

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

Daniel de Barcellos Azambuja

**Estudo Prognóstico do Sistema de
Reparo de Quebras Duplas do DNA em
Pacientes com Câncer Colorretal
Esporádico**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2021

Daniel de Barcellos Azambuja

Estudo Prognóstico do Sistema de Reparo de Quebras Duplas do DNA em Pacientes com Câncer Colorretal Esporádico

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

Orientadora: Prof. Dra. Jenifer Saffi

Co-orientador: Dra. Antônio Nocchi Kalil

Co-orientadora: Natalia Motta Leguisamo Meirelles

Porto Alegre

2021

Catálogo na Publicação

de Barcellos Azambuja, Daniel
Estudo Prognóstico do Sistema de Reparo de Quebras
Duplas do DNA em Pacientes com Câncer Colorretal
Esporádico / Daniel de Barcellos Azambuja. -- 2021.
147 f. : graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, 2021.

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

1. Câncer colorretal. 2. Reparo de quebras duplas. 3.
Recombinação homóloga. 4. instabilidade de
microssatélites. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA nº 1122 - 2021

De acordo com o estabelecido previamente pela Comissão Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, realizou-se aos vinte e dois dias do mês de novembro de 2021, às dez horas de forma remota via plataforma Google Meet, a defesa da Tese de Doutorado do aluno **Daniel de Barcellos Azambuja**, orientado pela professora Jenifer Saffi e coorientado pelos professores Antônio Nocchi Kalil e Natalia Motta Leguisamo Meirelles no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFCSPA. O trabalho defendido intitula-se “**Estudo Prognóstico do Sistema de Reparo de Quebras Duplas do DNA em Pacientes com Câncer Colorretal Esporádico.**” A Banca Examinadora foi composta pelos professores Elizandra Braganhol (UFCSPA), Angelo Zambam de Mattos (UFCSPA), Adriana Vial Roche (UFCSPA) e Sérgio Eduardo Alonso Araujo (HIAEinstein). Após a abertura da sessão o aluno dispôs de 40 minutos para expor seu trabalho. Ao término da apresentação, foi realizada a arguição do aluno pelos membros da banca examinadora. Ao término da Sessão foi anunciada a aprovação do aluno que, após a homologação da Tese de Doutorado, receberá o título de Doutor em Ciências da Saúde: Biologia Celular e Molecular. Nada mais havendo a tratar, foi encerrada a sessão e lavrada a presente ata, que será assinada pela orientadora do aluno e pela coordenação do Programa.

Porto Alegre, 22 de novembro de 2021.

Profª. Márcia Rosângela Wink
Coordenadora Substituta

Profª. Jenifer Saffi
Orientadora

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho à minha esposa, Graziela,
e aos meus filhos, Pedro e Vicente**

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Jenifer Saffi pela orientação e por abrir os caminhos para a continuidade da minha formação.

À Natalia Leguisamo Meirelles pela co-orientação e pelo aprendizado.

Às técnicas do laboratório de Patologia da UFCSPA, Rosalva, Keli e Terezinha pela consultoria e colaboração na execução das atividades deste trabalho.

Aos professores Dr. Jose Vinicius Cruz e Dr. Antonio Nocchi Kalil, meus mestres e exemplos a serem seguidos.

À doutoranda Helena de Castro e Gloria do Laboratório de Genética Toxicológica pela amizade e ajuda na realização deste estudo.

Aos pacientes que tornaram possível essa pesquisa.

Aos meus pais e irmão que sempre me ajudaram em todos os momentos da minha vida.

À minha esposa, Graziela, por ser companheira e incentivadora das minhas conquistas.

Aos meus filhos, Pedro e Vicente, por serem a razão do meu viver.

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal (CCR) ainda carece de biomarcadores que mitiguem inconsistências no estadiamento da doença e de novos alvos moleculares para expandir as opções terapêuticas. Análises genômicas de repositórios públicos têm identificado a presença de alterações na via de reparo por DNA de recombinação homóloga (HRR) em até 20% dos tumores colorretais. A caracterização da deficiência da via HRR (HRD) - causada por mutações patogênicas em genes centrais, como *BRCA1/2* e *PALB2* - permitiu o desenvolvimento de estratégias que mudaram a prática clínica para diversos tumores, mas não para o CCR. Portanto, a caracterização da HRR e da sua influência sobre o prognóstico do CCR é essencial para direcionar o desenvolvimento de biomarcadores e novos alvos terapêuticos. **Objetivo:** Avaliar o papel prognóstico da expressão de genes-chave da via HRR e as associações com aspectos clinicopatológicos em pacientes com CCR submetidos à cirurgia de ressecção. **Métodos:** amostras tumorais e saudáveis frescas de 86 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico foram coletadas. Destas, 63 foram avaliadas para expressão gênica de genes-chave da HRR (RT-PCR) e status da via de reparo de malpareamento (MMR) (imuno-histoquímica). Foram exploradas as associações entre os dados moleculares e clinicopatológicos e o seu valor prognóstico em relação à sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG) através da regressão de Cox. **Resultados:** Cinco dos sete principais genes HRR representativos foram

expressos diferencialmente - *MRE11A*, *RAD50*, *BARD1*, *BRCA1* e *PALB2*. Apenas a deficiência de *MRE11A* foi confirmada como um preditor independente de SG (HR: 5,48, IC 95% [1,26 - 19,04] $p = 0,032$). O status *MRE11A* foi identificado como um fator prognóstico independente em tumores com MMR proficiente (pMMR) (HR = 3,48 [IC 95% 1,97 - 12,45], $p = 0,035$), mas não MMR deficiente (dMMR). O maior tempo médio de SG foi observado em pacientes com *MRE11A* positivo/pMMR (64,1 meses), enquanto *MRE11A* positivo/dMMR apresentou a menor SG dentre os subgrupos (34,5 meses) avaliados. **Conclusões:** A expressão de *MRE11A* demonstrou-se um potencial preditor do prognóstico de CCR pMMR. Estes resultados podem fornecer racional para novas investigações de biomarcadores e abordagens terapêuticas direcionadas baseadas na expressão de *MRE11A* e no status de MMR.

Palavras-chave: câncer colorretal, reparo por recombinação homóloga, instabilidade de microssatélites, prognóstico.

ABSTRACT

Background: Colorectal cancer (CRC) still lacks of biomarkers to mitigate inconsistencies in staging and molecular targets to expand the therapeutic spectrum. Genomic analyzes from public databases have identified alterations in the DNA homologous recombination repair (HRR) pathway in up to 20% of CRC cases. The identification of HRR deficiency (HRD) – due to pathogenic mutations in core pathway genes, such as *BRCA1/2* and *PALB2* – have considerably changed the prognosis for several tumors, but not for CRC. Therefore, the characterization of HRR and its influence on CRC prognosis is crucial to pave the way for the development of biomarkers and new therapeutic targets. **Objective:** To evaluate the expression levels of key representative HRR genes in sporadic CRC and to investigate their prognostic value. **Methods:** Tumor specimens and matched healthy tissues from 86 patients with sporadic colorectal adenocarcinoma who underwent surgery were collected. Of these, 63 were assessed for gene expression of HRR key-components and MMR status. We explored the correlations of HRR gene expression with clinicopathological features, progression-free survival (PFS), and overall survival (OS). **Results:** Five of seven key representative HRR genes were differentially expressed - *MRE11A*, *RAD50*, *BARD1*, *BRCA1*, and *PALB2*. Only *MRE11A* deficiency was confirmed as an independent predictor of OS (HR: 5.48, IC 95% [1.26 - 19.04] p= 0.032). *MRE11A* status was identified as an independent prognostic factor in proficient MMR (pMMR) CRC (HR= 3.48 [IC 95% 1.97 – 12.45], p= 0.035), but not in dMMR. Longest mean OS was observed in *MRE11A* positive/pMMR patients (64.1 months), while *MRE11A* positive/dMMR presented the shortest OS across subgroups (34.5 months). **Conclusions:** *MRE11A* expression is a potential predictor of pMMR CRC prognosis.

These results may provide a rational for further investigations of novel biomarkers and therapeutic approaches based on MRE11 targeting for CRC.

Keywords: colorectal cancer; homologous recombination repair; inflammation-based scores; prognosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definições de T, N e M para tumores de cólon e reto.	34
Tabela 2: Classificação TNM e grupos prognósticos do câncer de colorretal.	35
Tabela 3: Drogas aprovadas para o tratamento do câncer colorretal	37
Tabela 4: Mutações e alterações epigenéticas em genes das vias de resposta a danos no DNA e genes de reparo do DNA relatadas no The Cancer Genome Atlas/ PanCancer Atlas.....	57
Tabela 5: Padrões de perda de expressão de proteínas identificadas através da imunohistoquímica.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxas padronizadas por idade de incidência específica por região por sexo para cânceres do cólon (A) e do reto (B) (incluindo ânus) em 2020	21
Figura 2: Incidência e mortalidade ajustada pela idade em países com Índices de Desenvolvimento Humano alto/muito alto versus médio/baixo de acordo com o sexo.	24
Figura 3: Principais fatores de risco associados ao câncer colorretal	26
Figura 4: Sequência adenoma-carcinoma.....	31
Figura 5. Esquemas de tratamento empregados no tratamento do CCR metastático de acordo com o subtipo molecular	42
Figura 6. Principais vias envolvidas no reparo de danos ao DNA e seu papel na biologia celular	56
Figura 7. Visão esquemática da via de reparo de malpareamento do DNA	61
Figura 8. Visão esquemática da via de reparo do DNA por Recombinação Homóloga	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU/LV: 5-fluoracil/leucovorina

5-FU: 5-fluoracil

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

alt-EJ: do inglês, *alternative end joining*

APC: do inglês, *Adenomatous Polyposis Coli*

ATM: do inglês, *ATM serine/threonine kinase*

ATR: do inglês, *ataxia telangiectasia and Rad3 related*

BARD1: do inglês, *BRCA1 associated RING domain 1*

BAX: do inglês, *Bcl-2 Associated X-protein*

BER: do inglês, *base excision repair*

BRAF: do inglês, *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*

BRCA: do inglês, *breast cancer gene*

CAPOX: capecitabine, oxaliplatina

CCR: câncer colorretal

CCRm: câncer colorretal metastático

CDC4: do inglês, *cell division control protein 4*

CEA: do inglês, *carcinoembryonic antigen*

CIMP: do inglês, *CpG island methylator phenotype*

CIN: do inglês, *chromosomal instability*

CMS: do inglês, *Colorectal Molecular Subtypes*

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

COAD: do inglês, *code colon adenocarcinoma*

DCC: do inglês: *deleted in colorectal carcinoma*

DDR: do inglês: *DNA damage response*

dMMR: deficiente em *mismatch repair*

DNA - do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DSB: do inglês, *double strand breaks*

DSBR, do inglês: *double strand break repair*

EGFR: do inglês, *epidermal growth factor receptor*

EMAST: do inglês, *elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats*

EPCAM: do inglês, *epithelial cellular adhesion molecule*

ERBB2: *do inglês, receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 precursor*

ERCC4: do inglês, *ERCC excision repair 4 gene*

EXO1: do inglês, *exonuclease 1*

FANCA: do inglês, *FA complementation group A*

FANCC: *do inglês, Fanconi anaemia complementation group C*

FDA: do inglês, *Food and Drug Administration*

FOLFIRI: leucovorin, 5-Fluorouracil, irinotecano

FOLFOX: leucovorin, 5-Fluorouracil, oxaplatina

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

HR: do inglês, *hazard ratio*

HRD: do inglês, *homologous recombination deficiency*

HRR: do inglês, *Homologous Recombination Repair*

IGF2R: do inglês, *insulin like growth factor 2 receptor*

INCA: Instituto Nacional do Câncer

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

LOH: do inglês: *Loss of Heterozygosity*

MAP: polipose associada ao *MUTYH*

MCC: do inglês: *MCC regulator of WNT signaling pathway*

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

MHCCR: metástases hepáticas de câncer colorretal

MLH1: do inglês, *MutL homolog 1*

MLH3: do inglês, *MutL homolog 3*

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

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

MMR: do inglês, *mismatch repair*

MMR: do inglês, *mismatch repair*

MMR-D: do inglês, *mismatch repair deficiency*

MRE11A: do inglês, *double-strand break repair protein MRE11*

MSH2: do inglês, *MutS homolog 2*

MSH3: do inglês, *MutS homolog 3*

MSH6: do inglês, *MutS homolog 6*

MSI: do inglês, *microsatellite instability*

MSI-H: do inglês, *microsatellite instability high*

MSS: do inglês, *microsatellite stable*

MUTYH: do inglês, *mutY DNA glycosylase*

NBN: do inglês, *Nijmegen breakage syndrome*

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*

NER: do inglês, *nucleotide excision repair*

NGS: do inglês, *next generation sequencing*

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

NK: do inglês, *Natural Killers*

NRAS: do inglês, *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*

PAF: polipose adenomatosa familiar

PALB2: do inglês, *partner and localizer of BRCA2*

PAR: do inglês, *poly (ADP-ribose)*

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

PARPi: do inglês, *PARP Inhibitor*

PAXIP1: do inglês, *PAX interacting protein 1*

PCNA: do inglês, *proliferating cell nuclear antigen*

PCR: do inglês, *polymerase chain reaction*

PD1: do inglês, *programmed 1*

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

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

PIK3CA: do inglês, *phosphatidylinositol-5-Biphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

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

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

Pol δ: DNA polimerase delta

POLE: DNA polimerase-ε

Polβ: DNA polymerase β

RAD21L1: do inglês, *double-strand-break repair protein rad21-like protein 1*

RAD50: do inglês, *double strand break repair protein*

RAD51: do inglês, *DNA repair protein RAD51 homolog 1*

RAD51B: *do inglês, RAD51 paralog B*

RAD51C: do inglês, *RAD51 homolog 3*

RAS: do ingles, *reticular activating system*

READ: do inglês, *rectum adenocarcinoma*

RFC: do inglês, *replication factor C*

SG: sobrevivida global

SMAD2: do inglês: *SMAD family member 2*

SMAD4: do inglês: *SMAD family member 4*

SSA: do inglês, *single strand annealing*

SSB: do inglês, *single strand breaks*

SSR: do inglês, *short sequence repeats*

STR: do inglês, *short tandem repeats*

TCGA: do inglês, *The Cancer Genome Atlas*

TGFBR2: do inglês, *transforming growth factor, beta receptor II*

TGF β : do inglês, *transforming growth factor*

TIL: do inglês, *tumor infiltrating lymphocytes*

TLS: do inglês, *translesion synthesis*

TNM: do inglês, *tumor-node-metastasis*

TP53: do inglês, *tumor protein p53*

TP53BP1: do inglês, *tumor protein P53 binding protein 1*

VEGF: do inglês, *vascular endothelial growth factor*

WEE1: do inglês, *WEE1-like protein kinase*

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

XRCC2: do inglês, *X-ray repair cross-complementing protein 2*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Epidemiologia do câncer colorretal	20
1.2	Etiologia do câncer colorretal	25
1.2.1	Aspectos clínicos.....	25
1.2.2	Aspectos moleculares.....	28
1.3	Estadiamento do câncer colorretal	33
1.4	Bases terapêuticas do CCR	37
1.4.1	Tratamento da doença inicial e localmente avançada.....	39
1.4.2	Tratamento da doença metastática.....	41
1.5	Aspectos prognósticos	44
1.5.1	Clínicos.....	44
1.5.2	Moleculares.....	48
1.6	Sistemas de Reparo do DNA	54
1.6.1	Via de reparo de malpareamento do DNA.....	59
1.6.2	Via de reparo do DNA por recombinação homóloga (HRR).....	68
2	JUSTIFICATIVA	76
3	OBJETIVOS	79
3.2	Objetivo Geral.....	79
3.3	Objetivos Específicos.....	79
4.	REFERÊNCIAS	80
5.	ARTIGO CIENTÍFICO	94
6.	CONCLUSÕES	131
7.	ANEXOS	133

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum em homens e o segundo câncer mais comum em mulheres. Foram diagnosticados mais de 1,9 milhões de novos casos em 2020 (ARNOLD, M. *et al.*, 2017; BRAY *et al.*, 2021). O CCR responde como a segunda causa mais comum de morte por câncer, sendo responsável por quase 935.000 mortes por câncer. Globalmente, é um dos cânceres cuja incidência é crescente, compreendendo 11% de todos os diagnósticos de câncer (DOUAIHER *et al.*, 2017). De acordo com os dados do *Global Cancer Statistics* (GLOBOCAN) 2020, existe uma ampla variação geográfica na incidência e mortalidade do CCR entre vários países do mundo (SUNG *et al.*, 2021). Estima-se que até o ano de 2035, o número total de mortes por câncer retal e de cólon aumentará em 60% e 71,5%, respectivamente. Esses números podem variar de país para país, dependendo do grau de desenvolvimento econômico (DOUAIHER *et al.*, 2017) **(Figura 1)**

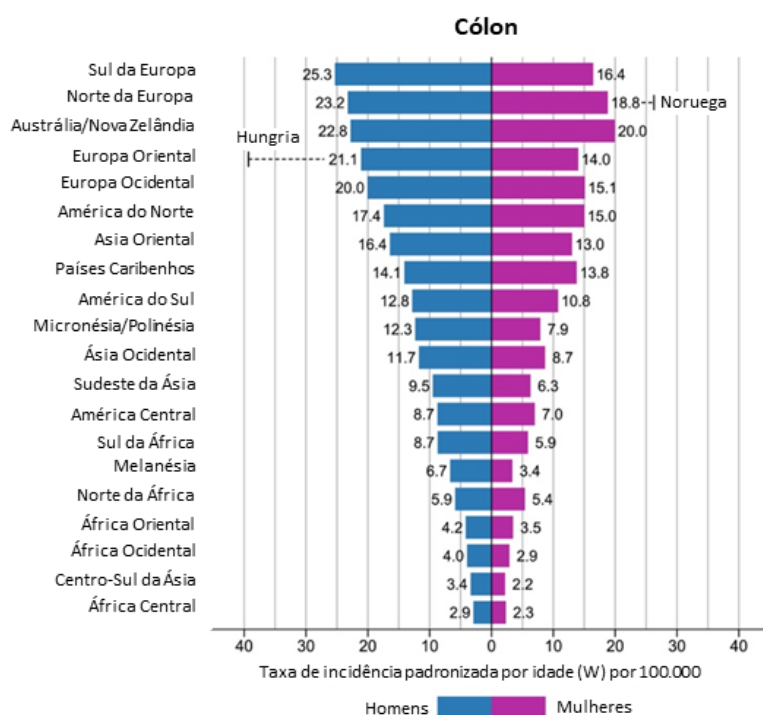
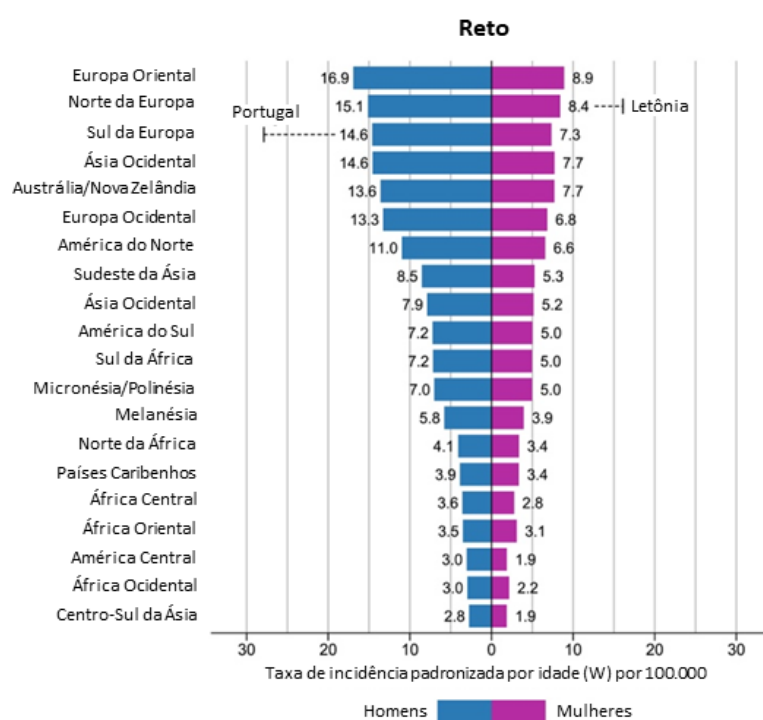
A**B**

Figura 1: Taxas padronizadas por idade de incidência específica por região por sexo para cânceres do cólon (A) e do reto (B) (incluindo ânus) em 2020. Fonte: GLOBOCAN 2020 (Adaptado de SUNG et al., 2021).

No Brasil, estima-se que 40.990 novos casos de CCR ocorram em 2020, sendo 20.520 em homens e 20.470 em mulheres, sendo o segundo tipo de câncer mais comum em ambos os sexos (não contando o melanoma). Os estados da região sul são classificados como de elevada incidência para CCR. Para o ano de 2020, estima-se que o Estado do Rio Grande do Sul (RS) apresente 2.540 novos casos de CCR, sendo 1.300 (23,20/100 mil) em homens e 1.240 (21,31/100 mil) em mulheres. Para a capital do RS, Porto Alegre, são estimados 420 novos casos, divididos igualmente entre os dois sexos (INCA/ MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2019).

A incidência de câncer colorretal, que vinha diminuindo desde meados da década de 1980, apresenta-se ascendente desde os anos 2000, em grande parte devido à adoção do rastreamento da doença através do exame de colonoscopia. Entretanto, entre 2013 e 2017, a taxa de incidência diminuiu cerca de 1% ao ano. Esta tendência reflete o aumento da expectativa de vida e, conseqüentemente, o aumento do número de casos de CCR em adultos mais velhos, os quais apresentam as maiores taxas. Concomitantemente, as taxas de incidência nesta população mascaram o aumento da incidência entre adultos jovens desde, pelo menos, meados da década de 1990. Por exemplo, um estudo recente baseado em dados nacionais demonstrou um aumento anual a partir de 2012 até 2016 de 2% em indivíduos com menos de 50 anos e 1% nos indivíduos entre 50-64 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

Sabe-se que o aumento mais pronunciado na incidência e mortalidade do CCR ocorre em países com índice de desenvolvimento humano médio e alto que estão adotando o modo de vida “ocidental” (WONG *et al.*, 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Países mais desenvolvidos apresentam o maior risco de câncer de cólon. Portanto, o CCR é considerado uma doença de países desenvolvidos com um estilo de vida ocidental (**Figura 2**). Fatores de risco clássicos e que

sabidamente influenciam na expectativa de vida na população em geral, incluindo comportamentos relacionados à saúde e fatores sociais (educação, renda e gastos do governo com saúde), impactam profundamente o desenvolvimento do CCR (MURPHY *et al.*, 2019).

