.pdf	28/07/2016 18:33:11	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Outros	Formulario_de_inscricao.pdf	28/07/2016 18:32:31	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Outros	Chefia_Lab_GenToxicol.pdf	28/07/2016 18:30:58	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Cronograma	Cronograma_Detalhado_Gustavo_Versao2.pdf	28/07/2016 18:26:34	Natalia Motta Leguisamo	Aceito

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 243

Bairro: Sarmiento

CEP: 91.060-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.790.209

Cronograma	Cronograma_Detalhado_Gustavo_Versa o2.pdf	28/07/2016 18:25:34	Meireles	Aceto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Agência	TCLE_ISCMPA_Versao2.pdf	28/07/2016 18:23:52	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_730544.pdf	04/07/2016 14:21:37		Aceto
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	04/07/2016 14:01:05	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Orçamento	Orçamento_Detalhado_Gustavo.pdf	13/06/2016 09:54:11	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Outros	Lattes_Laporte.pdf	05/05/2016 19:26:19	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Outros	Lattes_Jenifer.pdf	05/05/2016 19:25:34	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Outros	Lattes_Kaill.pdf	05/05/2016 19:25:14	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Outros	Lattes_Daniel.pdf	05/05/2016 19:17:44	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Outros	Lattes_Helena.pdf	05/05/2016 19:17:29	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Outros	Lattes_Natalia.pdf	05/05/2016 19:17:13	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Outros	Declaracao_de_Autorizacao_da_Chefia _responsavel_Cirurgia_Onco.pdf	06/05/2016 17:08:21	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Outros	Declaracao_de_Autorizacao_da_Chefia _responsavel_Coloproctolog.pdf	06/05/2016 17:03:59	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_confidencialidade_do_a ujoito_no_estudo.pdf	06/05/2016 17:01:10	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Isencao_de_Onus_a_in stituicao.pdf	06/05/2016 16:59:55	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Uso_de_Dados_e_Mate riais.pdf	06/05/2016 16:59:40	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceto

Endereço: Rua Sarmiento Latta 245
Bairro: Sarmiento CEP: 91.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8304 E-mail: cep@ufcsa.edu.br

Página 04 de 05

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação de Parecer: 1.190.309

Declaração de Pesquisadores	Declaração_de_Uso_e_Publicação_de_dados.pdf	06/06/2016 16:59:02	Natália Motta Legisamo Meireles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_para_utilização_de_dados_e_prontuários.pdf	06/06/2016 16:58:29	Natália Motta Legisamo Meireles	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 25 de Outubro de 2016

Assinado por:

Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245
Bairro: Sarmiento CEP: 96.050-170
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3333-8804 E-mail: cnp@ufsc.br

Plataforma Brasil

8.6. Anexo VI: 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 certos 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:_____