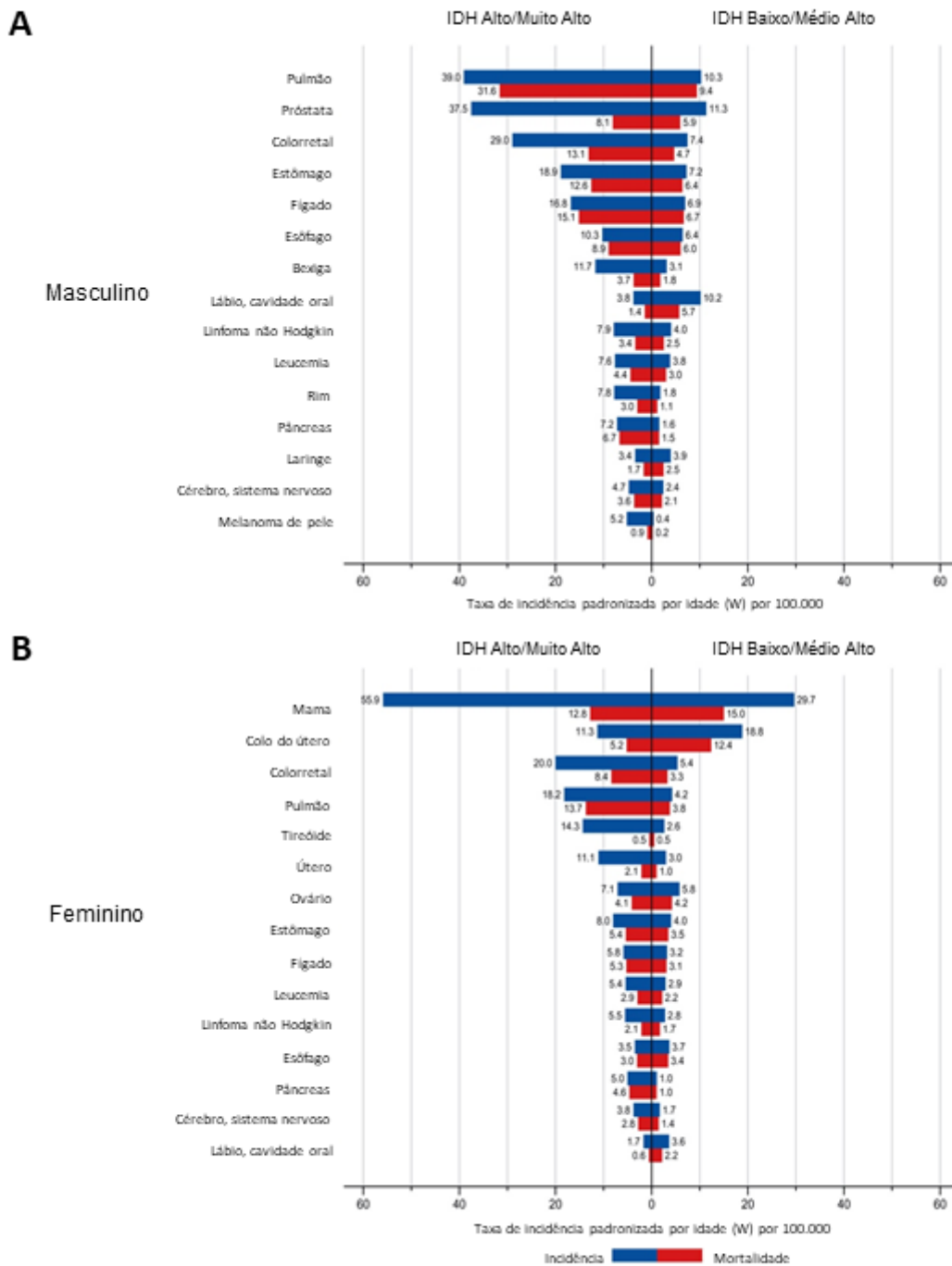


Figura 2: Incidência e mortalidade ajustada pela idade em países com Índices de Desenvolvimento Humano alto/muito alto versus médio/baixo de acordo com o sexo. Fonte: GLOBOCAN 2020 (Adaptado de SUNG et al., 2021).

Nos próximos anos, estima-se que a incidência de CCR irá aumentar em cerca de 60%, sendo diagnosticados mais de 2,2 milhões de novos casos, enquanto estima-se que até 2030, ocorrerão cerca de 1,1 milhão de mortes por esta doença. Este significativo aumento estará associado diretamente ao desenvolvimento econômico, particularmente à uma transição econômica de baixos para médios índices de desenvolvimento humano em diversos países, bem como às alterações nas pirâmides etárias nos países desenvolvidos. Diversos estudos demonstram que este aumento também está atrelado às alterações no estilo de vida das populações, como aumento do sedentarismo, da obesidade, do consumo de alimentos ultraprocessados e de carne vermelha e na expectativa de vida global (BRAY *et al.*, 2021; SAWICKI *et al.*, 2021; WONG *et al.*, 2021).

A taxa de mortalidade por câncer colorretal caiu 55%, de 29,2 (por 100000 habitantes) em 1970 para 13,1 em 2018, principalmente devido à detecção precoce por meio dos programas de rastreamento e dos avanços terapêuticos. De 2014 à 2018, a taxa de mortalidade diminuiu quase 2% ao ano; semelhante às tendências relacionadas à incidência. No entanto, esse progresso encobre o aumento da mortalidade em adultos com menos de 55 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

1.2 Etiologia do câncer colorretal

1.2.1 Aspectos clínicos

Diversos fatores já foram descritos pela sua associação direta e independente com o desenvolvimento do CCR (**Figura 3**) (JOHNSON *et al.*, 2013). Dentre eles, o

estilo de vida possui um papel central na etiologia clínica do CCR, e cerca de 55% dos casos de CCR são potencialmente atribuíveis a fatores de risco modificáveis. Sedentarismo ou inatividade física, sobrepeso ou obesidade, tabagismo, etilismo e padrões dietéticos inadequados (dietas pobres em fibras, frutas, vegetais e cálcio e ricas em carne vermelha e ultraprocessada) aumentam o risco de desenvolvimento de CCR de forma independente (SAWICKI *et al.*, 2021).

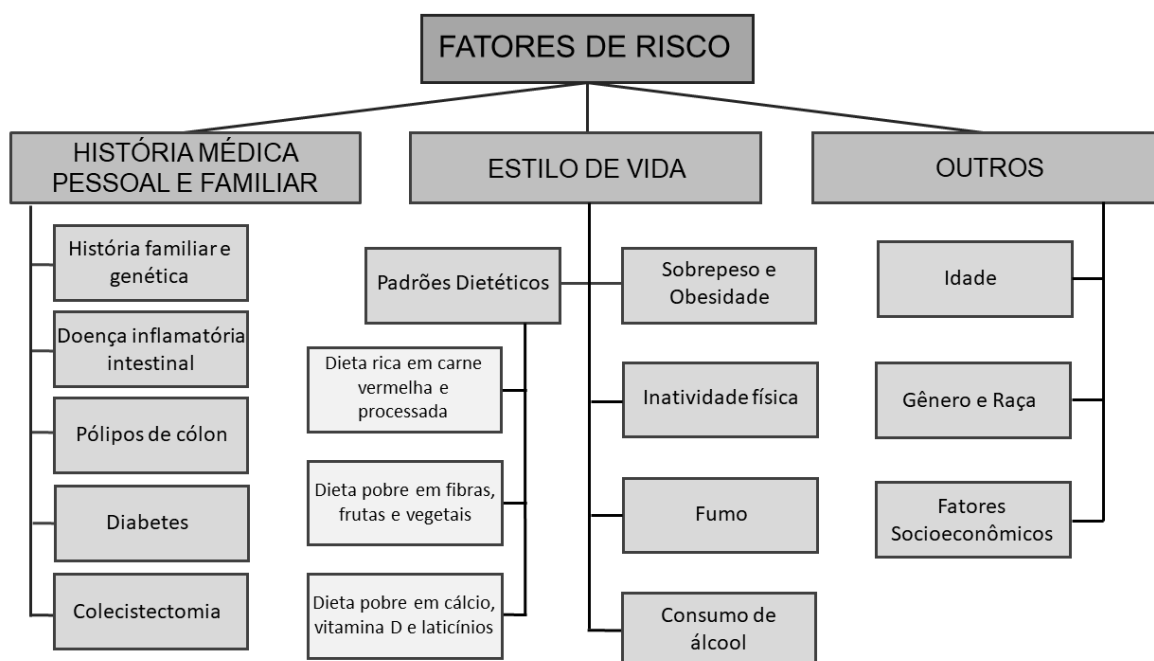


Figura 3: Principais fatores de risco associados ao câncer colorretal. (Adaptado de SAWICKI *et al.*, 2021)

Homens e mulheres com sobrepeso/obesidade têm risco cerca de 50% e 20% maior de desenvolver CCR em comparação com pessoas com peso normal, respectivamente (BYRD *et al.*, 2021; SHAW *et al.*, 2018). Estima-se que um risco geral de CCR aumenta em 3% para cada cinco quilos de ganho de peso. Ainda no âmbito metabólico, indivíduos com diabetes tipo 2 têm risco cerca de duas a três vezes maior de desenvolver CCR em comparação com a população não diabética (PEETERS *et*

al., 2015; RAWLA; SUNKARA; BARSOUK, 2009). Dentre os fatores modificáveis, tanto o alto consumo de fibra alimentar quanto a prática regular de atividade física podem reduzir o risco de desenvolvimento de CCR em até 50%(BYRD *et al.*, 2021).

Fatores não modificáveis como parentes com histórico de CCR, idade, gênero, raça, doenças inflamatórias intestinais e realização prévia de colecistectomia também influenciam diretamente no risco de CCR (ZHAO *et al.*, 2012). Devido ao fato de que cerca de 90% de todos os novos casos de câncer colorretal ocorrendo em indivíduos com mais de 50 anos, a idade avançada é considerada um dos fatores mais significativos que influenciam o risco de desenvolver câncer colorretal. Estima-se que indivíduos após os 65 anos de idade têm um risco cerca de três vezes maior de desenvolver CCR em comparação com aquelas na idade de 50-64 anos e um risco cerca de 30 vezes maior do que as pessoas na idade de 25-49 (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019; RAWLA; SUNKARA; BARSOUK, 2009). Homens têm um risco cerca de 30% maior de desenvolver câncer colorretal em comparação às mulheres. Além disso, os homens que são diagnosticados com câncer colorretal têm um pior prognóstico e mortalidade cerca de 40% maior em comparação com as mulheres.

A incidência de CCR também varia substancialmente por raça. Os indivíduos negros não-hispânicos apresentam uma das maiores taxas de incidência de todos os grupos raciais. Estima-se que a taxa de incidência de CCR em negros não-hispânicos é aproximadamente 50% maior do que em asiáticos e cerca de 20% maior do que em caucasianos não-hispânicos (ELLIS *et al.*, 2018; RAWLA; SUNKARA; BARSOUK, 2009).

Devido ao fato de que a inflamação crônica aumenta o risco de desenvolver CCR em comparação com indivíduos saudáveis, os indivíduos com doenças inflamatórias intestinais como colite ulcerativa e doença de Crohn têm cerca de 2 a 6

vezes maiores de risco da doença de desenvolver CCR. Além disso, o risco de CCR aumenta com a duração da doença inflamatória intestinal, a sua extensão anatômica e a gravidade da doença (KELLER *et al.*, 2019).

1.2.2 Aspectos moleculares

É possível diferenciar as etapas de desenvolvimento do CCR em três momentos: iniciação, promoção e progressão. A iniciação envolve a aquisição de um dano genômico irreversível, que predispõe as células epiteliais da mucosa intestinal afetadas à subsequente transformação neoplásica. Na fase de promoção, as células com alterações oncogênicas persistentes se multiplicam, gerando um crescimento tecidual diferenciado. No estágio de progressão, com o acúmulo de mais mutações oncogênicas, as células adquirem características agressivas e desenvolvem o seu potencial invasor e metastático (NGUYEN; GOEL; CHUNG, 2020).

Uma parte crucial da carcinogênese do CCR é a presença de uma lesão precursora benigna ou pólipos (definido como crescimento anormal na mucosa do cólon crescendo em seu lúmen). Outros tipos de lesão identificada na luz do intestino grosso, como os pólipos adenomatosos e pólipos serrilhados, são precursores diretos da maioria dos tumores colorretais (NGUYEN; GOEL; CHUNG, 2020). Os adenomas avançados (≥ 1 cm de diâmetro) apresentam um risco significativamente maior de malignização (de 30 a 50%) do que os adenomas não avançados (1%) (CONTEDEUCA *et al.*, 2013). As outras alterações na parede intestinal representam um grupo de lesões heterogêneas, que incluem: pólipos hiperplásicos, adenoma serrilhado tradicional, adenoma serrilhado séssil e pólipos mistos. Eles combinam a aparência morfológica dentada de pólipos hiperplásicos e as características displásicas de

adenomas. Essas alterações são precursoras de aproximadamente 10-15% do CCR esporádico (AUST; BARETTON, 2010).

O processo de carcinogênese do CCR leva de 10 a 15 anos e inicia-se com uma leve inflamação, passando pelo desenvolvimento de pólipos adenomatosos no epitélio e culminando no desenvolvimento do adenocarcinoma (FEARON; VOGELSTEIN, 1990). Os adenocarcinomas colorretais constituem cerca de 90% dos casos de CCR, desenvolvendo-se através da malignização de células epiteliais glandulares do intestino grosso, compreendendo o cólon e o reto (FLEMING *et al.*, 2012).

Aproximadamente 5% de todos os casos de CCR são causados por mutações germinativas em alguns genes-chave, levando a um aumento extremamente elevado desenvolvimento de tumores colorretais ao longo da vida. Aproximadamente 20% dos 95% restantes dos casos de CCR apresentam história familiar positiva, o que não pode ser considerado uma forma hereditária verdadeira de CCR. Entre 75-80% de todos os casos de CCR são esporádicos, os quais desenvolvem-se na ausência de histórico familiar da doença e de mutações germinativas.

O CCR hereditário pode ocorrer sem polipose (HNPCC, do inglês: *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*), ou através da polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês: *Familial Adenomatous Polyposis*), as quais podem ser induzidas através de mutações germinativas nos genes *APC* (do inglês, *Adenomatous Polyposis Coli*), *MUTYH* (do inglês, *mutY DNA glycosylase*) e nos genes da via reparo malpareamento do DNA (MMR, do inglês: *Mismatch Repair*) (KASTRINOS; SYNGAL, 2011; KUIPERS *et al.*, 2015).

A HNPCC é a síndrome hereditária de CCR mais comum, representando 2-3% de todos os pacientes com CRC. É uma síndrome autossômica dominante, associada

à presença de variantes patogênicas dos genes *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* e *PMS2* em células germinativas (AL-SOHAILY *et al.*, 2012; BOLAND; GOEL, 2010; DE LA CHAPELLE, 2004). Mutações em um destes genes resultam em deficiência na via MMR (dMMR), culminando na presença de instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês: *Microsatellite Instability*). O MMR corrige pareamentos errôneos de bases que ocorrem durante a replicação e recombinação do DNA e desempenha um papel crítico em garantir que essas mutações não sejam propagadas para células filhas. A MSI, por sua vez é um fenótipo molecular de hipermutabilidade causado pela perda da atividade do MMR. Este fenótipo é visto em 95% dos pacientes com HNPCC (TAMURA *et al.*, 2019).

A FAP, por sua vez, é uma síndrome autossômica dominante causada por mutações germinativas no gene *APC*, o qual codifica uma proteína que regula a degradação citoplasmática da β -catenina. Essas duas moléculas são componentes essenciais da via de sinalização Wnt (AGHABOZORGI *et al.*, 2019). Existem outras formas raras de CCR familiar, como a polipose associada à *MUTYH* (MAP, do inglês: *MUTYH-Associated Polyposis*), uma doença autossômica recessiva causada por mutações bialélicas no gene *MUTYH*, e as síndromes hamartosas (EL BALLI; BAKKACH; BENNANI MECHITA, 2021).

O desenvolvimento do CRC esporádico envolve três vias moleculares causadas por aberrações genéticas e epigenéticas: 1) Instabilidade cromossômica (CIN, do inglês *Chromosomal Instability*); 2) fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP, do inglês *CpG Island Methylator Phenotype*); e 3) instabilidade de microssatélites (Figura 4).

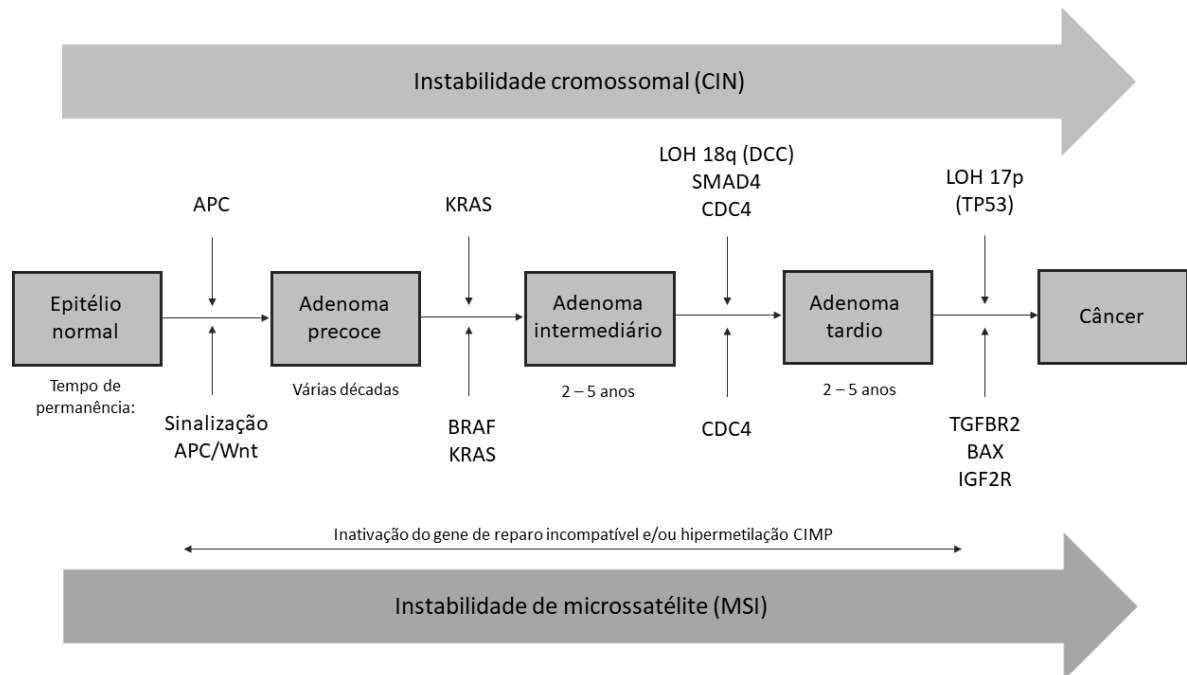


Figura 4: Sequência adenoma-carcinoma. (Adaptado de NGUYEN; GOEL; CHUNG, 2020). APC, do inglês, Adenomatous Polyposis Coli; KRAS, do inglês, *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; BRAF, do inglês, *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*; LOH, do inglês, *loss of heterozygosity*; DCC, do inglês, *netrin 1 receptor*; SMAD4: do inglês: *SMAD family member 4*; CDC4, do inglês, *cell division control protein 4*; TP53, do inglês, *tumor protein p53*; TGFBR2, do inglês, *transforming growth factor, beta receptor II*; BAX, do inglês, *Bcl-2 Associated X-protein*; IGF2R: do inglês, *insulin like growth factor 2 receptor*.

A maioria dos casos esporádicos de CCR (70-85%) é decorrente de CIN, a qual também é conhecida como sequência adenoma-carcinoma e segue uma progressão previsível de alterações genéticas e histológicas correspondentes (ARMAGHANY *et al.*, 2012; FEARON; VOGELSTEIN, 1990). A CIN é caracterizada por alterações no número de cópias, inserções e deleções de (*indels*), translocações, ampliações e perda de heterozigidade (LOH, do inglês: *Loss of Heterozygosity*). Essas anormalidades surgem como resultado de disfunções em mecanismos que regulam a segregação cromossômica, a viabilidade dos telômeros e a maquinaria de resposta a

danos no DNA (DDR, do inglês: *DNA Damage Response*) (NGUYEN; GOEL; CHUNG, 2020). As alterações genômicas incluem a ativação de proto-oncogenes, especialmente, RAS (do inglês, *Rat Sarcoma Virus*) e a inativação de pelo menos três genes de supressão tumoral: perda de *APC* (região cromossômica 5q21), perda de *TP53* (do inglês: *Tumor Protein P53*) (região cromossômica 17p13) e perda de heterozigidade no braço longo do cromossomo 18 (18q LOH), afetando os genes *SMAD2* (do inglês: *SMAD Family Member 2*) , *SMAD4* (do inglês: *SMAD Family Member 4*) e *DCC* (do inglês: *Deleted In Colorectal Carcinoma*), responsáveis pela regulação da apoptose e da sinalização via TGF- β (do inglês: *Transforming Growth Fator Beta*) (EL BALI; BAKKACH; BENNANI MECHITA, 2021; PINO; CHUNG, 2010).

A MSI, outro tipo de instabilidade genômica, é responsável por cerca de 15% - 20% dos casos de CCR esporádico (NGUYEN; GOEL; CHUNG, 2020). No CCR esporádico, dMMR decorre da hipermetilação também esporádica adquirida do promotor do gene *hMLH1* (do inglês: *Human Mutl Homolog 1*), frequentemente observada em tumores com CIMP (BOLAND; GOEL, 2010). Com a crescente compreensão no que diz respeito ao envolvimento de fatores epigenéticos e a identificação de subgrupos de pólipos e tumores, surgiu a terceira via de instabilidade genômica, a CIMP (TAMURA *et al.*, 2019).

A metilação de ilhas CpG é um evento epigenético típico na carcinogênese colorretal, sendo responsável por 20% dos casos de CCR esporádico (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015). Ocorre geralmente por hipermetilação do DNA no dinucleotídeo 5'-CG-3' (CpG) na região promotora, resultando no silenciamento e perda da função de alguns genes supressores de tumor, como *hMLH1*, *APC*, *MCC* (do inglês: *MCC regulator of WNT signaling pathway*), *MGMT* (do inglês: *O-6-*

methylguanine-DNA methyltransferase), entre outros (DANESE; MONTAGNANA, 2017).

1.3 Estadiamento do câncer colorretal

As principais diretrizes recomendam o rastreamento de rotina para o CCR e pólipos adenomatosos em adultos assintomáticos. Contudo, elas diferem em relação à frequência do rastreamento e à idade para descontinuí-lo, bem como em relação ao método de rastreamento preferido (BENSON *et al.*, 2021; VAN CUTSEM *et al.*, 2016) Embora a idade habitual para iniciar o rastreamento em pessoas com risco médio seja 50 anos, o aumento da incidência de câncer colorretal em pessoas mais jovens levou várias organizações a reduzir a idade inicial recomendada para 45 anos. Atualmente, o *American College of Gastroenterology* recomenda a triagem do CCR através de colonoscopia e pesquisa de sangue oculto nas fezes em indivíduos de risco médio entre as idades de 50 e 75 anos para reduzir a incidência de adenoma avançado, CCR e mortalidade por esta neoplasia (SHAUKAT *et al.*, 2021).

O CCR é geralmente estadiado após a exploração cirúrgica do abdômen e realização do exame histopatológico da peça cirúrgica. O estadiamento do CCR é realizado através do sistema *Tumor-Node-Metastasis* (TNM) do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Este sistema diferencia os estágios da doença com base nas seguintes informações: tamanho do tumor e grau de invasividade do tumor (T), presença de metástases em linfonodos regionais (N) e de metástases à distância (M) (BENSON *et al.*, 2021). As categorias do estadiamento TNM refletem resultados de sobrevida muito semelhantes para as neoplasias de cólon e reto. Portanto, estes tumores compartilham o mesmo sistema de estadiamento (**Tabela 1**). Serão também

avaliados o estado das margens cirúrgicas; a presença de invasão linfovascular; invasão perineural e depósitos tumorais (BENSON *et al.*, 2021).

Tabela 1: Definições de T, N e M para tumores de cólon e reto.

T	Tumor primário	N	Linfonodo Regionais
TX	Tumor não avaliável	NX	Linfonodos regionais não avaliáveis
T0	Sem evidência de tumor primário	N0	Sem metástases linfonodais
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial ou com invasão de lâmina própria	N1	Metástases em um a três linfonodos regionais
T1	Tumor infiltra a submucosa	N1a	Metástase em um linfonodo regional
T2	Tumor infiltra a muscular própria	N1b	Metástase em dois a três linfonodos regionais
T3	Tumor se infiltra através da muscular própria até os tecidos pericólicas	N1c	Depósito de tumor (DT) na subserosa, no mesentério ou nos tecidos pericólicos não peritonizados ou perirretais, sem metástases linfonodais regionais
T4	Tumor invade ou adere em órgãos ou estruturas adjacentes	N2	Metástases em quatro ou mais linfonodos regionais
T4a	Tumor penetra a superfície do peritônio visceral	N2a	Metástases em quatro a seis linfonodos regionais
T4b	Tumor invade diretamente ou está aderido a outros órgãos ou estruturas	N2b	Metástases em sete ou mais linfonodos regionais
		M	Metástases a distância
		M0	Sem metástases a distância
		M1	Metástases em um ou mais órgãos/sítios a distância ou metástase peritoneal

Adaptado de (WEISER, 2018).

Na 8ª edição do *AJCC Staging Manual* (WEISER, 2018), os tumores T1 são os que envolvem a submucosa; os T2 penetram pela submucosa na muscular própria; os T3 penetram na muscular própria; e os T4 penetram diretamente na superfície do peritônio visceral e invadem diretamente outros órgãos ou estruturas. A classificação regional dos linfonodos (N) inclui 4 subcategorias de acordo com o número de linfonodos comprometidos pela presença de células neoplásicas (1, 2-3, 4-6 e 7 ou mais linfonodos positivos). A doença metastática é classificada como M1a quando as metástases são limitadas a um local/órgão sólido (incluindo linfonodos fora da área de drenagem regional do tumor primário). M1b refere-se à presença de metástases em

vários locais distantes ou órgãos sólidos. Na última edição da AJCC, a carcinomatose peritoneal foi incluída em uma classificação de doença metastática específica (M1c). (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação TNM e grupos prognósticos do câncer de colorretal.

Grupos Prognósticos			
	T	N	M
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio I	T1, T2	N0	M0
Estágio IIA	T3	N0	M0
Estágio IIB	T4a	N0	M0
Estágio IIC	T4b	N0	M0
Estágio IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
Estágio IIIB	T3-T4	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
Estágio IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
Estágio IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
Estágio IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b
Estágio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1c

Adaptado de (WEISER, 2018).

Apesar de ainda não incorporados nos critérios formais dos sistemas de estadiamento e classificação do CCR, fatores moleculares e biológicos são de suma importância para a conduta terapêutica desta doença. Entre eles, estão os níveis

séricos do antígeno carcinoembrionário (CEA, do inglês: *Carcinoembryonic Antigen*) no pré-operatório; o score de regressão do tumor, o qual reflete a resposta patológica ao tratamento neoadjuvante (quimioterapia, radioterapia ou ambos) e o status da margem circunferencial para o câncer retal; a presença de invasão linfovascular e perineural; e a presença de MSI e status mutacional de *KRAS* (do inglês: *V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*), *NRAS* (do inglês: *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*) e *BRAF* (do inglês: *V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B*).

A necessidade de identificação de fatores moleculares no CCR com valor prognóstico é ainda mais evidente entre pacientes diagnosticados com doença nos estágios IIB/IIC e IIIA. Para estes pacientes, o sistema TNM, mesmo quando associado a características clinicopatológicas ainda é considerado insuficiente na predição do prognóstico. Apesar de este sistema ser extremamente acurado para diversos tumores sólidos neste sentido, um paradoxo de sobrevivência pode ser observado entre tumores em estágio IIB/C (T4N0) e estágio IIIA (T1-2N1, T1N2a) em pacientes com CCR. Vários motivos foram relatados para justificar a sobrevivência inferior no estágio IIB/ IC em comparação com o estágio IIIA, como o menor uso de quimioterapia sistêmica em pacientes com câncer de cólon estágio IIB/IIC (CHU *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2020).

Uma tentativa de contornar esta discrepância sem expor o paciente a toxicidade da quimioterapia adjuvante sem benefício em relação à sobrevida foi a dicotomização do estágio II em tumores de baixo e alto risco de recorrência, já que todos os pacientes com doença em estágio III são referidos à quimioterapia adjuvante. Embora existam várias características tumorais que estão associadas a um pior prognóstico na doença em estágio II, não há uma definição padrão de CCR em estágio

II de alto risco de recorrência (BENSON *et al.*, 2021). Atualmente, qualquer uma das seguintes características seria considerada de alto risco de recorrência: invasão perineural, tumores de grau 3 (pouco diferenciados), estágio T4 (estágio IIB/IIC); perfuração intestinal, obstrução intestinal, tumores mucinosos, menos de 12 linfonodos examinados, margens cirúrgicas positivas (LEE; CHAN, 2018; ROMITI *et al.*, 2019). Mesmo assim, esta definição ainda é considerada insuficiente tanto na predição do prognóstico, quanto para uma decisão terapêutica acurada, uma vez que não considera a heterogeneidade intratumoral do CCR.

1.4 Bases terapêuticas do CCR

O tratamento padrão para pacientes com CCR inclui a resseção cirúrgica do tumor primário e de linfonodos regionais e estratégias locais (radioterapia) e/ou sistêmicas em regimes neoadjuvantes e/ou adjuvantes de acordo com o estadiamento da doença (**Tabela 3**).

Tabela 3: Drogas aprovadas para o tratamento do câncer colorretal

Nome	Classe terapêutica	Mecanismo de Ação	Uso típico
Leucovorina (LV)	Análogo do ácido folínico	Interrompe a síntese de DNA	Em combinação com 5-FU.
5-FU/ Capecitabina	Análogo da pirimidina	Interrompe a síntese de DNA	Em combinação com LV ou em monoterapia.
Irinotecano	Inibidor da Topoisomerase I	Impede religação do DNA se ligando ao complexo topoisomerase I-DNA, induzindo parada	Monoterapia ou em combinação com 5-FU, LV e oxaliplatina (FOLFIRI)

		replicativa e quebras duplas no DNA	
Oxaliplatina	Agente alquilante	Forma crosslinks no DNA inibindo síntese de DNA e transcrição	Combinação com 5-FU e LV (FOLFOX)
Cetuximabe/ Panitumumabe	Anticorpo monoclonal anti-EGFR	Inibição da via de sinalização de EGFR, inibindo diferenciação, proliferação e migração celular	Tumores com KRAS/NRAS selvagem
Bevacizumabe Ziv-aflibercept Ramucirumabe	Anticorpo monoclonal anti-VEGF	Antiangiogênese	Em combinação com FOLFOX ou FOLFIRI
Regorafenibe	Inibidor multiquinase	Inibição da proliferação celular e da angiogênese	Monoterapia
Pembrolizumabe Nivolumabe	Anticorpo monoclonal anti-PD-1	Ativação da resposta imune mediada pelas células T	Tumores com dMMR/MSI
Ipilimumabe	Anticorpo monoclonal anti-CTLA-4	Ativação da resposta imune mediada pelas células T	Em combinação com nivolumabe para tumores com dMMR/MSI
Encorafenibe	Inibidor de BRAF	Interrompe ou reduz a proliferação celular	Em combinação com cetuximabe para tumores com a mutação BRAF ^{V600E}

Abreviações: BRAF (proto-oncogene serina/treonina quinase); CRC (do inglês: *colorectal cancer*), CTLA-4 (antígeno linfócito citotóxico T associado); EGFR (receptor de fator de crescimento epitelial); FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*); MMR-D (reparo de malpareamento deficiente); MSI-H (do inglês: Microsatellite

instability-High); PD-1 (proteína de morte celular programada 1); VEGF (fator de crescimento endotelial vascular).

1.4.1 Tratamento da doença inicial e localmente avançada

O CCR inicial ou localizado compreende os estágios TNM I-III. Tumores colorretais diagnosticados em estágio I são referidos à cirurgia de ressecção e não é indicada a quimioterapia adjuvante.

Em contrapartida, a indicação de quimioterapia adjuvante para o CCR em estágio II ainda é largamente discutida (SARGENT; ANDRÉ; GROTHEY, 2016). A origem desta discussão reside nos estudos que demonstraram que a sobrevida livre de doença em 5 anos em pacientes com CCR em estágio II que não receberam terapia adjuvante foi de 81,4%, enquanto para aqueles em estágio III tratados com quimioterapia adjuvante foi de 79,3% (BÖCKELMAN *et al.*, 2015). Por outro lado, para pacientes com CCR em estágio III que receberam ou não quimioterapia adjuvante, a sobrevida livre de progressão em 5 anos foi de 63,6% e 49,0%, respectivamente. Esses resultados sugerem que o benefício da terapia adjuvante é maior em pacientes com maior risco devido ao estado nodal (QUASAR COLLABORATIVE GROUP *et al.*, 2007).

Estudos de base populacional já demonstraram que a quimioterapia adjuvante não apresenta benefícios em relação à sobrevida em 5 e 10 anos para pacientes com CCR em estágio II (DE GRAMONT *et al.*, 2010). Apesar de pacientes com alto risco serem tradicionalmente indicados à quimioterapia adjuvante, não há dados que respaldem que as características de alto risco sejam preditivas de benefício da quimioterapia adjuvante (VERHOEFF *et al.*, 2016). Esta controvérsia em torno da

administração de quimioterapia adjuvante a pacientes em estágio II de alto e baixo risco reforça a necessidade de identificação de novos marcadores, particularmente os moleculares, para estratificar o risco de recorrência da doença neste estágio e definir quem se beneficiará com a terapia adjuvante.

Mais recentemente, incorporou-se o status da via MMR na decisão terapêutica do CCR em estágio II. Para pacientes com CCR em estágio II e dMMR/MSI, não há indicação de quimioterapia adjuvante (KIM, J. E. *et al.*, 2015; RIBIC *et al.*, 2003; SARGENT *et al.*, 2010). Pacientes com doença de baixo risco em estágio II e pMMR/MSS podem ser apenas observados sem terapia adjuvante ou considerados para capecitabina ou 5-FU/leucovorina (5-FU/LV) (ANDRÉ *et al.*, 2015). Com base nos resultados do estudo MOSAIC e nas possíveis sequelas de longo prazo da quimioterapia à base de oxaliplatina, FOLFOX não é considerada uma opção de terapia adjuvante apropriada para estes pacientes (SHARIF *et al.*, 2008). Para aqueles com doença em estágio II com alto risco de recorrência e pMMR/MSS, é indicada a terapia adjuvante com 5-FU/LV, capecitabina ou FOLFOX, CAPEOX (capecitabina e oxaliplatina) ou apenas observação.

Em relação ao estágio III, também há uma subclassificação de risco, desta vez baseada nos estágios T e N. Baixo risco refere-se a tumores T1–3 e N1 e alto risco, a tumores T4 e N1–2 ou qualquer T e N2. De todo modo, a quimioterapia adjuvante sempre é indicada para estes pacientes e inclui, preferencialmente, os esquemas CAPEOX (capecitabina/oxaliplatina) ou FOLFOX, mas capecitabina em monoterapia ou 5-FU/LV também são consideradas opções para pacientes com restrições ou intolerância à oxaliplatina (BENSON *et al.*, 2021).

1.4.2 Tratamento da doença metastática

O CCR metastático (CCRm) consiste na presença de tumores identificados em um local distante após um tumor colorretal localizado (não metastático ou estágio I-III) tenha sido previamente tratado ou pode se apresentar *de novo* no estágio IV (RIIHIMÄKI *et al.*, 2016). Os locais mais comuns de metástase incluem linfonodo, fígado, pulmão e peritônio. Aproximadamente um terço dos pacientes diagnosticados com CCR desenvolvem metástases colorretais, sendo que 70-90% apresentarão doença hepática metastática irressecável (KOPETZ *et al.*, 2009). A ressecção cirúrgica é a abordagem padrão para o tratamento local da doença metastática ressecável. As lesões irressecáveis, por sua vez, podem ser convertidas a ressecáveis através de tratamento sistêmico perioperatório. Esta abordagem é destinada a pacientes com metástases restritas ao fígado ou ao pulmão e que, através do tratamento perioperatório, tenham as margens cirúrgicas da ressecção livres (R0) (ROCHA; HELTON, 2012).

Os princípios a serem considerados no tratamento do CCRm incluem, além dos aspectos clínicos, a pesquisa de biomarcadores preditivos e estratégias pré-planejadas para alterar a terapia na presença e ausência de progressão da doença. Os regimes terapêuticos sistêmicos incluem agentes quimioterápicos (5-FU, oxaliplatina e/ou irinotecano), terapias-alvo (anticorpos monoclonais anti-EGFR, anti-VEGF, anti-BRAF) e imunoterapia.

Para 50% dos pacientes com CRC metastático com tumores com *KRAS/NRAS* ou *BRAF* selvagens, cetuximabe e panitumumabe (anticorpos monoclonais para o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR, do inglês: *Epithelial Growth Factor Receptor*), em combinação com quimioterapia, podem estender a sobrevida média em

2 a 4 meses em comparação à quimioterapia isolada. No entanto, para 35% a 40% dos pacientes com variações de sequência de *KRAS/NRAS*, terapias direcionadas eficazes ainda não estão disponíveis. Para variações de sequência de 5% a 10% com a mutação *BRAF^{V600E}*, a terapia de combinação direcionada com inibidores de BRAF e EGFR estende a sobrevida global (SG) para 9,3 meses (versus 5,9 meses para aqueles que receberam quimioterapia padrão). Para os 5% com tumores dMMR/MSI, a imunoterapia pode ser usada na primeira linha ou na linha subsequente (BILLER; SCHRAG, 2021). O pembrolizumabe foi aprovado pela FDA em junho de 2020 para terapia de primeira linha, com base no estudo que demonstrou dobrar o tempo sobrevida livre de progressão para 16,5 meses (versus 8,2 meses dos pacientes que receberam FOLFIRI com ou sem bevacizumabe ou cetuximabe)(ANDRÉ *et al.*, 2020). Os principais esquemas de tratamento de acordo com o subtipo molecular do CCR metastático estão resumidos na **Figura 5**.

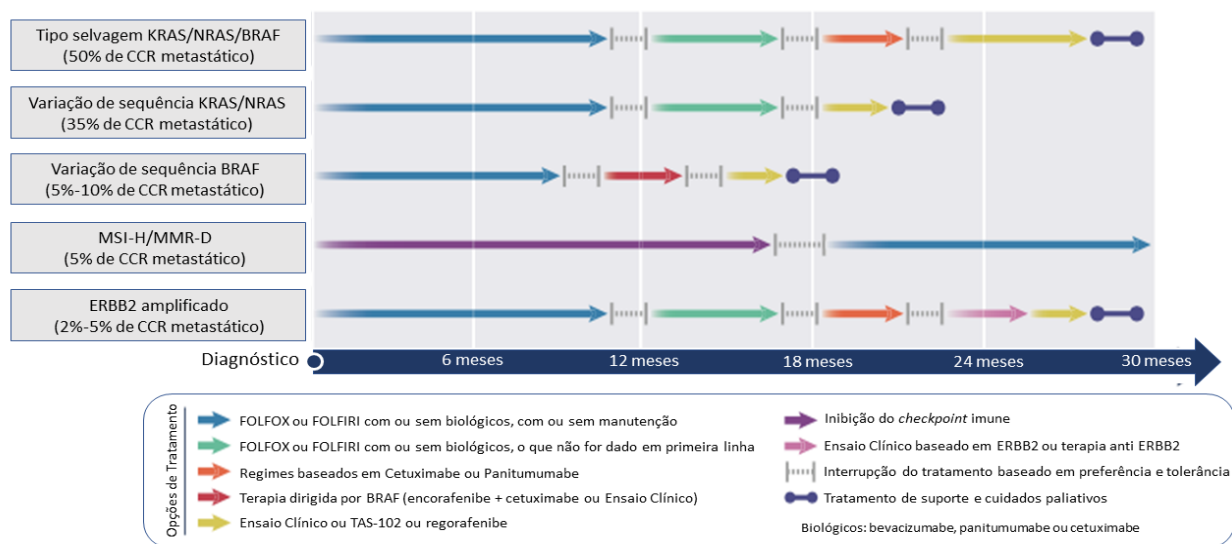


Figura 5. Esquemas de tratamento empregados no tratamento do CCR metastático de acordo com o subtipo molecular. (Adaptado de BILLER; SCHRAG, 2021). CCR, câncer colorretal; KRAS, do inglês, *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; NRAS, do inglês, *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*;

BRAF, do inglês, *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*; MSI-H: do inglês, *microsatellite instability high*; MMR-D, do inglês, *mismatch repair deficiency*; ERBB2: do inglês, *receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 precursor*; FOLFOX: leucovorin, 5-Fluorouracil e oxaplatina; FOLFIRI: leucovorin, 5-Fluorouracil e irinotecano.

Embora o prognóstico geral para CCRm ainda seja considerado pobre, com menos de 20% dos pacientes sobrevivendo além de 5 anos, os avanços no diagnóstico e tratamento do CCRm irressecável permitiram atendimento personalizado com base no perfil molecular do tumor com melhores resultados para alguns subtipos. Como resultado das melhores opções de tratamento, a sobrevida global de pacientes com CRCm aumentou de aproximadamente 1 ano na era da terapia 5-FU isoladamente, para aproximadamente 3 anos com as terapias atualmente disponíveis (KOPETZ *et al.*, 2009; XIE; CHEN; FANG, 2020). Enquanto a presença de MSI e a ausência de mutações ativadoras em *KRAS/RAS* e BRAF são empregadas como preditores de resposta à imunoterapia e terapias direcionadas a estas vias, respectivamente (VAN CUTSEM *et al.*, 2016), não há biomarcadores validados clinicamente para seleção dos pacientes que irão apresentar maior benefício dos agentes antiangiogênicos e citotóxicos do esquema FOLFIRI. Para estes pacientes, a resposta inicial ao tratamento não direcionado é ruim e, há desenvolvimento de resistência secundária a todas as terapias padrão (HAMMOND; SWAIKA; MODY, 2016). Adicionalmente, os mecanismos de resistência a agentes direcionados comumente incluem mutações reativadoras secundárias nas vias de sinalização afetadas e em outras vias (MISALE *et al.*, 2012; SIRAVEGNA *et al.*, 2015).

Assim, à medida que as opções de tratamento vêm se expandindo, um nível crescente de complexidade está se tornando aparente. No entanto, a maioria dos

pacientes com CCR atualmente não tem opções de terapia direcionadas disponíveis por apresentarem MSS, mutações em *RAS* e *BRAF* selvagem. Além destes, para subgrupos de tumores com mais de um alvo molecular, isto é, MSI e RAS selvagem, mas que também abrigam mutações *BRAF^{V600E}*, a melhor abordagem sistêmica ainda é desconhecida. A presença de várias alterações direcionáveis pode estender a gama de opções de tratamento quando confrontado com resistência, mas também enfatiza que não há evidências que suportem um sequenciamento de tratamento adequado (SVEEN; KOPETZ; LOTHE, 2020).

1.5 Aspectos prognósticos

1.5.1 Clínicos

O estado-da-arte do CCR sugere que o prognóstico desta doença depende intrinsecamente de inúmeras variáveis clínicas, patológicas, biológicas e, moleculares. Dentre elas, invasividade tumoral, exame de linfonodos regionais, presença de metástases linfonodais, presença de invasão angiolinfática, lateralidade do tumor primário, níveis de CEA ao diagnóstico da doença e inflamação sistêmica são apresentados na literatura pelo seu valor independente na predição do prognóstico de pacientes com CCR.

O componente T do estadiamento do CCR é muito importante no prognóstico, uma vez que os pacientes com tumores T4, N0 têm uma sobrevida menor do que aqueles com tumores T1-2 e N1-2 (HARI *et al.*, 2013; KIM, M. J. *et al.*, 2015). Dentro de cada estágio T, o tempo de sobrevida é inversamente associada ao número de linfonodos positivos (AMIN *et al.*, 2017).

Dois aspectos relacionados aos linfonodos são prognósticos no CCR: o número de linfonodos regionais ressecados e o número de linfonodos positivos. O maior número de linfonodos examinados está associado à maior SG tanto para pacientes com doença de linfonodo negativo quanto positivo (LE VOYER *et al.*, 2003). Além disso, os resultados de estudos de base populacional demonstram uma associação entre a melhora na sobrevida e exame de 12 ou mais linfonodos. Não há explicação clara para esta associação, mas além do fato de que o número de linfonodos ressecados varia com diversas características clínicas, foi sugerido que os linfonodos em pacientes com uma forte resposta imune antitumoral são mais fáceis de serem identificados, e que esses pacientes têm um prognóstico melhor (WONG, 2011). Outra possibilidade seria que a biologia do tumor subjacente afete o rendimento dos linfonodos e, conseqüentemente, o prognóstico. Por exemplo, a presença de MSI e/ou *KRAS/BRAF* selvagens estão associadas à uma recuperação de linfonodos superior e melhor prognóstico (BELT *et al.*, 2012; BERG *et al.*, 2013).

Outro ponto potencialmente relevante no prognóstico dos pacientes com CCR é a proporção de linfonodos positivos em relação ao número total de linfonodos examinados. Estudos de séries de casos sugeriram pontos de corte de 0,1, 0,2 ou 0,25 como prognósticos para SG ou sobrevida livre de progressão (SUGIMOTO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016). Uma revisão sistemática e metanálise de 33 estudos (> 75.000 pacientes com CCR linfonodo-positivo) concluiu que uma proporção de linfonodos mais alta associa-se a piores desfechos relacionados à sobrevida destes pacientes (ZHANG *et al.*, 2016).

A invasão linfática e a invasão perineural são processos de invasão de vasos e nervos, respectivamente, pelo tumor e ambas são consideradas preditores independentes de SG em pacientes com câncer colorretal (LIEBIG *et al.*, 2009).

Pacientes com tumores colorretais sem invasão perineural apresentam SG em 5 anos quatro vezes maior tanto em estágio II quanto em estágio III em relação a tumores com esta característica (KNIJN *et al.*, 2016). De maneira similar, uma metanálise que incluiu quase 10 mil pacientes, concluiu que a invasão linfática em tumores colorretais em estágio II e III aumenta o risco de óbito ou de progressão da doença em cerca de 2 vezes (YUAN *et al.*, 2017). Por isto, estas características são incluídas como fatores de alto risco para recorrência da doença em pacientes com CCR em estágio II, e contribuem para a decisão terapêutica de indicação de quimioterapia adjuvante para estes pacientes (REBUZZI *et al.*, 2020).

O CEA é um conhecido marcador biológico tumoral de baixo custo para o diagnóstico e monitoramento do CCR, e apresenta-se superexpresso em 90% dos casos (KONISHI *et al.*, 2018). Níveis elevados de CEA pré-operatório estão associados a um pior prognóstico em todos os pacientes com CCR em estágios I e II que não receberam quimioterapia adjuvante (THIRUNAVUKARASU *et al.*, 2011). O limite superior dos níveis normais de CEA varia entre as instituições e abrange valores entre 3,0-5,0 ng/mL, com um ponto de corte de 5,0 ng/mL utilizado pela maioria dos centros, embora esse valor ainda seja debatido. Recentemente, um estudo definiu que o valor de CEA pré-operatório até 2,35 ng/mL é o ponto de corte ideal para prever a sobrevida em pacientes com CCR nos estágios I e II (MARGALIT *et al.*, 2018). Similarmente, sugeriu-se que o CEA pré-operatório até 3 ng/mL é o melhor valor de corte para identificar pacientes com câncer de cólon em estágio III com baixo e alto risco de morte ou recorrência (KIM, C. G. *et al.*, 2017). Um forte valor prognóstico do nível de CEA pós-operatório também foi observado em duas grandes coortes de pacientes com CCR em estágio III tratados com quimioterapia adjuvante. Pacientes

com CEA > 5 ng/mL apresentaram maior risco para recorrência e óbito (AUCLIN *et al.*, 2019).

Embriologicamente, o cólon direito se desenvolve a partir do intestino médio, enquanto o cólon esquerdo se desenvolve a partir do intestino posterior. Essas diferentes origens, conseqüentemente, levam a perfis moleculares distintos (MISSIAGLIA *et al.*, 2014). Uma análise do banco de dados SEER (do inglês: *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*) que incluiu 163.232 pacientes com CCR revelou que 12% dos pacientes com tumores do lado direito tinham uma histologia mucinosa contra apenas 6% daqueles com tumores colorretais do lado esquerdo. Esta análise também relatou que os tumores do lado esquerdo eram mais prováveis de serem detectados em um tamanho de tumor menor do que os casos do lado direito (WANG; WANG; PING, 2015). Dentre os tumores colorretais em estágio I-III, tumores do lado direito apresentam maior SG e sobrevida livre de progressão em relação aos do lado esquerdo (WARSCHKOW *et al.*, 2016).

A literatura vem sugerindo também que a lateralidade do tumor no CCR é uma característica prognóstica independente e que é mais relevante à medida que a doença progride, refletindo uma possível diferença na biologia tumoral e na resposta à terapia. Os tumores do lado direito do cólon são mais propensos a ter MSI, associado a uma assinatura com mutações em *RAS* ou *BRAF*, enquanto os do lado esquerdo são mais propensos a estar associados à ativação das vias clássicas da sequência adenoma-carcinoma e estão associados à regulação positiva de EGFR e HER2 (do inglês, *human epidermal growth factor receptor-type 2*) (BAHL *et al.*, 2020).

É largamente reconhecido que a inflamação é uma marca registrada do câncer e está intimamente relacionada à progressão do tumor. A resposta à inflamação do hospedeiro pode suprimir a função antitumoral da imunidade adaptativa e romper o

equilíbrio entre o sistema imunológico e os tumores, contribuindo negativamente para o prognóstico (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019). Marcadores inflamatórios sanguíneos, incluindo as razões entre as contagens absolutas de células sanguíneas antes do tratamento (neutrófilos/linfócitos, plaquetas/linfócitos/monócitos) e o índice de inflamação imunológica sistêmica (plaquetas x neutrófilos/linfócitos) vem sendo investigados por seus papéis prognósticos em pacientes com CCR (GUTHRIE *et al.*, 2013; KIM, J. H. *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018).

Os neutrófilos, como os primeiros a responder à inflamação, podem migrar em direção ao tumor e promover a disseminação de células tumorais para órgãos distantes (MIZUNO *et al.*, 2019). Monócitos no microambiente tumoral têm o potencial de se diferenciar em células dendríticas ou macrófagos associados ao tumor (AUGIER *et al.*, 2010). Os linfócitos, por sua vez, são componentes importantes para a imunidade adaptativa e suprimem a proliferação das células tumorais, induzindo a apoptose e inibindo a migração e invasão destas células (DIAKOS *et al.*, 2014). Um estudo que avaliou o valor prognóstico destes marcadores em quase 5 mil pacientes com CCR concluiu que o índice de inflamação imunológica sistêmica elevado é um preditor independente de pior sobrevida global (HR: 1,330, $p < 0,001$) e sobrevida livre de doença (HR: 1,366, $p < 0,001$) nestes pacientes (FU *et al.*, 2020). Este padrão foi visto também em uma metanálise que incluiu 3737 pacientes com CCR, em que foi demonstrado que maiores índices de inflamação imunológica sistêmica se associam à tumores indiferenciados, presença de metástases à distância e maior dimensão tumoral (> 5 cm) (DONG *et al.*, 2020).

1.5.2 Moleculares

Muitos estudos tentaram estabelecer uma classificação molecular prognóstica para o CCR, mas estes ainda não levaram a uma única classificação sistemática. Atualmente, é recomendado que todos os tumores colorretais metastáticos sejam investigados em relação à presença de dMMR/MSI e mutações em *KRAS/NRAS* e *BRAF*. Tumores colorretais em estágio II com alto risco clínico podem ser investigados para dMMR/MSI, não para a predição do prognóstico, mas para definição da indicação ou não de quimioterapia adjuvante. Em contrapartida, não há biomarcadores com valor prognóstico validados pelas principais diretrizes para o CCR no estágio III (BENSON *et al.*, 2021). O valor prognóstico do status da via MMR será discutido detalhadamente mais adiante. Para 50% dos pacientes com CCRm com *KRAS/NRAS/BRAF* selvagens, a sobrevida média com o tratamento direcionado é de aproximadamente 30 meses, com taxas de sobrevida de 80% em 1 ano, 40% em 3 anos e 20% em 5 anos após início da quimioterapia em primeira linha (LO NIGRO *et al.*, 2016).

Como descrito anteriormente, existem três mecanismos principais de instabilidade genômica no CRC: CIN, MSI e CIMP. Muitos estudos tentaram estabelecer uma classificação molecular com finalidade inicialmente prognóstica para o CCR, mas ainda não se chegou a uma única classificação sistemática (MÜLLER; IBRAHIM; ARENDS, 2016). Dentre elas, uma classificação patológica e molecular sistemática proposta pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) em 2012 e outra pelo *Consensus Molecular Subtype Consortium* (CMS) em 2015 (GUINNEY *et al.*, 2015; THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012).

Apesar da reconhecida heterogeneidade inter e intratumoral do CCR, a primeira classificação do TCGA foi capaz de subclassificar os tumores colorretais em dois subtipos, os quais são caracterizados por uma morfologia específica e por um

perfil de alterações moleculares: os tumores colorretais hipermutados (16% dos casos) e os não-hipermutados. Dentre os hipermutados, cerca de 75% apresentavam MSI-H como resultado da dMMR, e 15% apresentavam mutações no gene da DNA polimerase- ϵ (*POLE*). Em relação aos tumores não-hipermutados, os cânceres não hipermutados representados por 84% dos casos de CCR, apresentavam pMMR/MSS e maior frequência de alterações somáticas, incluindo mutações comuns nos genes *APC*, *TP53*, *KRAS*, *SMAD4* e *PIK3CA* (do inglês: *Phosphatidylinositol-5-Biphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*) (MÜLLER; IBRAHIM; ARENDS, 2016; THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012).

Em 2015, o CMS analisou um compartilhamento de dados públicos em larga escala com o objetivo de estabelecer uma nova e universal classificação molecular do CCR e promover a sua aplicabilidade clínica. A taxonomia do CMS foi fundada principalmente com base nas diferenças na biologia do tumor, e não nos resultados clínicos, capturando assim a heterogeneidade biomolecular intrínseca do CCR. Os especialistas do painel avaliaram seis algoritmos de subclassificação do CCR a partir de bases de dados de seis estudos somados aos dados do TCGA, apresentando uma classificação formada por quatro grupos prognósticos (GUINNEY *et al.*, 2015):

- **CMS1 (imune, 14%):** compreende quase todos os pacientes com dMMR/MSI. São tumores majoritariamente caracterizados por perfil genômico hipermutado, incluindo silenciamento ou mutações em *hMLH1*, e alto nível de mutações em *BRAF*. Estes tumores apresentam uma forte ativação imune, refletida por uma atividade transcricional elevada, associada à presença de infiltrado imune difuso e superativação das vias de resposta imune antitumoral (expressão de PD1 e presença de células NK (do inglês: *natural killers*), células Th1 e

infiltração de células T citotóxicas no microambiente tumoral). Atualmente esta ativação imunológica é considerada uma das principais características dos CCR dMMR/MSI (LLOSA *et al.*, 2015).

- **CMS2 (canônico, 37%):** trata-se de tumores com CIN elevado e alto nível de alterações no número de cópias somáticas. Diferentemente do subtipo CMS1, estes tumores apresentam uma forte regulação positiva de WNT e MYC (do inglês: *myelocytomatosis*) e um fenótipo celular epitelial. Comparado a outros grupos, o CMS2 exibiu mais frequentemente ganho de número de cópias em oncogenes e perdas de número de cópias em genes supressores de tumor.
- **CMS3 (metabólico, 13%):** são caracterizados pela desregulação de muitas vias metabólicas (glicose pentose, nitrogênio, ácido graxo etc.), presença moderada de CIN com menos alterações no número de cópias somáticas, maior prevalência de CIMP-baixo e maior frequência de mutações em *KRAS* em relação aos demais subgrupos. Quase 30% dos tumores classificados como CMS3 apresentam hipermutabilidade, o que significa que este subtipo de CCR apresenta maior frequência de dMMR/MSI em relação à CMS2 e CMS4.
- **CMS4 (mesenquimal, 23%):** este subgrupo é caracterizado pela presença de CIN e de alterações no número de cópias somáticas elevados, forte expressão de genes de transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês: *Epithelial to Mesenchymal Transition*) e ativação da sinalização de TGF- β . Este subtipo superexpressa mais comumente proteínas implicadas na infiltração estromal e na angiogênese e exibe uma hiperativação de vias associadas ao fenótipo mesenquimal.

Embora a taxonomia do CMS forneça informações valiosas sobre a biologia tumoral e possa ser usada para orientar o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos, a sua utilidade clínica direta refere-se em especial à estimativa da sobrevida (valor prognóstico), enquanto seu valor na seleção de pacientes para terapias em específico (valor preditivo) ainda é limitado (GUINNEY *et al.*, 2015). Em uma recente metanálise, demonstrou-se valor prognóstico desfavorável de CMS4 na doença localmente avançada em comparação a CMS1 e CMS2 (TEN HOORN *et al.*, 2021). Como exemplo, um dos estudos incluídos analisou uma coorte relativamente grande (860 pacientes) em estágio III e identificou que o CMS4 teve um desempenho significativamente pior do que o CMS1 e o CMS2 em relação à SG (PISKOL *et al.*, 2019). Uma possível explicação para isto é que estes tumores possivelmente se comportam mais como o modelo de disseminação precoce em vez do modelo de progressão linear clássico, apresentando maior probabilidade de micrometástases, ainda que indetectáveis (GHAJAR; BISSELL, 2016; NAXEROVA *et al.*, 2017). No CCRm observou-se que o CMS1 foi associado a uma pior sobrevida em relação aos demais subtipos. A maior coorte de pacientes com CCRm de subtipo CMS1 avaliada até o momento (581 pacientes) encontrou uma mediana de SG igual a 15 meses (LENZ *et al.*, 2019), o que vai ao encontro de dados anteriores que apontam uma pior sobrevida para o CCRm com mutações em *BRAF* e dMMR/MSI (AASEBO *et al.*, 2019; VENDERBOSCH *et al.*, 2014). Como estas alterações moleculares são propriedades típicas do subtipo CMS1, elas podem explicar a pior sobrevida neste subgrupo de tumores. Tanto na doença local quanto na metastática, o CMS2 é considerado o subtipo com o prognóstico mais favorável (TEN HOORN *et al.*, 2021).

Em relação à resposta terapêutica, os tumores do subtipo CMS1 provavelmente se beneficiam mais da imunoterapia na doença metastática. Os

estudos disponíveis usando CMS1 em vez de MSI são ainda escassos, mas demonstram clara eficácia da terapêutica com inibidores de *checkpoint* imune (OVERMAN *et al.*, 2017, 2018). Em uma segunda linha, a adição de bevacizumabe à quimioterapia também parece apresentar maior benefício neste subtipo de tumores colorretais, possivelmente pelo importante papel dos linfócitos T na regulação positiva da angiogênese em resposta ao bloqueio da via VEGF (do inglês: *Vascular Endothelial Growth Factor*) (TIAN *et al.*, 2017).

Por sua vez, o benefício do cetuximabe é mais evidente em pacientes com CCRm do subtipo CMS2 e *KRAS* selvagem. Foi demonstrado que estes tumores se desenvolvem predominantemente do lado esquerdo e, são caracterizados pela hiperativação da via EGFR (ARNOLD, D. *et al.*, 2017; LENZ *et al.*, 2019). Estudos anteriores também demonstraram que comutações em *APC* e *TP53* estão associadas à sensibilidade ao cetuximabe, e ambas estão enriquecidas em pacientes com CMS2 (75,0% versus 17,0 a 41,0% em CMS1 e CMS4, respectivamente) (THOTA *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2019).

Na doença metastática do subtipo CMS4, os estudos demonstram melhor eficácia de regimes em primeira linha à base irinotecano em relação àqueles com oxaliplatina, ambos associados ao bevacizumabe (em tumores mutantes *KRAS*) ou ao cetuximabe (em tumores com *KRAS* selvagem) (BORELLI *et al.*, 2020; YUKI *et al.*, 2020). Atualmente, os regimes de primeira linha para CCRm são frequentemente baseados em oxaliplatina, o que enfatiza a relevância de estratificar os pacientes de acordo com as características moleculares para prevenir o tratamento subótimo.

Na doença local ou localmente avançada, CCR dos subtipos CMS2 e CMS3 beneficiam-se mais da quimioterapia adjuvante em relação aos subtipos mesenquimal e imune. A ausência de benefício da monoterapia com fluoropirimidina para tumores

do subtipo CMS1 (com dMMR/MSI) pode ser explicada pelo fato de que a proficiência da via MMR é necessária para induzir a toxicidade celular ao 5-FU, através da geração de um ciclo fútil de inserção de uracila no DNA e reparo com inserção desta base (DES GUETZ *et al.*, 2009; SARGENT *et al.*, 2010).

Até o momento, a implementação clínica de sistemas de classificação molecular tem se mostrado desafiadora. O perfil genômico e transcriptômico de tumores é demorado e caro, e seu custo-benefício ainda não foi demonstrado. Um tópico importante e contínuo de discussão é o valor aditivo do CMS ao estadiamento TNM, status da via MMR e o status de mutação dos genes já empregados na decisão terapêutica para o CCR. Foi demonstrado um forte impacto prognóstico das mutações *BRAF^{V600E}* e *KRAS* em tumores pMMR/MSS dependente da CMS, sendo a mutação *BRAF^{V600E}* a de valor prognóstico mais forte em tumores CMS1 e as mutações em *KRAS* em tumores CMS2 e CMS3 (SMEBY *et al.*, 2018). Com relação ao estadiamento TNM, identificou-se uma assinatura genômica fortemente correlacionadas com CMS4 em pacientes em estágio IV e II de alto risco, enfatizando o valor prognóstico aditivo dos subtipos transcriptômicos para o estadiamento TNM (COEBERGH VAN DEN BRAAK *et al.*, 2020).

1.6 Sistemas de Reparo do DNA

O DNA nuclear é constantemente exposto a vários agentes endógenos ou exógenos que o danificam. Estes agentes podem ser físicos (luz ultravioleta, radiação ionizante,), biológicos (vírus) ou químicos (antineoplásicos citotóxicos). Os danos ao DNA podem também surgir a partir de processos endógenos devido a interações do DNA com produtos do metabolismo celular (espécies reativas do oxigênio e produtos

da peroxidação lipídica) e à função imprópria das DNA polimerases durante a replicação do DNA, resultando em alterações de bases, malpareamentos, inserções e deleções, entre outros tipos de lesão (BASU, 2018; ROOS; THOMAS; KAINA, 2016; TUBBS; NUSSENZWEIG, 2017). Neste contexto, o sistema de reparo do DNA representa um processo biológico complexo que garante a estabilidade genômica e a integridade das células e compreende várias vias distintas que reparam diferentes tipos de danos ao DNA (LORD; ASHWORTH, 2012; ROOS; KAINA, 2013).

Independentemente da sua natureza, depois que o dano ao DNA ocorre, as proteínas de reparo do DNA identificam o local do dano e determinam se devem repará-lo ou promover os mecanismos à apoptose, uma decisão que dependerá da extensão do dano e da atuação das proteínas envolvidas no reparo e nos pontos de verificação durante o ciclo celular (ALHMOUD *et al.*, 2020). Deficiências nestes processos causam evasão à apoptose e perpetuação de fenótipos celulares genomicamente instáveis, ambos considerados pilares dos processos de carcinogênese e resistência às terapias antineoplásicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011).

Cada vez mais, surgem evidências que suportam a existência de interações entre as proteínas envolvidas nas diferentes vias de reparo de DNA. Por isto, nenhuma via exclusivamente repara com eficiência todos os tipos de lesões de DNA, e algumas lesões servem como substratos para mais de uma via (KUMAR *et al.*, 2020). Todavia, para fins didáticos, as vias de reparo do DNA são classificadas da seguinte forma: reparo direto, que realiza o reparo do DNA através de uma única enzima; reparo por excisão de bases (BER, do inglês: *Base Excision Repair*), reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês: *Nucleotide Excision Repair*), que são responsáveis pelo reparo de danos a bases e nucleotídeos, respectivamente; reparo de malpareamento

(MMR, do inglês: *Mismatch Repair*), que corrige pequenos erros de pareamento, *loops* de inserções e deleções durante a replicação do DNA; reparo de quebras duplas do DNA (DSBR, do inglês: *Double Strand Break Repair*), composto por três vias - reparo por recombinação homóloga (HRR, do inglês: *Homologous Recombination Repair*), reparo por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês: *Non-Homologous End Joining*) e reparo por micro-homologia (MMEJ, do inglês: *Microhomology End Joining*). Finalmente, há a via conhecida por sua capacidade de tolerar danos induzidos ao DNA e garantir a continuidade da replicação desta molécula e do ciclo celular, a síntese translesão (TLS, do inglês: *Translesion Synthesis*) (Figura 6).

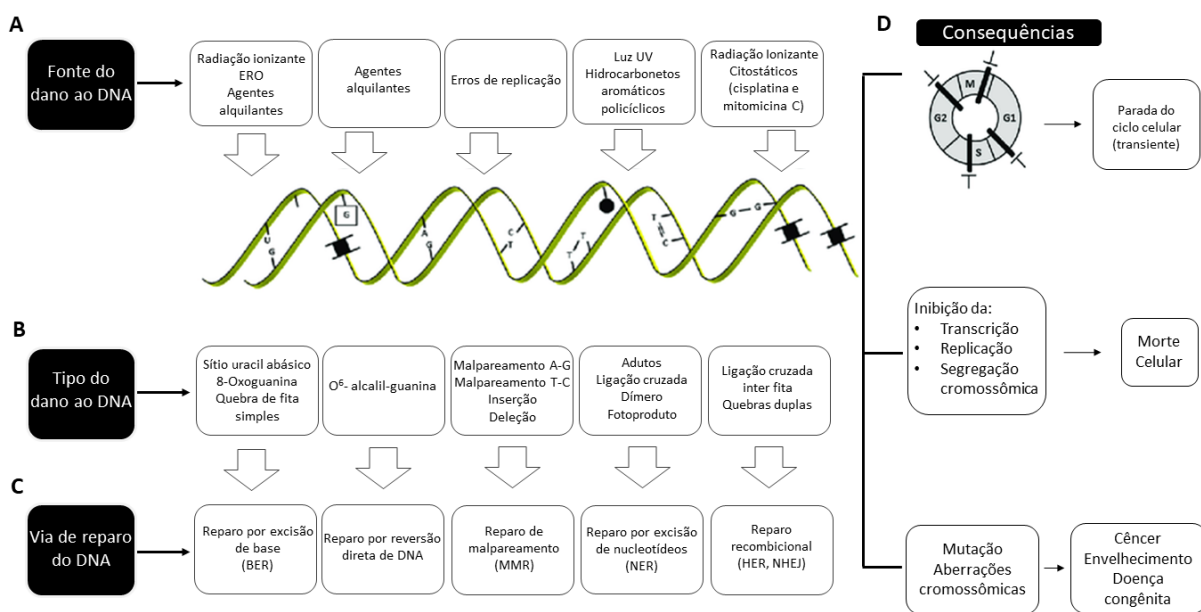


Figura 6. Principais vias envolvidas no reparo de danos ao DNA e seu papel na biologia celular. (Adaptado de VODICKA et al., 2019)

Em 2012, o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) conduziu uma caracterização abrangente de tumores colorretais, incluindo sequências de exoma, números de cópias de DNA e níveis de expressão de RNA. Dos casos analisados, 16% foram

classificados como hipermutados (maior que 12 mutações por 10⁶ bases) e exibiram enriquecimento de mutações em regiões de microssatélites indicando o fenótipo de dMMR/MSI. Os outros 84% dos casos foram classificados como pMMR/MSS e exibiram maior frequência de alterações somáticas no número de cópias, sugerindo defeitos cromossômicos e subcromossômicos (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). Contudo, uma análise recente destes dados identificou nos conjuntos de dados de adenocarcinoma de cólon (COAD) e adenocarcinoma de reto (READ) uma significativa quantidade de mutações em vários genes de resposta e reparo de danos ao DNA (KNIJNENBURG *et al.*, 2018).

Defeitos na via MMR são comumente usados para classificar o CCR, enquanto mutações nos genes das vias HRR e de Fanconi (FA) têm sido historicamente associadas a cânceres de mama e de ovário (HOANG; GILKS, 2018). A análise de amostras dos bancos COAD e READ identificou que cerca de 25% dos casos carregavam mutações em pelo menos um dos 420 genes de reparo de DNA (**Tabela 4**) (KNIJNENBURG *et al.*, 2018). A maioria das mutações identificadas foram classificadas como "putativas passageiras". Embora essas mutações não sejam atualmente reconhecidas como responsáveis pela carcinogênese colorretal, é possível que sua presença induza a deficiências nas vias de reparo do DNA e, conseqüentemente, influenciem o seu prognóstico e a resposta terapêutica.

Tabela 4: Mutações e alterações epigenéticas em genes das vias de resposta a danos no DNA e genes de reparo do DNA relatadas no The Cancer Genome Atlas/ PanCancer Atlas.

Gene	Via	Número de Casos afetados (%)
<i>TP53</i>	DDR	92 (17.4)
<i>ATM</i>	DDR	18 (3.4)

<i>BRCA2</i>	HRR	10 (1.9)
<i>TP53BP1</i>	DDR	9 (1.7)
<i>MSH6</i>	MMR	7 (1.3)
<i>ATR</i>	DDR	7 (1.3)
<i>BARD1</i>	HRR	3 (0.6)
<i>BLM</i>	HRR	3 (0.6)
<i>MSH3</i>	MMR	3 (0.6)
<i>BRIP1</i>	HRR	2 (0.4)
<i>FANCA</i>	FA	2 (0.4)
<i>RAD50</i>	DSBR	2 (0.4)
<i>ERCC4</i>	NER	1 (0.2)
<i>MLH1</i>	MMR	37 (10.3)*
<i>MSH2</i>	MMR	1 (0.2)
<i>PMS2</i>	MMR	1 (0.2)
<i>RAD21</i>	DSBR	1 (0.2)
<i>RAD21L1</i>	DSBR	1 (0.2)
<i>RAD51C</i>	HRR	1 (0.2)
<i>XRCC2</i>	HRR	1 (0.2)
<i>XRCC3</i>	HRR	1 (0.2)

*metilação.

Adaptado de (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). Abreviaturas: TP53, do inglês, *tumor protein 53 gene*; ATM, do inglês, *ATM serine/threonine kinase*; BRCA2, do inglês, *breast cancer gene*; TP53BP1, do inglês, *tumor protein P53 binding protein 1*; MSH6, do inglês, *MutS homolog 6*; ATR, do inglês, *ataxia telangiectasia and Rad3 related*; BARD1, do inglês, *BRCA1 associated RING domain 1*; FANCA, do inglês, *FA complementation group A*; RAD50, do inglês, *double strand break repair protein*; ERCC4, do inglês, *ERCC excision repair 4 gene*; MLH1, do inglês, *MutL homolog 1*; MSH2, do inglês, *MutS homolog 2*; PMS2, do inglês, *post meiotic segregation increased 2*; RAD21, do inglês, *double-strand-break repair protein rad21 homolog*; RAD21L1, do inglês, *Double-strand-break repair protein rad21-like protein 1*; RAD51C, do inglês, *DNA repair protein RAD51 homolog 3*; XRCC2, do inglês, *DNA repair protein XRCC2*; XRCC3, do inglês, *DNA repair protein XRCC3*.

De acordo com este estudo, as alterações mais prevalentes observadas em vias de reparo do DNA em cânceres colorretais foram: (1) as já reconhecidas deficiências na via MMR; e (2) as emergentes deficiências na via HRR.

1.6.1 Via de reparo de malpareamento do DNA

As sequências nucleotídicas do DNA estão suscetíveis à alteração através da ação de mutagênicos exógenos e endógenos e erros espontâneos. Durante a replicação celular, a DNA polimerase faz a leitura da fita intacta de DNA e a utiliza como um modelo para sintetizar uma cópia idêntica, um processo denominado replicação semiconservativa. No entanto, a atividade de polimerização desta enzima não é perfeita, e erros são inevitáveis durante a replicação do DNA. Enquanto a DNA polimerase insere os nucleotídeos na direção de 5' - 3', ela atua concomitantemente na revisão das sequências já sintetizadas. Quando um erro é detectado, a DNA polimerase se move para trás e, através da sua atividade exonuclease endógena, remove as inserções errôneas (PEĆINA-ŠLAUS *et al.*, 2020). Todavia, esta função de revisão não é livre de erros.

Neste contexto, a atuação da via de MMR é essencial na preservação da homeostase do DNA e na garantia estabilidade genômica. A principal tarefa do MMR é corrigir malpareamentos espontâneos de base-base e pequenos loops de inserção-deleção que são gerados principalmente durante a replicação do DNA. Quando o MMR é deficiente, esses erros não são corrigidos. Conseqüentemente, a taxa mutacional aumenta, assim como o comprimento das sequências dentro de regiões de microssatélites (PEĆINA-ŠLAUS *et al.*, 2020; SCHMIDT; PEARSON, 2016).

A via do MMR reconhece e remove malpareamentos entre pares de bases do DNA que ocorrem devido a erros de replicação. Primeiramente, a incompatibilidade entre as bases pareadas é reconhecida pelos complexos de heterodímero MutS α (MSH2/MSH6) e MutL β (MLH1/PMS1) ou MutS β (MSH2/MSH3) e MutL α (MLH1/PMS2) que se ligam ao DNA no local do malpareamento (SAMEER; NISSAR; FATIMA, 2014). O primeiro e mais prevalente homólogo de *mutL* humano, *hMLH1*, está localizado no cromossomo 3p21. Ele codifica a proteína MLH1, que pode formar heterodímeros com três monômeros distintos, PMS2 (do inglês: *Postmeiotic Segregation Increased 2*), MLH2 (também conhecida como PMS1, do inglês *Postmeiotic Segregation Increased 2*) ou MLH3.

O complexo MLH1/PMS2 reconhece o complexo MSH2/MSH6 ligado a uma incompatibilidade na sequência de DNA e forma um complexo ternário (MutL α – DNA-MutS α) que coordena uma série de etapas de reparo adicionais. O complexo MutL α contém uma atividade endonuclease endógena, que inicia a incisão no local da lesão. A fita de DNA que sofreu a incisão perto do local da lesão serve como um ponto de entrada para a exonuclease EXO1, que é necessária para a degradação da fita de DNA contendo bases malpareadas. À jusante, a exonuclease EXO1 interage com o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, do inglês: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), iniciando a ressecção do DNA no sentido 5' - 3'. Finalmente, a polimerase delta (Pol δ) ressintetiza a sequência excisada, e o DNA é ligado pela enzima DNA ligase I (EDELBROCK; KALIYAPERUMAL; WILLIAMS, 2013; FISHEL, 2015; PEĆINA-ŠLAUS *et al.*, 2020; SAMEER; NISSAR; FATIMA, 2014). Mutações patogênicas em qualquer um desses genes diminuem ou impedem o reconhecimento dos malpareamentos, levando a um aumento da carga mutacional, particularmente em regiões microssatélites do genoma.

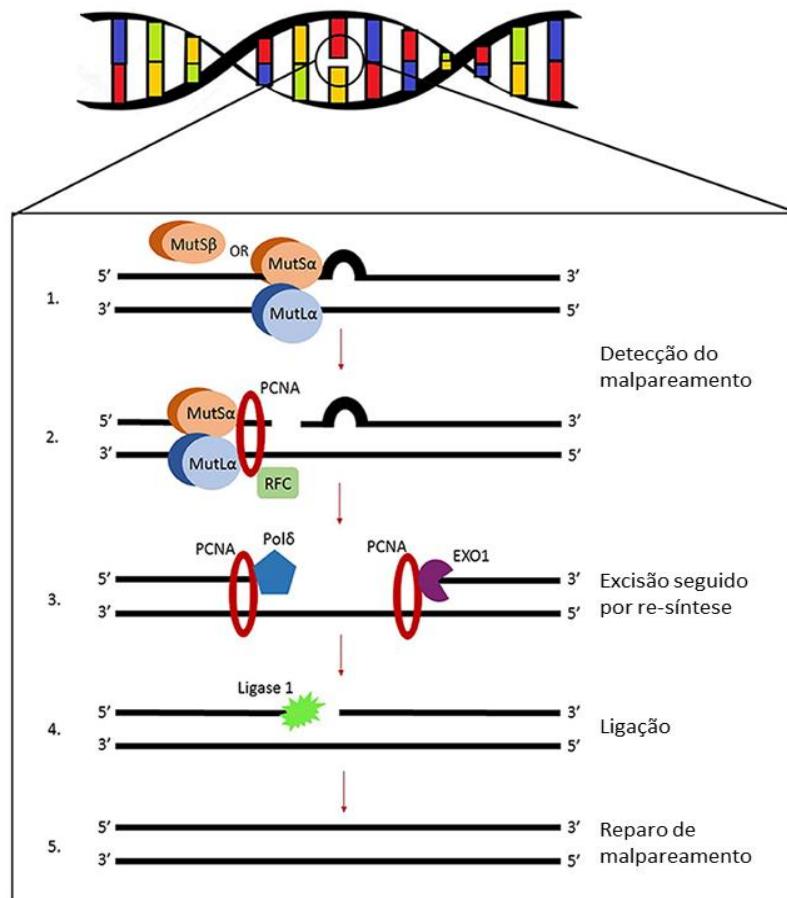


Figura 7. Visão esquemática da via de reparo de malpareamento do DNA. (Adaptado de PEĆINA-ŠLAUS et al., 2020). *MutSβ*, heterodínamo MSH2/MSH3; *MutSα*, heterodínamo MSH2/MSH6; *MutLα*, heterodínamo MLH1/PMS2; PCNA, do inglês, proliferating cell nuclear antigen; RFC, do inglês, replication factor C; *Polβ*, do inglês, DNA polymerase β; EXO1, do inglês, exonuclease 1.

Sequências repetitivas no DNA são elementos indissociáveis e inatos dispersos em nosso genoma que respondem por cerca de 3% dele. Essas curtas sequências de DNA repetidas são polimórficas por natureza e são geralmente conhecidas como microssatélites, mas também podem ser referidas como repetições de sequência

simples. Eles são comuns em genomas eucarióticos e sua diversidade de comprimento é muito alta, variando de mononucleotídeos a hexanucleotídeos (SAWAYA *et al.*, 2013; YANG; ZHENG; JIN, 2019). Os *loci* de microssatélites exibem grande variação na população e apresentam vários alelos que consistem em motivos repetidos geralmente entre 10 e 60 vezes (BARETTI; LE, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os microssatélites são amplamente distribuídos por todo o genoma de forma não aleatória e são propensos a mutações durante a replicação do DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A MSI é o fenótipo decorrente de deficiências na via MMR e é caracterizada por apresentar um aumento nas repetições de sequências curtas (SSR, do inglês: *Short Sequence Repeats*), sequências curtas em tandem (STR, do inglês: *Short Tandem Repeats*) ou do fenótipo EMMST (do inglês: *Elevated Microsatellite Alterations at Selected Tetranucleotide repeats*), que se refere a um aumento de alterações de microssatélites em tetranucleotídeos selecionados (WATSON; BERG; SØREIDE, 2014).

A taxa de incidência de mutações somáticas espontâneas que ocorrem durante a vida de um indivíduo não corresponde ao número de alterações genéticas observadas nas células tumorais (FISHEL, 2015). Dados do TCGA demonstraram que o número de mutações detectadas nos tumores contrasta muito não apenas com o número de mutações encontrado em células normais, mas também entre diferentes tipos de tumores variando de 500 a 100.000 mutações (LOEB, 2016). Esta discrepância é explicada pela instabilidade genômica, uma das características fundamentais dos tumores, sendo as deficiências na via MMR a causa do fenótipo tumoral com alta carga mutacional derivado da MSI (FISHEL, 2015). Por serem

responsáveis por conter o avanço da sobrecarga mutacional, os componentes da via MMR adquiriram o papel de genes supressores de tumor.

A avaliação do status da via MMR é feita através de dois métodos: imunohistoquímica (IHQ), a qual detecta o nível de expressão das quatro principais proteínas de MMR (MSH2, MSH6, MLH1 e PMS2) diretamente no tecido tumoral (EVRARD *et al.*, 2019). A perda de expressão de pelo menos uma dessas proteínas significa que o tumor é dMMR e, como consequência, apresenta MSI (**Tabela 5**) (BOLAND *et al.*, 1998; EVRARD *et al.*, 2019).

Tabela 5: Padrões de perda de expressão de proteínas identificadas através da imunohistoquímica (Adaptado de BATEMAN, 2021).

Padrão de perda de expressão em IHC	Implicação clínica provável
Padrões comuns	
MLH-1 and PMS-2	Inativação de <i>MLH-1</i> Mutações de <i>MLH-1</i>
MSH2 and MSH-6	Mutação de <i>MSH-2</i> Mutações de <i>EPCAM</i> (menos comum)
Somente MSH-6*	Mutação de <i>MSH-6</i> Mutações de <i>MSH-2</i> (menos comum)
Somente PMS-2†	Mutação de <i>PMS-2</i> Mutações de <i>MLH-1</i> (menos comum)
Padrões raros	
Somente MLH-1	Inativação de <i>MLH-1</i> Mutações de <i>MLH-1</i>
Somente MSH-2	Mutação de <i>MSH-2</i> Mutações de <i>EPCAM</i>

*MSH2 pode formar heterodímeros com proteínas da MMR diferente de MSH-6 e, portanto, a expressão de MSH-2 geralmente não é perdida quando uma mutação de MSH-6 está presente.

†MLH-1 pode formar heterodímeros com proteínas MMR diferentes de PMS-2 e, portanto, a expressão de MLH-1 geralmente não é perdida quando uma mutação de PMS-2 está presente.

Abreviações: IHC, imunohistoquímica; MMR, do inglês, *mismatch repair*, MSH6, do inglês, *MutS homolog 6*; MSH2, do inglês, *MutS homolog 2*; PMS2: do inglês, *post meiotic segregation increased 2*; MLH1: do inglês, *MutL homolog 1*; EPCAM: do inglês, *epithelial cellular adhesion molecule*.

O segundo método é baseado em um painel de microssatélites de DNA, através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês: *Polymerase Chain Reaction*), seguida por uma eletroforese em gel. Nesse método, MSI-alto (MSI-H, do inglês, *MSI-High*) é definido quando 40% dos marcadores são instáveis. O painel de Bethesda inclui dois mononucleotídeos (BAT25 e BAT26) e três dinucleotídeos (D5S346, D2S123 e D17S250), enquanto o painel Pentaplex é composto por cinco marcadores de mononucleotídeos (BAT25, BAT26, NR21, NR24 e NR27). Com base no painel Pentaplex, dois fenótipos moleculares foram estabelecidos: tumores com MSI-H, o qual apresenta pelo menos três marcadores instáveis, e tumores com estabilidade de microssatélites (MSS, do inglês: *Microsatellite Stable*), o qual apresenta instabilidade em, no máximo, um marcador. Mais recentemente, o Sequenciamento de Nova Geração (NGS, do inglês: *Next Generation Sequencing*) foi descrito como uma técnica capaz de detectar a presença de MSI de forma acurada e potencialmente superior às demais técnicas, uma vez que independe de uma comparação com uma amostra saudável e pode avaliar em paralelo à MSI a taxa mutacional global do tumor (YAMAMOTO; IMAI, 2019).

Aproximadamente 90% das mutações germinativas são detectadas nos genes *hMLH1* e *hMSH2*. Mutações germinativas em *hMLH1* foram identificadas pela primeira vez em múltiplas famílias com histórico de agrupamento de CCR (BRONNER *et al.*, 1994; PAPADOPOULOS *et al.*, 1994). Mais tarde, em virtude do desenvolvimento tardio destes tumores, confirmou-se o papel de *hMSH6* no CCR dMMR/MSI (BOLAND; GOEL, 2010). O gene *EPCAM* (do inglês, *Epithelial Cellular Adhesion Molecule*), localizado à montante de *hMSH2*, e a deleção germinativa da extremidade 3' deste gene leva à hipermetilação do promotor *hMSH2*, um fenômeno denominado epimutação constitucional, e MSI (LIGTENBERG *et al.*, 2013). Em contrapartida, aproximadamente 15% dos tumores colorretais esporádicos apresentam dMMR/MSI. Para estes tumores, a presença de dMMR/MSI em tumores colorretais esporádicos é utilizada para identificar pacientes que deverão ser investigados para síndrome de Lynch, selecionar pacientes com CCR em estágio II de alto risco com características adversas para receberem tratamento adjuvante, indicar imunoterapia para o CCRm e orientar o prognóstico, embora esta última finalidade ainda não faça parte da prática (TOH *et al.*, 2021).

1.6.1.1 Instabilidade de microssatélites no CCR esporádico

Os tumores colorretais dMMR/MSI esporádicos têm características únicas, incluindo maior incidência em indivíduos mais jovens (<50 anos) e no cólon direito (BARAN *et al.*, 2018), sendo também mais frequentemente diagnosticados em estágio mais precoce (20% dos CCR em estágio II possuem dMMR/MSI versus 4% dos tumores em estágio IV) (GANDHI *et al.*, 2018). A dMMR no CCR está associada a tumores maiores (> 5 cm), subtipo histológico mucinoso e baixo grau de

diferenciação (ISMAEL *et al.*, 2017). Com relação às características moleculares, este subtipo de tumor apresenta maior prevalência de mutação nos genes *BRAF* e *PIK3CA*, mas menores frequências de mutações em *TP53* e *KRAS* (ADVANI *et al.*, 2018).

Apesar de destas associações, no CCR em estágios II e III, ela é considerada um fator associado à maior sobrevida global, enquanto na doença metastática, observa-se o inverso (KLINGBIEL *et al.*, 2015; VENDERBOSCH *et al.*, 2014). Não há benefício da presença de dMMR/MSI em relação à sobrevida global na doença em estágio I (cujo prognóstico excelente é independentemente do status do MSI) e nem no estágio IV que não recebeu imunoterapia. De forma geral a presença de MSI é considerada um fator de melhor prognóstico em pacientes mais jovens (< 60 anos), mas o seu papel prognóstico em relação à lateralidade e ao grau histológico de diferenciação celular ainda é incerto (TOH *et al.*, 2021).

Os tumores colorretais com dMMR/MSI apresentam taxas mais elevadas de infiltração linfocitária e invasão perineural e linfovascular. Esses tumores são também frequentemente pouco diferenciados, com características mucinosas ou um padrão de crescimento medular. Devido à perda da função de MMR, esses tumores acumulam uma elevada carga mutacional, o que induz a uma elevada produção de neoantígenos que, por sua vez, atraem linfócitos infiltrantes de tumor (TIL, do inglês: *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) (JENKINS *et al.*, 2007; THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). É amplamente conhecido que a presença de MSI-H está associada à imunogenicidade antitumoral elevada, um mecanismo do microambiente tumoral associado a melhor prognóstico, redução do risco de metástases em linfonodos e à distância (LLOSA *et al.*, 2015).

O status de MMR também é preditivo da sensibilidade do tumor a diferentes tratamentos. No CCRm, a monoterapia com pembrolizumabe ou nivolumabe (OVERMAN *et al.*, 2017) ou a combinação de nivolumabe e ipilimumabe (OVERMAN *et al.*, 2018) foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo o pembrolizumabe o único aprovado uso em primeira linha (ANDRÉ *et al.*, 2020). É interessante destacar que a aprovação de pembrolizumabe pelo FDA foi agnóstica e representa o primeiro medicamento aprovado com indicação única de presença de dMMR/MSI, independentemente do tipo de tumor (MARCUS *et al.*, 2019).

No CCR não-metastático, dado o prognóstico favorável dos tumores dMMR/MSI no estágio II e a falta de evidências claras de um benefício de sobrevivência do tratamento adjuvante baseado em 5-FU, as diretrizes atuais não recomendam o tratamento adjuvante para o câncer de cólon de estágio II dMMR/MSI (JIN; SINICROPE, 2021). Para a doença em estágio III com dMMR/MSI, o tratamento adjuvante à base de oxaliplatina é considerado padrão de tratamento devido ao benefício prognóstico diminuído para dMMR/MSI nesses tumores e evidência de benefício do tratamento à base de oxaliplatina em relação à sobrevivência (COHEN *et al.*, 2021). Uma vez que dMMR/MSI se tornou o biomarcador padrão-ouro para prever a eficácia da imunoterapia no CCRm, é razoável supor que a imunoterapia também tenha um papel na doença em estágio inicial como tratamento neoadjuvante ou adjuvante. Atualmente, existem dois estudos clínicos randomizados de fase III em andamento que avaliam o papel da imunoterapia (avelumabe mais FOLFOX) como tratamento adjuvante no CCR dMMR/MSI em estágio III (LAU *et al.*, 2020; SINICROPE *et al.*, 2019).

1.6.2 Via de reparo do DNA por recombinação homóloga (HRR)

As quebras duplas do DNA (DSB, do inglês: *DNA double strand breaks*) são consideradas as lesões do DNA mais letais, gerando a maioria dos efeitos citotóxicos induzidos pela radiação ionizante e alguns tipos de quimioterápicos. Em células somáticas saudáveis as DSB são corrigidas principalmente por duas vias: o reparo por junção de extremidades não-homólogas canônico (c-NHEJ, do inglês: *Classical Non-Homologous End Joining*) e HRR. Os mecanismos auxiliares de reparo de DSB são o anelamento de simples fita (SSA, do inglês: *Single Strand Annealing*) e a junção de extremidades alternativa (alt-EJ, do inglês: *Alternative End Joining*) que dependem da presença de sequências de repetição e de micro-homologias, respectivamente, nos locais de quebra para realizar o reparo (CECCALDI; RONDINELLI; D'ANDREA, 2016; SCULLY *et al.*, 2019).

HRR é considerada uma via de reparo livre de erros devido ao uso de uma cromátide-irmã como modelo para o reparo da quebra-dupla, restaurando a sequência de DNA sem perda de material genético (LI *et al.*, 2019). Um dos pontos-chave da regulação que afeta os resultados do reparo de quebras-duplas é a ressecção das extremidades 5', um passo que é controlado pelo ponto do ciclo celular que ocorre de maneira mais efetiva nas fases S e G2. O processo de ressecção canônica é iniciado pelo complexo MRN, formado por Mre11-Rad50-Nbs1, que faz incisões endonucleolíticas adjacentes nas extremidades do DNA, promovidas por CtIP) (ANAND *et al.*, 2016). As ações combinadas do complexo MRN e CtIP promovem a ligação e ação das nucleases Exo1 e Dna2 que realizam extensa ressecção das extremidades das quebras-duplas, degradando centenas ou até milhares de nucleotídeos, dependendo da disponibilidade de sequências homólogas para o

reparo (NIMONKAR *et al.*, 2011; NIU *et al.*, 2010; SHIM *et al.*, 2010; SYED; TAINER, 2018). A ressecção dependente de MRN-CtIP pode promover reparos sem molde (alt-EJ e SSA), mas é considerada primariamente como parte da via HRR (PAULL, 2021). Imediatamente após a ressecção as pontas de DNA em fita simples são protegidas por RPA que irá recrutar BRCA2 que irá substituir RPA pela recombinase RAD51. Esta substituição é promovida por mediadores como XRCC2, XRCC3 e RAD52 (ALI; MCINTOSH; SAVAGE, 2021). Em seguida, RAD51 irá formar um filamento de nucleoproteína que invade a cromátide-irmã e encontra a sequência de homologia do DNA que serve de modelo para a síntese de novo DNA. Neste local se formará um D-loop transiente que funciona como uma forquilha de replicação transiente, permitindo a maquinaria de replicação substituir o DNA danificado/ressecado de maneira livre de erros (**Figura 8**) (ALI; MCINTOSH; SAVAGE, 2021; CLEARY *et al.*, 2020).

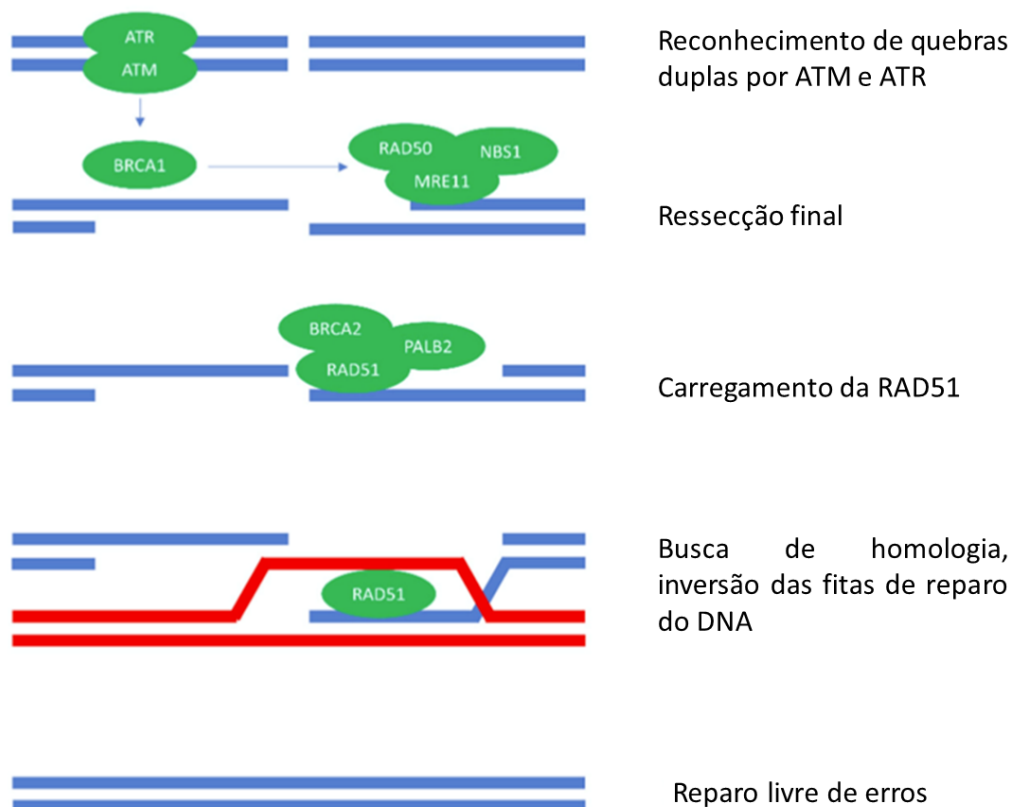


Figura 8. Visão esquemática da via de reparo do DNA por Recombinação Homóloga(Adaptado de VAN WILPE et al., 2021).ATM, do inglês, ATM serine/threonine kinase;ATR, do inglês, ataxia telangiectasia and Rad3 related; BRCA1, do inglês, breast cancer gene 1; RAD50, do inglês, RAD50 double strand break repair protein; NBS1, do inglês, nijmegen breakage syndrome 1 protein; MRE11, do inglês, double-strand break repair protein MRE11; BRCA2, do inglês, Breast cancer type 2 susceptibility protein; PALB2: do inglês, partner and localizer of BRCA2; RAD51, do inglês, DNA repair protein RAD51 homolog 1.

1.6.2.1 Prognóstico do CCR com deficiências na via HRR

Defeitos funcionais nas proteínas que gerem inabilidade da via HRR realizar o reparo de DSB levam ao fenótipo chamado de deficiência de recombinação homóloga (HRD, do inglês: *Homologous Recombination Deficiency*) (BIANCO et al., 2019). A identificação de HRD é classicamente descrita em tumores com mutações germinativas em *BRCA1/2*, como em mama e ovário (CHARTRON et al., 2019). A HRD leva a célula a depender em outras vias de reparo de DSB: NHEJ, alt-EJ e SSA (CHANG et al., 2017; SCULLY et al., 2019). Estas vias executam o reparo na ausência do DNA molde, resultando em reparos potencialmente imprecisos em relação à fidelidade das sequências do DNA e “cicatrizes” genômicas características ao longo do genoma. Foi reportado que a expressão de Mre11 e Rad51, monitorada por imunohistoquímica prediz a resposta e prognóstico de pacientes de CCR que recebem quimioterapia a base de oxaliplatina. A diminuição significativa do volume tumoral e maior sobrevida livre de progressão foram observadas em casos negativos para Mre11 e Rad52 quando comparados a casos positivos para estas proteínas, sugerindo que a inibição desses dois principais efetores da HRR possa aumentar a sensibilidade a quimioterapia (IHARA et al., 2016). Da mesma forma, mutações somáticas em *ATM* e *BRCA2* foram sugeridas como biomarcadores para predizer resposta a

quimioterapia baseada em oxaliplatina para pacientes com CCR em estágio III (LIN *et al.*, 2021).

Um estudo recente abordou a importância da lacuna na literatura sobre HRD no CCR descrevendo as características clínicas e patológicas de pacientes de CCR que possuíam mutações em um de 33 genes relacionados com HRR. Foram realizadas análises em dois coortes retrospectivos e em amostras randomizadas do estudo randomizado de fase III TRIBE2, no qual todos os pacientes receberam regimes duplos ou triplos baseados em oxaliplatina. Mutações na HRR foram observadas mais comumente em pacientes com tumores dMMR/MSI, com 73,4% dos tumores com este fenótipo possuindo ao menos uma mutação nesta via. Entretanto, nenhum dos tumores dMMR/MSI apresentou perda de heterozigidade significativa, sugerindo que as mutações na HRR não geraram perda de funcionalidade na via e que estas mutações sejam passageiras ao invés *drivers* nesses tumores com alta taxa mutacional. Tumores com dMMR/MSI são reconhecidos por apresentarem hipermetilação em todo o genoma e por terem baixa perda de heterozigidade quando comparados a tumores pMMR/MSS. Por outro lado, 9,5% dos tumores pMMR/MSS apresentavam mutações na HRR e maior taxa de perda de heterozigidade, sugerindo que, ao contrário do que ocorre em tumores dMMR/MSI, mutações na HRR em tumores pMMR/MSS são mais propensos desenvolver a HRD funcional. Finalmente, a análise do estudo TRIBE2 demonstrou que pacientes com tumores pMMR/MSS e mutações na HRR obtiveram melhores desfechos clínicos quando tratados com terapia baseada em agentes platinados quando comparados a pacientes sem mutações na HRR (MORETTO *et al.*, 2021).

1.6.2.2 Oportunidades terapêuticas para o CCR baseadas na HRR

Na prática clínica, o status de mutação germinativa em *BRCA1/2* é atualmente o principal biomarcador genético da HRD. No entanto, a investigação única da mutação germinativa possui algumas desvantagens: não avalia outros mecanismos moleculares que resultem em mutações patogênicas ou no silenciamento destes genes, assim como não considera a avaliação de mutações somáticas. Além disso, o foco em *BRCA1/2* negligência a inativação de outros genes da via HRR. Consequentemente, os pacientes podem receber tratamento incorreto ou perder oportunidades de tratamento, necessitando, assim, do desenvolvimento de melhores biomarcadores para identificar a HRD.

A terapia direcionada para tumores com HRD é realizada através de inibidores da PARP (iPARP) (olaparibe, niraparibe, talazoparibe) e é restrita a tumores mama, ovário, próstata e pâncreas metastáticos com mutações germinativas ou somáticas em *BRCA1/2*, *PALB2* ou *ATM* (JANYSEK *et al.*, 2021). O emprego dos iPARP nestes tumores baseia-se no princípio da letalidade sintética, que explica como a morte celular ocorre a partir de defeitos combinados em dois genes com efeito individual mínimo na sobrevivência celular (LORD; ASHWORTH, 2017). Os inibidores de PARP capturam PARP1 em locais de dano ao DNA e paralisam a forquilha de replicação. Na ausência de HRR, o NHEJ é ativado e a instabilidade genômica resultante desencadeará uma resposta de morte celular (LORD; ASHWORTH, 2017). Mais de uma década se passou desde a descoberta da letalidade sintética dos iPARP até sua aprovação para o tratamento do câncer. Infelizmente, o sucesso destes agentes vem sendo interrompidos pelos crescentes relatos crescentes de resistência (PILIÉ *et al.*, 2019; SLADE, 2020).

No entanto, a HRD é comum não apenas nos tumores mencionados acima e a sua etiologia não é exclusiva de portadores de mutações germinativas em determinados genes da via. A HRD também é encontrada esporadicamente em outros tipos de tumores, sendo relatada a presença deste fenótipo em até 15% de todos os pacientes com câncer esporádico, constituindo um grupo significativo de tumores que ainda não possuem uma diretriz terapêutica apropriada (HEEKE *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2020).

Adicionalmente, sabe-se que quaisquer defeitos na HRR podem levar à instabilidade do genoma. Tanto tumores hereditários quanto esporádicos com HRD são mais suscetíveis a danos no DNA induzidos por agentes platinados e iPARP, um traço conhecido como “*BRCAness*” (LORD; ASHWORTH, 2016). Ou seja, a deficiência de outras proteínas da via HRR, que não BRCA, também induzem o fenótipo de HRD, incluindo a sensibilidade aos mesmos agentes. Isso é particularmente interessante no contexto de CCR porque pode expandir as opções terapêuticas para aqueles que não se beneficiam de tumores pMMR/MSS (LORD; ASHWORTH, 2016).

Foi sugerido que um subgrupo de pacientes com CCR (6-15%) possuem mutações em genes de HRR, incluindo *ATM*, *BRCA1/2*, *MRE11A*, *FANCC*, *NBN*, *PALB2* (ALDUBAYAN *et al.*, 2018; RANDON *et al.*, 2019; THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2012). Dados do *The Cancer Genome Atlas* e de outros bancos de dados populacionais demonstraram que genes críticos, como *ATM*, *BRCA1* e *BRCA2*, apresentam-se somaticamente mutados em mais de 20% dos casos de CCR. Além disso, 8,7% dos tumores colorretais possuem mutações silenciosas em regiões codificadoras em HRR e BER ou HRR e MMR, concomitantemente (WANG *et al.*, 2018). Mais recentemente, foi descrito que pacientes com metástases cerebrais de

tumores colorretais primários exibem assinaturas mutacionais de HRD devido a mutações em *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51B* e *PAXIP1*(SUN *et al.*, 2019). Dados de um estudo com 108 pacientes de CCR em estadio III encontraram mutações germinativas seguidas de mutações somáticas em *ATM* ou *BRCA2* em 13,8% e 22,2%, respectivamente (LIN *et al.*, 2021).

Alternativamente, em tumores colorretais proficientes na via HRR, identificar desequilíbrios causados por hiperfuncionalidade de um ou mais componente desta via pode servir de base para o emprego de alvos terapêuticos direcionados (BROWN *et al.*, 2017). Estudos estudos relataram que os iPARP podem conferir benefícios clínicos em pacientes independentemente da presença de mutações inativadoras de *BRCA1/2* ou de HRD, sendo capaz de induzir apoptose nas células tumorais através de mecanismos independentes da sinalização de resposta a danos ao DNA, um papel que não parece estar limitado a um *background* genético específico ou a um tipo em particular de câncer (KEUNG *et al.*, 2020; MURAI; POMMIER, 2019; PILIÉ *et al.*, 2019). Ou seja, o papel de PARP1 no reparo dos danos ao DNA e em tumores geneticamente defeituosos podem não ser a única base para sua ação terapêutica positiva.

Além dos iPARP, houve um aumento expressivo de interesse em outros efetores dos sistemas de resposta a danos ao DNA, particularmente os sensores e mediadores iniciais desta sinalização, como ATM, ATR e DNA-PK, e mediadores mais *downstream* como CHK1 (que interage com ATR) e CHK2 (que interage com ATM) e WEE1 (do inglês, *WEE1-like protein kinase*) (BUKHARI *et al.*, 2019; RUNDLE *et al.*, 2017; TOMASINI *et al.*, 2021). Um dos efeitos da inibição farmacológica destes alvos é tornar as células tumorais dependentes de efetores pertencentes à via NHEJ, por exemplo, levando a uma resposta letal sintética quando um iPARPi for combinado

(MAURI *et al.*, 2020). Outra oportunidade potencialmente resultante da compreensão do status da via HRR é o emprego destes inibidores em tumores proficientes em HRR como estratégia de sensibilização a agentes indutores de DSBs, como radiação ionizante, e agentes platinados (RUNDLE *et al.*, 2017). Neste caso, a morte celular seria mediada pela indução de danos ao DNA concomitante à inibição da sinalização da resposta a estes danos, instaurando a parada do ciclo celular e o estresse replicativo irreversíveis, ambos incompatíveis com a viabilidade celular (TOMASINI *et al.*, 2021).

2 JUSTIFICATIVA

O estadiamento clínico e patológico preciso do câncer é uma ferramenta essencial para prever a sobrevivência e respaldar recomendações terapêuticas mais eficazes. De acordo com as classificações TNM da AJCC, a sobrevivência de pacientes com câncer em estágio baixo é geralmente maior do que para aqueles cuja doença encontra-se em estágio mais avançado. No entanto, o CCR, apesar de ser a segunda neoplasia mais incidente e a terceira principal causa de morte por câncer mundialmente, é uma exceção. Para tumores de cólon e reto, muitos estudos ainda demonstram a existência de um óbvio paradoxo de sobrevivência entre pacientes com doença em estágio IIB/IIC e estágio IIIA. Um dos principais motivos deste paradoxo é a ausência de marcadores preditivos de resposta a quimioterapia adjuvante para a doença em estágio II, já que o tratamento adjuvante é mandatório para todos os pacientes com doença em estágio III. Recentemente, a NCCN incluiu uma subclassificação de risco para o CCR em estágio II baseada em critérios clínicos, mas esta ainda não apresenta valor preditivo.

Com os avanços na compreensão genômica tumoral, o tratamento do câncer meramente baseado em características clinicopatológicas torna-se cada vez mais obsoleto. Todavia, diferentemente do que se observou nos últimos anos para tumores de pulmão e mama, por exemplo, o CCR ainda carece de marcadores moleculares que traduzam a heterogeneidade intratumoral e permitam a sua subclassificação em subtipos moleculares. Em relação ao CCR esporádico, a inclusão de pesquisas de

mutações em *KRAS/NRAS* e *BRAF* e de MSI para respaldar a decisão terapêutica e prever o prognóstico, restringe-se à doença metastática. Somente este ano, a pesquisa de MSI passou a ser recomendada como parte da decisão de indicação de quimioterapia adjuvante para o CCR em estágio II, ainda assim em conjunto com características clinicopatológicas. Para a doença em estágio III, não há marcadores preditivos ou prognósticos com nível de evidência alta o suficiente para serem incluídos no estadiamento. Em virtude destas lacunas, as terapêuticas para o CCR evoluem muito mais lentamente em relação àquelas para tumores cuja compreensão molecular atingiu um patamar mais elevado.

Graças aos estudos de bancos de tumores públicos com amostras de milhares de pacientes como o *The Cancer Genome Atlas* e o *PanCancer Atlas*, foram reveladas diversas alterações genômicas e mecanismos a elas relacionados, aumentando a compreensão sobre a etiologia molecular do CCR esporádico e servindo como guia para a busca de novos marcadores moleculares e terapias-alvo. Dentre estas descobertas, a presença de mutações silenciadoras em genes da via de reparo de quebras duplas no DNA é de particular interesse. Atualmente, já existe uma classe terapêutica de agentes direcionados para tumores com deficiências nesta via aprovados pelas agências reguladoras (inibidores de PARP), bem como agentes citotóxicos sabidamente mais eficazes em tumores com este fenótipo molecular (inibidores da topoisomerase, agentes alquilantes, entre outros). Adicionalmente, há diversos outros inibidores de resposta a danos no DNA em estudos clínicos também voltados para o tratamento de tumores com este fenótipo molecular, como inibidores de ATM, RAD51 e WEE1. Por já haver comprovação de eficácia e segurança de diversos destes agentes, a identificação de alvos moleculares no CCR que denotariam

a sua elegibilidade a estes agentes contribuiria para um avanço marcadamente mais acelerado na modernização do tratamento desta doença.

3 OBJETIVOS

3.2 Objetivo Geral

Avaliar o papel prognóstico da via de reparo do DNA por recombinação homóloga em pacientes com adenocarcinoma de colón e reto esporádico submetidos à ressecção cirúrgica colorretal.

3.3 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão gênica de *MRE11A*, *RAD50*, *NBN*, *BRCA1*, *BARD1*, *RBBP8* e *PALB2* nos tumores e nos tecidos saudáveis adjacentes de pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico;
- Investigar a presença de instabilidade de microssatélites nos tumores colorretais;
- Avaliar o perfil inflamatório sistêmico dos pacientes com CCR esporádico antes do tratamento;
- Investigar as associações entre os aspectos moleculares e clinicopatológicos;
- Avaliar o valor prognóstico independente das alterações moleculares em relação à sobrevida global e sobrevida livre de progressão dos pacientes com câncer colorretal esporádico.

4. REFERÊNCIAS

AASEBO, K. O. *et al.* Consequences of a high incidence of microsatellite instability and BRAF-mutated tumors: A population-based cohort of metastatic colorectal cancer patients. **Cancer Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 7, 2019.

ADVANI, S. M. *et al.* Clinical, Pathological, and Molecular Characteristics of CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. **Translational Oncology**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2018.

AGHABOZORGI, A. S. *et al.* Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. **Biochimie**, [s. l.], v. 157, 2019.

ALDUBAYAN, S. H. *et al.* Inherited DNA-Repair Defects in Colorectal Cancer. **The American Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 102, n. 3, 2018.

ALHMOUD, J. F. *et al.* DNA Damage/Repair Management in Cancers. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 4, 2020.

ALI, R. M. M.; MCINTOSH, S. A.; SAVAGE, K. I. Homologous recombination deficiency in breast cancer: Implications for risk, cancer development, and therapy. **Genes, Chromosomes and Cancer**, [s. l.], v. 60, n. 5, 2021.

AL-SOHAILY, S. *et al.* Molecular pathways in colorectal cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 27, n. 9, 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2021**. Atlanta: [s. n.], 2021.

AMIN, M. B. *et al.* (org.). **AJCC Cancer Staging Manual**. 8. ed. [S. l.]: Springer International Publishing, 2017.

ANAND, R. *et al.* Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 64, n. 5, 2016.

ANDRÉ, T. *et al.* 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. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 33, n. 35, 2015.

ANDRÉ, T. *et al.* Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 383, n. 23, 2020.

ARMAGHANY, T. *et al.* **Genetic Alterations in Colorectal Cancer** **Gastrointest Cancer Res.** [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: www.myGCRonline.org. .

ARNOLD, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, [s. l.], v. 66, p. 683–691, 2017. Disponível em: <http://gut.bmj.com/>. Acesso at: 3 Sep. 2021.

ARNOLD, D. *et al.* Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 28, n. 8, 2017.

ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Biology of colorectal cancer. **Ecancermedicalscience**, [s. l.], v. 9, 2015.

AUCLIN, E. *et al.* Carcinoembryonic Antigen Levels and Survival in Stage III Colon Cancer: Post hoc Analysis of the MOSAIC and PETACC-8 Trials. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s. l.], v. 28, n. 7, 2019.

AUGIER, S. *et al.* Inflammatory Blood Monocytes Contribute to Tumor Development and Represent a Privileged Target To Improve Host Immunosurveillance. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 185, n. 12, 2010.

AUST, D. E.; BARETTON, G. B. Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)—proposal for diagnostic criteria. **Virchows Archiv**, [s. l.], v. 457, n. 3, 2010.

BAHL, A. *et al.* Primary Tumor Location as a Prognostic and Predictive Marker in Metastatic Colorectal Cancer (mCRC). **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 10, 2020.

BARAN, B. *et al.* Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. **Gastroenterology Research**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2018.

BARETTI, M.; LE, D. T. DNA mismatch repair in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 189, 2018.

BASU, A. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 4, 2018.

BATEMAN, A. C. DNA mismatch repair proteins: scientific update and practical guide. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 74, n. 4, 2021.

BELT, E. J. Th. *et al.* High Lymph Node Yield is Related to Microsatellite Instability in Colon Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 4, 2012.

BENSON, A. B. *et al.* Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, [s. l.], v. 19, n. 3, 2021.

BERG, M. *et al.* Influence of Microsatellite Instability and KRAS and BRAF Mutations on Lymph Node Harvest in Stage I–III Colon Cancers. **Molecular Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 1, 2013.

BIANCO, J. N. *et al.* Overexpression of Claspin and Timeless protects cancer cells from replication stress in a checkpoint-independent manner. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2019.

BILLER, L. H.; SCHRAG, D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. **JAMA**, [s. l.], v. 325, n. 7, 2021.

BÖCKELMAN, C. *et al.* Risk of recurrence in patients with colon cancer stage II and III: A systematic review and meta-analysis of recent literature. **Acta Oncologica**, [s. l.], v. 54, n. 1, 2015.

BOLAND, C. R. *et al.* A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. **Cancer Research**, [s. l.], v. 58, p. 5248–5257, 1998.

BOLAND, C. R.; GOEL, A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 138, n. 6, 2010.

BORELLI, B. *et al.* Consensus molecular subtypes and CRC assigner classifications in metastatic colorectal cancer (mCRC): Prognostic and predictive impact in the TRIBE2 study. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 38, n. 15_suppl, 2020.

BRAY, F. *et al.* **Cancer Incidence in Five Continents Vol. XI**. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <http://www.iacr.com/fr/>.

BRONNER, C. E. *et al.* Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. **Nature**, [s. l.], v. 368, n. 6468, 1994.

BROWN, J. S. *et al.* Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017.

BUKHARI, A. B. *et al.* Inhibiting Wee1 and ATR kinases produces tumor-selective synthetic lethality and suppresses metastasis. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 129, n. 3, 2019.

BYRD, D. A. *et al.* Associations of novel dietary and lifestyle inflammation scores with incident colorectal cancer in the NIH-AARP diet and health study. **JNCI Cancer Spectrum**, [s. l.], v. 4, n. 3, 2021.

CECCALDI, R.; RONDINELLI, B.; D'ANDREA, A. D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 26, n. 1, 2016.

CHANG, H. H. Y. *et al.* Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 18, n. 8, 2017.

CHARTRON, E. *et al.* Targeting homologous repair deficiency in breast and ovarian cancers: Biological pathways, preclinical and clinical data. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s. l.], v. 133, 2019.

CHU, Q. 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**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2016.

CLEARY, J. M. *et al.* Biomarker-Guided Development of DNA Repair Inhibitors. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 78, n. 6, 2020.

COEBERGH VAN DEN BRAAK, R. R. J. *et al.* Interconnectivity between molecular subtypes and tumor stage in colorectal cancer. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2020.

COHEN, R. *et al.* Microsatellite Instability in Patients With Stage III Colon Cancer Receiving Fluoropyrimidine With or Without Oxaliplatin: An ACCENT Pooled Analysis of 12 Adjuvant Trials. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 39, n. 6, 2021.

CONTEDEUCA, V. *et al.* Precancerous colorectal lesions (Review). **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 973–984, 2013.

DANESE, E.; MONTAGNANA, M. Epigenetics of colorectal cancer: emerging circulating diagnostic and prognostic biomarkers. **Annals of Translational Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 13, 2017.

DE GRAMONT, A. *et al.* Association Between Disease-Free Survival and Overall Survival When Survival Is Prolonged After Recurrence in Patients Receiving Cytotoxic Adjuvant Therapy for Colon Cancer: Simulations Based on the 20,800 Patient ACCENT Data Set. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 28, n. 3, 2010.

DE LA CHAPELLE, A. Genetic predisposition to colorectal cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 4, n. 10, 2004.

DES GUETZ, G. *et al.* Microsatellite Instability does not Predict the Efficacy of Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer. A Systematic Review and Meta-analysis. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 29, p. 1675–1620, 2009. Disponível em: <http://www.spc.univ-lyon1.fr/easyrna.net/>.

DIAKOS, C. I. *et al.* Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 11, 2014.

DONG, M. *et al.* Prognostic and clinicopathological significance of systemic immune-inflammation index in colorectal cancer: a meta-analysis. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, [s. l.], v. 12, 2020.

DOUAIHER, J. *et al.* Colorectal cancer—global burden, trends, and geographical variations. **Journal of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 115, n. 5, p. 619–630, 2017.

EDELBROCK, M. A.; KALIYAPERUMAL, S.; WILLIAMS, K. J. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage

signaling and other noncanonical activities. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 743–744, 2013.

EL BALI, M.; BAKKACH, J.; BENNANI MECHITA, M. Colorectal Cancer: From Genetic Landscape to Targeted Therapy. **Journal of Oncology**, [s. l.], v. 2021, 2021.

ELLIS, L. *et al.* Colorectal Cancer Incidence Trends by Age, Stage, and Racial/Ethnic Group in California, 1990–2014. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**, [s. l.], v. 27, n. 9, p. 1011–1018, 2018. Disponível em: <http://cebp.aacrjournals.org/>.

EVRARD *et al.* Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 10, 2019.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, [s. l.], v. 61, n. 5, 1990.

FISHEL, R. Mismatch Repair. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 290, n. 44, 2015.

FLEMING, M. *et al.* Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 153–173, 2012.

FU, J. *et al.* Prognostic Inflammatory Index Based on Preoperative Peripheral Blood for Predicting the Prognosis of Colorectal Cancer Patients. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2020.

GANDHI, J. S. *et al.* Clinical Impact of Mismatch Repair Protein Testing on Outcome of Early Staged Colorectal Carcinomas. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, [s. l.], v. 49, n. 4, 2018.

GHAJAR, C. M.; BISSELL, M. J. Pathways of parallel progression. **Nature**, [s. l.], v. 540, n. 7634, 2016.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity**, [s. l.], v. 51, n. 1, 2019.

GUINNEY, J. *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 11, 2015.

GUTHRIE, G. J. K. *et al.* Comparison of the prognostic value of longitudinal measurements of systemic inflammation in patients undergoing curative resection of colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 109, n. 1, 2013.

HAMMOND, W. A.; SWAIKA, A.; MODY, K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2016.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, 2011.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [s. l.], v. 100, n. 1, 2000.

HARI, D. 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**, [s. l.], v. 217, n. 2, 2013.

HEEKE, A. L. *et al.* Prevalence of Homologous Recombination–Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types. **JCO Precision Oncology**, [s. l.], n. 2, 2018.

HOANG, L. N.; GILKS, B. C. Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome: Moving Beyond BRCA1 and BRCA2. **Advances in Anatomic Pathology**, [s. l.], v. 25, n. 2, 2018.

IHARA, K. *et al.* Expression of DNA double-strand break repair proteins predicts the response and prognosis of colorectal cancer patients undergoing oxaliplatin-based chemotherapy. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 35, n. 3, 2016.

INCA/ MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro : Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2019.

ISMAEL, N. E. H. S. *et al.* Mismatch Repair Proteins and Microsatellite Instability in Colorectal Carcinoma (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2): Histopathological and Immunohistochemical Study. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2017.

JANYSEK, D. C. *et al.* Clinical use and mechanisms of resistance for PARP inhibitors in homologous recombination-deficient cancers. **Translational Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 3, 2021.

JENKINS, M. A. *et al.* Pathology Features in Bethesda Guidelines Predict Colorectal Cancer Microsatellite Instability: A Population-Based Study. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 133, n. 1, 2007.

JIN, Z.; SINICROPE, F. A. Prognostic and Predictive Values of Mismatch Repair Deficiency in Non-Metastatic Colorectal Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 2, 2021.

JOHNSON, C. M. *et al.* Meta-Analyses of colorectal cancer risk factors. **Cancer Causes and Control**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1207–1222, 2013.

KASTRINOS, F.; SYNGAL, S. Inherited Colorectal Cancer Syndromes. **The Cancer Journal**, [s. l.], v. 17, n. 6, 2011.

KELLER, D. S. *et al.* Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. **Techniques in Coloproctology**, [s. l.], v. 23, p. 3–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10151-019-1926-2>.

KEUM, N. N.; GIOVANNUCCI, E. **Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies**. [S. l.]: Nature Research, 2019.

KEUNG, M. Y. *et al.* Response of Breast Cancer Cells to PARP Inhibitors Is Independent of BRCA Status. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 4, 2020.

KIM, J. E. *et al.* Defective Mismatch Repair Status was not Associated with DFS and OS in Stage II Colon Cancer Treated with Adjuvant Chemotherapy. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 22, n. S3, 2015.

KIM, C. G. *et al.* Preoperative Serum Carcinoembryonic Antigen Level as a Prognostic Factor for Recurrence and Survival After Curative Resection Followed by Adjuvant Chemotherapy in Stage III Colon Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 24, n. 1, 2017.

KIM, J. H. *et al.* Prognostic significance of the neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in patients with stage III and IV colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 23, n. 3, 2017.

KIM, M. J. *et al.* Survival Paradox Between Stage IIB/C (T4N0) and Stage IIIA (T1-2N1) Colon Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 22, n. 2, 2015.

KLINGBIEL, D. *et al.* Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 26, n. 1, 2015.

KNIJN, N. *et al.* Perineural Invasion Is a Strong Prognostic Factor in Colorectal Cancer. **American Journal of Surgical Pathology**, [s. l.], v. 40, n. 1, 2016.

KNIJNENBURG, T. A. *et al.* Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. **Cell Reports**, [s. l.], v. 23, n. 1, 2018.

KONISHI, T. *et al.* Association of Preoperative and Postoperative Serum Carcinoembryonic Antigen and Colon Cancer Outcome. **JAMA Oncology**, [s. l.], v. 4, n. 3, 2018.

KOPETZ, S. *et al.* Improved Survival in Metastatic Colorectal Cancer Is Associated With Adoption of Hepatic Resection and Improved Chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 27, n. 22, 2009.

KUIPERS, E. J. *et al.* Colorectal cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2015.

KUMAR, N. *et al.* Cooperation and interplay between base and nucleotide excision repair pathways: From DNA lesions to proteins. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 43, n. 1 suppl 1, 2020.

LAU, D. *et al.* Rationale and design of the POLEM trial: avelumab plus fluoropyrimidine-based chemotherapy as adjuvant treatment for stage III mismatch repair deficient or POLE exonuclease domain mutant colon cancer: a phase III randomised study. **ESMO Open**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2020.

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**, [s. l.], v. 21, n. 15, 2003.

LEE, V. W. K.; CHAN, K. F. Tumor budding and poorly-differentiated cluster in prognostication in Stage II colon cancer. **Pathology - Research and Practice**, [s. l.], v. 214, n. 3, 2018.

LENZ, H.-J. *et al.* Impact of Consensus Molecular Subtype on Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results From CALGB/SWOG 80405 (Alliance). **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 37, n. 22, 2019.

LI, J. *et al.* Pathways and assays for DNA double-strand break repair by homologous recombination. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, [s. l.], v. 51, n. 9, 2019.

LI, H. *et al.* Re-Evaluation of the Survival Paradox Between Stage IIB/IIC and Stage IIIA Colon Cancer. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 10, 2020.

LI, Z. *et al.* The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio can predict clinical outcome in stage I-III colon cancer. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018.

LIEBIG, C. *et al.* Perineural Invasion Is an Independent Predictor of Outcome in Colorectal Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 27, n. 31, 2009.

LIGTENBERG, M. J. L. *et al.* EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients. **Familial Cancer**, [s. l.], v. 12, n. 2, 2013.

LIN, P.-C. *et al.* Sequential and co-occurring DNA damage response genetic mutations impact survival in stage III colorectal cancer patients receiving adjuvant oxaliplatin-based chemotherapy. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 21, n. 1, 2021.

LLOSA, N. J. *et al.* The Vigorous Immune Microenvironment of Microsatellite Instable Colon Cancer Is Balanced by Multiple Counter-Inhibitory Checkpoints. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2015.

LO NIGRO, C. *et al.* Prognostic and predictive biomarkers in metastatic colorectal cancer anti-EGFR therapy. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 22, n. 30, 2016.

LOEB, L. A. Human Cancers Express a Mutator Phenotype: Hypothesis, Origin, and Consequences. **Cancer Research**, [s. l.], v. 76, n. 8, 2016.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. BRCAness revisited. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 2, 2016.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. **Science**, [s. l.], v. 355, n. 6330, 2017.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, [s. l.], v. 481, n. 7381, 2012.

MARCUS, L. *et al.* FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 25, n. 13, 2019.

- MARGALIT, O. *et al.* Assessing the prognostic value of carcinoembryonic antigen levels in stage I and II colon cancer. **European Journal of Cancer**, [s. l.], v. 94, 2018.
- MAURI, G. *et al.* The DNA damage response pathway as a land of therapeutic opportunities for colorectal cancer. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 31, n. 9, 2020.
- MISALE, S. *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. **Nature**, [s. l.], v. 486, n. 7404, 2012.
- MISSIAGLIA, E. *et al.* Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 25, n. 10, 2014.
- MIZUNO, R. *et al.* The Role of Tumor-Associated Neutrophils in Colorectal Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 3, 2019.
- MORETTO, R. *et al.* Homologous Recombination Deficiency Alterations in Colorectal Cancer: Clinical, Molecular, and Prognostic Implications. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], 2021.
- MÜLLER, M. F.; IBRAHIM, A. E. K.; ARENDS, M. J. Molecular pathological classification of colorectal cancer. **Virchows Archiv**, [s. l.], v. 469, n. 2, 2016.
- MURAI, J.; POMMIER, Y. PARP Trapping Beyond Homologous Recombination and Platinum Sensitivity in Cancers. **Annual Review of Cancer Biology**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2019.
- MURPHY, N. *et al.* **Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019.
- NAXEROVA, K. *et al.* Origins of lymphatic and distant metastases in human colorectal cancer. **Science**, [s. l.], v. 357, n. 6346, 2017.
- NGUYEN, L. *et al.* Pan-cancer landscape of homologous recombination deficiency. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020.
- NGUYEN, L. H.; GOEL, A.; CHUNG, D. C. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 158, n. 2, 2020.
- NIMONKAR, A. v. *et al.* BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. **Genes & Development**, [s. l.], v. 25, n. 4, 2011.
- NIU, H. *et al.* Mechanism of the ATP-dependent DNA end-resection machinery from *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, [s. l.], v. 467, n. 7311, 2010.
- OLIVEIRA, E. J. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 29, n. 2, 2006.
- OVERMAN, M. J. *et al.* Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair–Deficient/Microsatellite Instability–High Metastatic Colorectal Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 36, n. 8, 2018.

OVERMAN, M. J. *et al.* Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 18, n. 9, 2017.

PAPADOPOULOS, N. *et al.* Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. **Science**, [s. l.], v. 263, n. 5153, 1994.

PAULL, T. T. Reconsidering pathway choice: a sequential model of mammalian DNA double-strand break pathway decisions. **Current Opinion in Genetics & Development**, [s. l.], v. 71, 2021.

PEĆINA-ŠLAUS, N. *et al.* Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 7, 2020.

PEETERS, P. J. H. L. *et al.* The Risk of Colorectal Cancer in Patients With Type 2 Diabetes: Associations With Treatment Stage and Obesity. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 495–502, 2015. Disponível em: <http://care.diabetesjournals.org/lookup/>.

PILIÉ, P. G. *et al.* PARP Inhibitors: Extending Benefit Beyond BRCA -Mutant Cancers. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 25, n. 13, 2019.

PINO, M. S.; CHUNG, D. C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 138, n. 6, 2010.

PISKOL, R. *et al.* A Clinically Applicable Gene-Expression Classifier Reveals Intrinsic and Extrinsic Contributions to Consensus Molecular Subtypes in Primary and Metastatic Colon Cancer. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 25, n. 14, 2019.

QUASAR COLLABORATIVE GROUP *et al.* Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. **The Lancet**, [s. l.], v. 370, n. 9604, 2007.

RANDON, G. *et al.* Prognostic impact of ATM mutations in patients with metastatic colorectal cancer. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019.

RAWLA, P.; SUNKARA, T.; BARSOUK, A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Prz Gastroenterol**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 89–103, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>.

REBUZZI, S. E. *et al.* Adjuvant Chemotherapy for Stage II Colon Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 9, 2020.

RIBIC, C. M. *et al.* Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 349, n. 3, 2003.

RIIHIMÄKI, M. *et al.* Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2016.

ROCHA, F. G.; HELTON, W. S. Resectability of colorectal liver metastases: an evolving definition. **HPB**, [s. l.], v. 14, n. 5, 2012.

- ROMITI, A. *et al.* Study of histopathologic parameters to define the prognosis of stage II colon cancer. **International Journal of Colorectal Disease**, [s. l.], v. 34, n. 5, 2019.
- ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 332, n. 2, 2013.
- ROOS, W. P.; THOMAS, A. D.; KAINA, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2016.
- RUNDLE, S. *et al.* Targeting the ATR-CHK1 Axis in Cancer Therapy. **Cancers**, [s. l.], v. 9, n. 12, 2017.
- SAMEER, A. S.; NISSAR, S.; FATIMA, K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 23, n. 4, 2014.
- SARGENT, D. J. *et al.* Defective Mismatch Repair As a Predictive Marker for Lack of Efficacy of Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy in Colon Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 28, n. 20, 2010.
- SARGENT, D. J.; ANDRÉ, T.; GROTHEY, A. Further Evaluating the Benefit of Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 34, n. 30, 2016.
- SAWAYA, S. *et al.* Microsatellite Tandem Repeats Are Abundant in Human Promoters and Are Associated with Regulatory Elements. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2013.
- SAWICKI, T. *et al.* A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>.
- SCHMIDT, M. H. M.; PEARSON, C. E. Disease-associated repeat instability and mismatch repair. **DNA Repair**, [s. l.], v. 38, 2016.
- SCULLY, R. *et al.* DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 20, n. 11, 2019.
- SHARIF, S. *et al.* FOLFOX and FLOX Regimens for the Adjuvant Treatment of Resected Stage II and III Colon Cancer. **Cancer Investigation**, [s. l.], v. 26, n. 9, 2008.
- SHAUKAT, A. *et al.* ACG Clinical Guidelines: Colorectal Cancer Screening 2021. **American Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 116, n. 3, 2021.
- SHAW, E. *et al.* Effects of physical activity on colorectal cancer risk among family history and body mass index subgroups: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2018.
- SHIM, E. Y. *et al.* Saccharomyces cerevisiae Mre11/Rad50/Xrs2 and Ku proteins regulate association of Exo1 and Dna2 with DNA breaks. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 29, n. 19, 2010.

SINICROPE, F. A. *et al.* Randomized trial of standard chemotherapy alone or combined with atezolizumab as adjuvant therapy for patients with stage III colon cancer and deficient mismatch repair (ATOMIC, Alliance A021502). **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 37, n. 15_suppl, 2019.

SIRAVEGNA, G. *et al.* Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 7, 2015.

SLADE, D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. **Genes & Development**, [s. l.], v. 34, n. 5–6, 2020.

SMEBY, J. *et al.* CMS-dependent prognostic impact of KRAS and BRAFV600E mutations in primary colorectal cancer. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 5, 2018.

SUGIMOTO, K. *et al.* Proposal of New Classification for Stage III Colon Cancer Based on the Lymph Node Ratio: Analysis of 4,172 Patients from Multi-Institutional Database in Japan. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 22, n. 2, 2015.

SUN, J. *et al.* Genomic signatures reveal DNA damage response deficiency in colorectal cancer brain metastases. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2019.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA CANCER J CLIN**, [s. l.], p. 209–2049, 2021. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>. Acesso at: 4 Sep. 2021.

SVEEN, A.; KOPETZ, S.; LOTHE, R. A. Biomarker-guided therapy for colorectal cancer: strength in complexity. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2020.

SYED, A.; TAINER, J. A. The MRE11–RAD50–NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 87, n. 1, 2018.

TAMURA, K. *et al.* Genetic and genomic basis of the mismatch repair system involved in Lynch syndrome. **International Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 24, n. 9, 2019.

TEN HOORN, S. *et al.* Clinical Value of Consensus Molecular Subtypes in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], 2021.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**, [s. l.], v. 487, n. 7407, 2012.

THIRUNAVUKARASU, P. *et al.* C-stage in Colon Cancer: Implications of Carcinoembryonic Antigen Biomarker in Staging, Prognosis, and Management. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 103, n. 8, 2011.

THOTA, R. *et al.* APC and TP53 as potential biomarkers for EGFR sensitivity in colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 38, n. 15_suppl, 2020.

TIAN, L. *et al.* Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming. **Nature**, [s. l.], v. 544, n. 7649, 2017.

TOH, J. W. T. *et al.* Rate of dissemination and prognosis in early and advanced stage colorectal cancer based on microsatellite instability status: systematic review and meta-analysis. **International Journal of Colorectal Disease**, [s. l.], v. 36, n. 8, 2021.

TOMASINI, P. P. *et al.* Analyzing the Opportunities to Target DNA Double-Strand Breaks Repair and Replicative Stress Responses to Improve Therapeutic Index of Colorectal Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 13, 2021.

TUBBS, A.; NUSSENZWEIG, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. **Cell**, [s. l.], v. 168, n. 4, 2017.

VAN CUTSEM, E. *et al.* ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 27, n. 8, 2016.

VAN WILPE, S. *et al.* Homologous Recombination Repair Deficiency and Implications for Tumor Immunogenicity. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 9, 2021.

VENDERBOSCH, S. *et al.* Mismatch Repair Status and BRAF Mutation Status in Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Pooled Analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS Studies. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 20, n. 20, 2014.

VERHOEFF, S. R. *et al.* Adjuvant chemotherapy is not associated with improved survival for all high-risk factors in stage II colon cancer. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 139, n. 1, 2016.

VODICKA, P. *et al.* DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 843, 2019.

WANG, Z. *et al.* Comutations in DNA Damage Response Pathways Serve as Potential Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade. **Cancer Research**, [s. l.], v. 78, n. 22, 2018.

WANG, R.; WANG, M.-J.; PING, J. Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Colorectal Cancer in Young Versus Elderly. **Medicine**, [s. l.], v. 94, n. 35, 2015.

WARSCHKOW, R. *et al.* Better survival in right-sided versus left-sided stage I - III colon cancer patients. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2016.

WATSON, M. M. C.; BERG, M.; SØREIDE, K. Prevalence and implications of elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides in cancer. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 111, n. 5, 2014.

WEISER, M. R. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 25, n. 6, 2018.

WONG, M. C. S. *et al.* Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 955-966.e61, 2021.

WONG, S. L. Lymph Node Evaluation in Colon Cancer. **JAMA**, [s. l.], v. 306, n. 10, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics 2020: Monitoring Health for the SDGs, Sustainable Development Goals**. Geneva: [s. n.], 2020.

XIE, Y.-H.; CHEN, Y.-X.; FANG, J.-Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2020.

YAMAMOTO, H.; IMAI, K. An updated review of microsatellite instability in the era of next-generation sequencing and precision medicine. **Seminars in Oncology**, [s. l.], v. 46, n. 3, 2019.

YANG, M. *et al.* Repurposing EGFR Inhibitor Utility in Colorectal Cancer in Mutant APC and TP53 Subpopulations. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s. l.], v. 28, n. 7, 2019.

YANG, G.; ZHENG, R.; JIN, Z. Correlations between microsatellite instability and the biological behaviour of tumours. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [s. l.], v. 145, n. 12, 2019.

YUAN, H. *et al.* Lymphovascular invasion is a high risk factor for stage I/II colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 28, 2017.

YUKI, S. *et al.* Analysis of consensus molecular subtypes (CMS) classification in the TRICOLORE trial: A randomized phase III trial of S-1 and irinotecan (IRI) plus bevacizumab (Bmab) versus mFOLFOX6 or CapeOX plus Bmab as first-line treatment for metastatic colorectal cancer (mCRC). **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 38, n. 4_suppl, 2020.

ZHANG, M.-R. *et al.* Prognostic role of the lymph node ratio in node positive colorectal cancer: a meta-analysis. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 45, 2016.

ZHAO, C. *et al.* Meta-analysis of observational studies on cholecystectomy and the risk of colorectal adenoma. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 375–381, 2012.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscript title: *MRE11* as a potential prognostic biomarker for sporadic colorectal cancer

Daniel de Barcellos Azambuja, MD, MSc.^{1,2}, Helena de Castro e Gloria, MSc.¹, Gabriel e Silva Montenegro¹, PhD. ^{1,2}, Natalia Motta Leguisamo, PhD^{1,2}, Antonio Nocchi Kalil, MD ¹, Jenifer Saffi, PhD.^{1#}

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

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

#Correspondent author.

Journal of Surgical Oncology

Abstract

Background: Up to 20% of patients with sporadic colorectal cancer (CRC) harbor alterations in homologous recombination repair (HRR) pathway, which may lead to HRR deficiency (HRD). It has been suggested that HRD is strongly enriched in CRC harboring mismatch repair deficiency (dMMR). However, the prognosis of CRC patients according to alterations in HRR and MMR status is mostly unknown.

Objective: to evaluate the expression levels of key representative HRR genes in sporadic colon cancer cases and investigate their prognostic value. **Methods:** Tumor specimens and matched healthy tissues from 86 patients with sporadic colorectal adenocarcinoma who underwent surgery were collected. Of these, 63 were assessed for gene expression of HRR key-components and MMR status. We explored the correlations of HRR gene expression with clinicopathological features, progression-free survival (PFS), and overall survival (OS). **Results:** Five of seven key representative HRR genes were differentially expressed - *MRE11A*, *RAD50*, *BARD1*, *BRCA1*, and *PALB2*. Only *MRE11A* deficiency was confirmed as an independent predictor of OS (HR: 5.48, IC 95% [1.26 - 19.04] p= 0.032). *MRE11A* status was identified as an independent prognostic factor in proficient MMR (pMMR) CRC (HR= 3.48 [IC 95% 1.97 – 12.45], p= 0.035), but not in dMMR. Longest mean OS was observed in *MRE11A* positive/pMMR patients (64.1 months), while *MRE11A* positive/dMMR presented the shortest OS across subgroups (34.5 months). **Conclusion:** *MRE11A* expression is a potential predictor of pMMR CRC prognosis. These results may provide a rationale for further investigations of novel biomarkers and therapeutic approaches based on MRE11 targeting for CRC.

Keywords: colorectal cancer; homologous recombination repair; inflammation-based scores; prognosis.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a common diagnosed malignant neoplasm, which ranks third among all cancers in terms of incidence and second in terms of mortality worldwide[1]. Inconsistencies within TNM stages of CRC patients have been widely reported, mostly due to contradictions in survivorship of patients harboring stages IIB/C or IIIA disease [2-4]. Moreover, the therapeutic repertoire for CRC remains limited, with few targeted agents and companion diagnostics endorsed for clinical use [5]. Despite the efforts to identify a molecular signature to improve prognosis prediction and CRC patients selection [6-8], a biomarker-enriched classification has not reached clinical translation so far.

DNA repair and DNA damage response (DDR) deficiencies are fundamental sources of genome mutability and instability. Some of these defects have been endowed for clinical practice as predictive biomarkers for several tumors [9]. Regarding CRC, immunotherapy with anti-PD-1 or anti-PD-L1 is the preferred option for metastatic disease with mismatch repair (MMR) deficiency [10]. While deficient MMR pathway (dMMR) occurs to 5%–20% of all CRC cases (20%, 11% and 5% of CRC in stages II, III and IV, respectively) [11]. Testing for MMR status (or the resulting phenotype, microsatellite instability, MSI) has been currently recommended for all stages CRC for Lynch's Syndrome investigation or in sporadic CRC stages II and IV to predict prognosis and the benefit of adjuvant 5-fluorouracil/capecitabine or pembrolizumab [12-13]. Beyond MMR, *RAS* and *BRAF* in stage IV CRC predict the benefit to targeted-therapies with anti-EGFR and anti-BRAF, respectively [13]. Unfortunately, for patients with stages I and III disease, none of these molecular alterations have proven prognostic or predictive value [14]. Also, for patients with early-

stage disease or metastatic disease with RAS mutations, wild-type BRAF or proficient MMR (pMMR), chemotherapy-based regimens remain the only therapeutic option.

However, the analyses of public colon and rectum databases have suggesting an emerging role for another DNA repair system, the homologous recombination repair pathway (HRR) [15]. HRR is involved with identification and repair of double-strand breaks (DSBs), which are the most lethal DNA lesion, eliciting the majority of the cytotoxic effects induced by ionizing radiation, platinum salts and topoisomerase inhibitors [16]. HRR is activated after DNA replication, primarily in the late S/G2 phase, and uses the undamaged sister chromatid as template. The highly conserved MRN complex, which comprises the MRE11, RAD50, and NBS1 (encoded by *NBN*) proteins, is one of the first factors to sense and bind DSBs. MRN complex in conjunction with CtIP, also known as RBBP8, coordinates tethering and short-range nucleolytic degradation of DSBs ends. In the central step of HRR, BRCA2 alongside with BRCA1 and PALB2 delivers RAD51 monomers to single stranded DNA, resulting in RPA removal and RAD51 presynaptic filament formation required for strand invasion and homology search [16], [17].

Germline *BRCA1* or *BRCA2* inactivating mutations in breast and ovarium tumors are considered the archetype of HRR deficiency (HRD) and have raised attention into the search for additional causes of HRD in other tumors, including CRC [18]. In order to repair DSBs, HRD tumors rely on other DDR pathways, particularly non-homologous end-joining (NHEJ), and PARP proteins [19], [20]. HRR deficiencies grant higher sensitivity to alkylating or platinum-based agents as a result of generation of non-processed and highly toxic DSBs [21], [22]. Also, these tumors are highly sensitive to targeted therapy with PARP inhibitors, which lead to a synthetic lethal response by blocking NHEJ [23]. Recently, PARP inhibitors have been approved for

tumors with HRD arising from other deleterious mutations than *BRCA1/2*, including germline or somatic mutations in *ATM* and *PALB2* [24].

Recent data have demonstrated that between 10-30% of colorectal tumors harbor somatic DDR mutations, which are more likely to result in resistance to therapy and a poor prognosis [25], [26]. Among these, germline pathogenic variants of *BRCA1*, *ATM* and *PALB2* have been associated with greater CRC risk, and up to 15% of all CRC present germline or somatic alterations in HRR repair genes [27]. Moreover, it has been suggested that a subset of CRC patients, particularly those with dMMR, harbors mutations in HRR genes, including *ATM*, *BRCA1/2*, *MRE11A*, *FANCC*, *NBN*, *PALB2* [28]. Interestingly, it has been also reported that 10% of pMMR CRC present high tumor mutational burden, PD-L1 positive and immune-enriched microenvironment [29], which demonstrates the immunogenic role for DDR deficiencies and paves the way for the exploitation of immune checkpoint inhibitors in MMR proficient HRD tumors.

The HRD phenotype can also occur following genetic and epigenetic inactivation of other HRR components than *BRCA1/2* in sporadic cancer, which leads to the so-called *BRCAness* signature [30]. Therefore, understanding HRR status in CRC is particularly enthusiastic as it may shed a light on clinicopathological features of interest across disease stages and create insights to expand therapeutic options for those who harbor suboptimal response to chemotherapy or lack of benefit from current approved targeted-therapies or immune checkpoint blockers.

Methods

Patients and tissue collection

This study was conducted in Santa Rita Hospital (Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brazil). Patients with histologically confirmed adenocarcinoma of the colon and rectum and who were admitted to colorectal surgery were eligible. Patients with non-primary CRC, familial adenomatous polyposis or inflammatory bowel disease were excluded. Variables of interest included age, gender, date of surgical resection, primary location, tumor grade, laterality, vascular invasion, perineural invasion, preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) levels, and treatment. Histopathological data (such as tumor subtype, depth of invasion, lymph node and/or metastasis distance and staging) were also extracted from the pathological reports. The pathological TNM stage was used as the staging scale for prognosis [31]. Outcomes of interest were progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). PFS was defined as the time from diagnosis to first recurrence or death, whichever came first. OS was defined as the time from diagnosis to last follow-up or death.

A total of 86 primary tumor samples from patients operated for CRC stages I-IV between March 2013 and June 2021 were included. At least 2 fresh tissue specimens were collected from each patient's surgical specimen: full thickness colorectal tumor and adjacent normal colon or rectum tissue at least 10 cm away from the largest tumor. Neoplastic and healthy tissues were immediately embedded in RNAlater™ stabilization solution (Invitrogen) for 24 hours, and then frozen for subsequent analyses. The data of CRC series was collected prospectively; patients were informed and signed a written consensus for collecting data and biological samples. The

research conformed to the Helsinki Declaration and was approved by the Regional Committee for Medical and Health Research Ethics (CAAE: 58299916.3.3001.5345).

Gene expression analysis and HRD assessment

Total RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen), and cDNA synthesis was performed in 20- μ l reaction with 1 μ g of total RNA using RT² FirstStrand Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR was performed in duplicates using RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen) and StepOne Plus apparatus (Applied Biosystems™). Custom RT² Profiler PCR Array (#CLAH-32033-9619-6, Qiagen) included *MRE11A*, *RAD50*, *NBN*, *BRCA1*, *BARD1*, *RBBP8* and *PALB2* genes. Threshold cycle (Ct) values for each duplicate were normalized by geometric average of housekeeping genes *ACTB* and *PPIA*. Averages of the resulting values were calculated to obtain Δ Ct values for biological replicates. Relative mRNA (ratio between Δ Ct in neoplastic tissue/ Δ Ct in healthy tissue) was calculated and a log₂ transformation was applied. Gene expression was dichotomized into "high" and "low" according to the median fold change of each HRR gene (expression \leq median = low; expression $>$ median = high). We also classified a gene with a fold change $>$ - 2.0 as "deficient", i.e. the gene expression was significantly reduced in tumor tissue [32].

Investigation of microsatellite instability

Immunohistochemical analysis for the expression of MMR proteins (MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6) was evaluated by immunohistochemistry. Briefly, 3- μ m thick FFPE tissue sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in graded alcohols, washed in double-distilled water, and pretreated with DAKO solution (EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH) at 97 °C. The slides were then incubated with primary monoclonal antibodies against MLH1 (clone ES05, DAKO), PMS2 (clone EP51, DAKO), MSH2 (clone FE11, DAKO), and MSH6 (clone EP49, DAKO) plus EnVision FLEX+ Mouse (LINKER) for 30 min. The analysis was performed on the automated platform Autostainer Link 48 (Dako, Carpinteria, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The antigen-antibody reaction was inspected with the EnVision FLEX kit with diaminobenzidine as chromogen, slides were counterstained with hematoxylin and, finally, covered. MMR protein expression was categorized as : retained (i.e., proficient MMR; pMMR), when a moderate to strong nuclear protein expression was detected in tumor cells as well as in internal control; and lost (i.e., deficient MMR ; dMMR), when a complete loss of nuclear expression in tumor cells was observed, but retained in normal cells.

Inflammation-Related Peripheral Blood Measurements

Absolute count of circulating neutrophils, lymphocytes and platelets are associated with inflammatory responses, which are key factors in recognition of pathways for tumorigenesis and growth [33]. Thus, we calculated neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) from absolute counts of pretreatment peripheral blood tests.

subgroups were divided using the median expression value (expression \leq median = low; expression $>$ median = high).

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics 25.0. OS and PFS rates were estimated using the Kaplan-Meier method. The log-rank test was used to assess for significant differences between subgroups by univariate analysis. To investigate independent prognostic factors for OS and PFS, factors with a $p < 0.2$ in univariate analyses were entered into a multivariate analysis. The Cox proportional hazards regression model was used to identify factors that were independently associated with OS. Pearson's chi-squared test and Fisher's exact test were used to evaluate distributions of categorical variables. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Availability of data and Materials

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

Results

Characteristics of CRC patients

A total of 63 patients with histologically confirmed sporadic colorectal adenocarcinoma and who underwent surgical tumor resection were included in this study. Clinicopathological features are summarized in **Table 1**. Forty-nine patients (57.0%) were male, mean age at CRC diagnosis was 63.9 (41- 87) years old, and 56.3% were < 65 years old. Fifty-five patients (64.0%) presented primary tumor location in colon. Among these, thirty-nine patients (70.9%) harbored left-sided CRC. Forty-one patients (47.6%) were diagnosed at TNM stage I-II and forty-six (52.4%) in stage III-IV. Preoperative CEA < 5 ng/dL was observed in 59 patients (68.6%). Fifty-four patients (62.8%) presented moderate or high tumor grade. Sixty-eight patients were assessed for MMR repair status by immunohistochemistry of MLH1, PMS2, MSH2 and PMS6, and dMMR/MSI was identified in 11.6%. Representative patterns of MMR protein staining are depicted in **Figure 1**. At the time of data analysis, twenty-one patients (24.4%) had reported disease progression, and fifty-nine (68.6%) patients were still alive.

Table 1. Clinicopathological characteristics of CRC patients.

Variable	n (%)	p value
Total cases	86 (100)	
Age (years; mean \pm SD)	63.9 \pm 12.05	
Age (years)		
\leq 65	46 (53.5)	0.590
$>$ 65	40 (46.5)	
Gender		
Female	37 (43.0)	0.235
Male	49 (57.0)	
Primary Tumor location		
Colon	55 (64)	0.013
Rectum	31 (36.0)	
Laterality (Colon)		
Right-sided	16 (29.1)	0.003
Left-sided	39 (70.9)	
Preoperative CEA, ng/mL		
\leq 5	59 (68.6)	<0.001
$>$ 5	20 (23.3)	
Missing	7 (8.1)	
pT		
1	3 (3.5)	<0.001
2	20 (23.3)	
3	57 (66.3)	
4	6 (7.0)	
pN		
0	44 (51.2)	0.910
1	27 (31.4)	
2	15 (17.4)	
Tumor Grade		
Poorly differentiated	32 (37.2)	0.023
Moderately/highly differentiated	54 (62.8)	
Lymphatic invasion		
No	45 (52.3)	0.747
Yes	41 (47.7)	
Perineural invasion		
No	66 (76.7)	<0.001
Yes	20 (23.3)	
MMR status		
pMMR/MSS	58 (67.4)	< 0.001
dMMR/MSI	10 (11.6)	
Missing	18 (20.9)	
TNM stage		
I	15 (17.4)	0.431
II	26 (30.2)	
III	33 (38.4)	
IV	12 (14.0)	
Chemotherapy		
Neoadjuvant	22 (25.6)	0.844
Adjuvant	30 (34.9)	
Both	34 (39.5)	
Recurrence		
No	65 (75.6)	<0.001
Yes	21 (24.4)	
Survival		
Alive	59 (68.6)	<0.001
Dead	27 (31.4)	

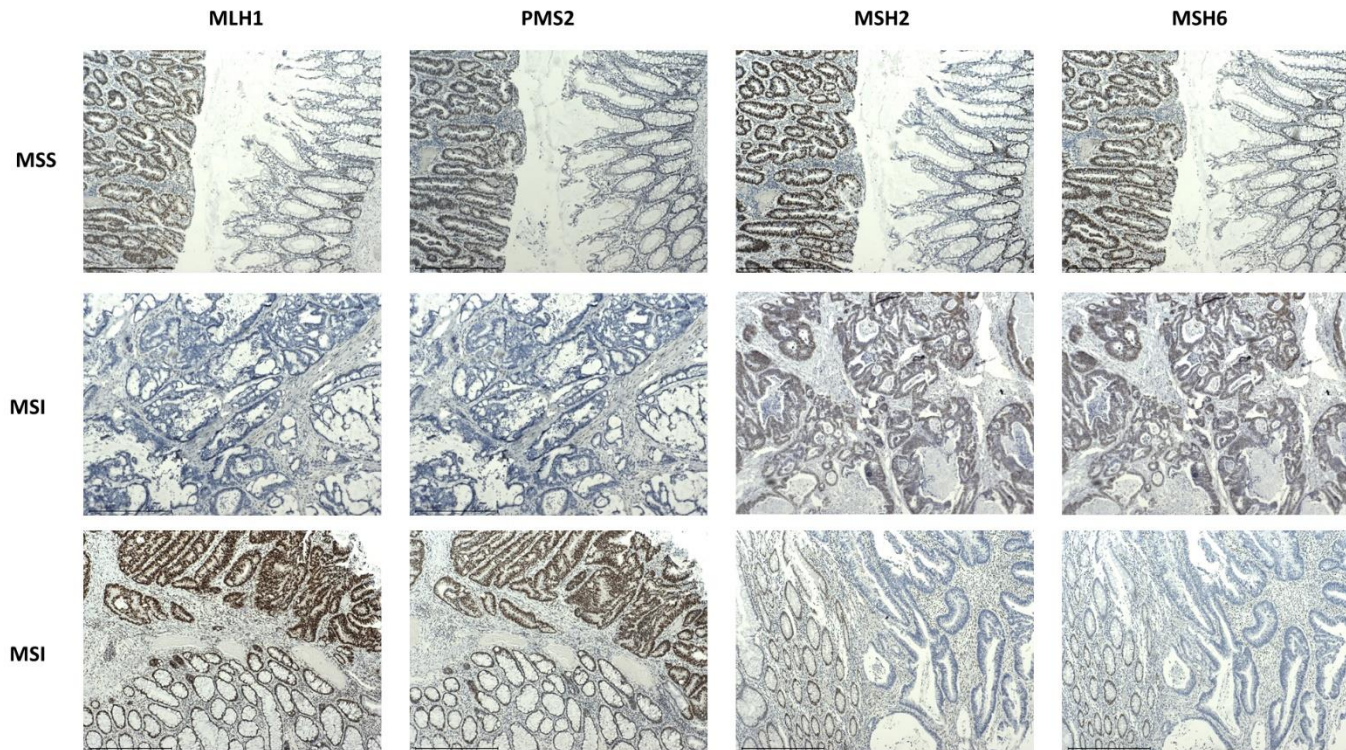


Figure 1. Representative images of MSI panel by immunohistochemistry.(A) MMR proficient/MSS CRC; MMR deficient/MSI CRC due to loss of (B) MLH1/PMS2 expression or (C) MSH2/MSH6 expression. Original magnification 100x.

Patterns of HRR gene expression in colorectal tumors and healthy tissues

The mRNA levels for *MRE11A*, *RAD50*, *NBN*, *BRCA1*, *RBBP8* and *PALB2* were quantified using qPCR in 63 pairs of primary sporadic colorectal tumors and matched adjacent tissues. *MRE11A* ($p < 0.001$), *BARD1* ($p < 0.001$) and *PALB2* ($p < 0.001$) were overexpressed, while *RAD50* ($p < 0.001$) mRNA levels were reduced in comparison to healthy tissues. However, for *NBN*, *BRCA1* and *RBBP8*, mean tumor gene expression did not differ from adjacent normal tissues (**Figure 2A**). *RAD50* presented a mean -2.15-fold reduction ($p < 0.001$). Conversely, *MRE11A*, *BRCA1*, *BARD1* and *PALB2* exhibited a mean 3.28 ($p < 0.0001$), 2.09 ($p = 0.03$), 2.83 ($p < 0.0001$) and 3.64 ($p < 0.0001$) fold induction, respectively (**Figure 2B**).

Additionally, we explored the number of low and high expressed HRR genes concomitantly on each colorectal tumor sample and the fold-change patterns across different MMR status (**Figure 3**). Each colorectal tumor sample presented a mean of three downregulated HRR genes. Five patients (5.8%) presented 5 deficient HRR genes concomitantly, i.e., with a fold-change > -2.0 , and 10 patients (11.6%) harbored tumors with all HRR normally expressed (**Figure 3B**). *MRE11A* mean fold-change difference was significantly lower in dMMR/MSI colorectal tumors (-2.43, IC 95% -4.96 – 0.10; $p = 0.039$) (**Figure 3C**). Fold-change difference and T-test results for equality of means are detailed in **Supplementary Table 1**.

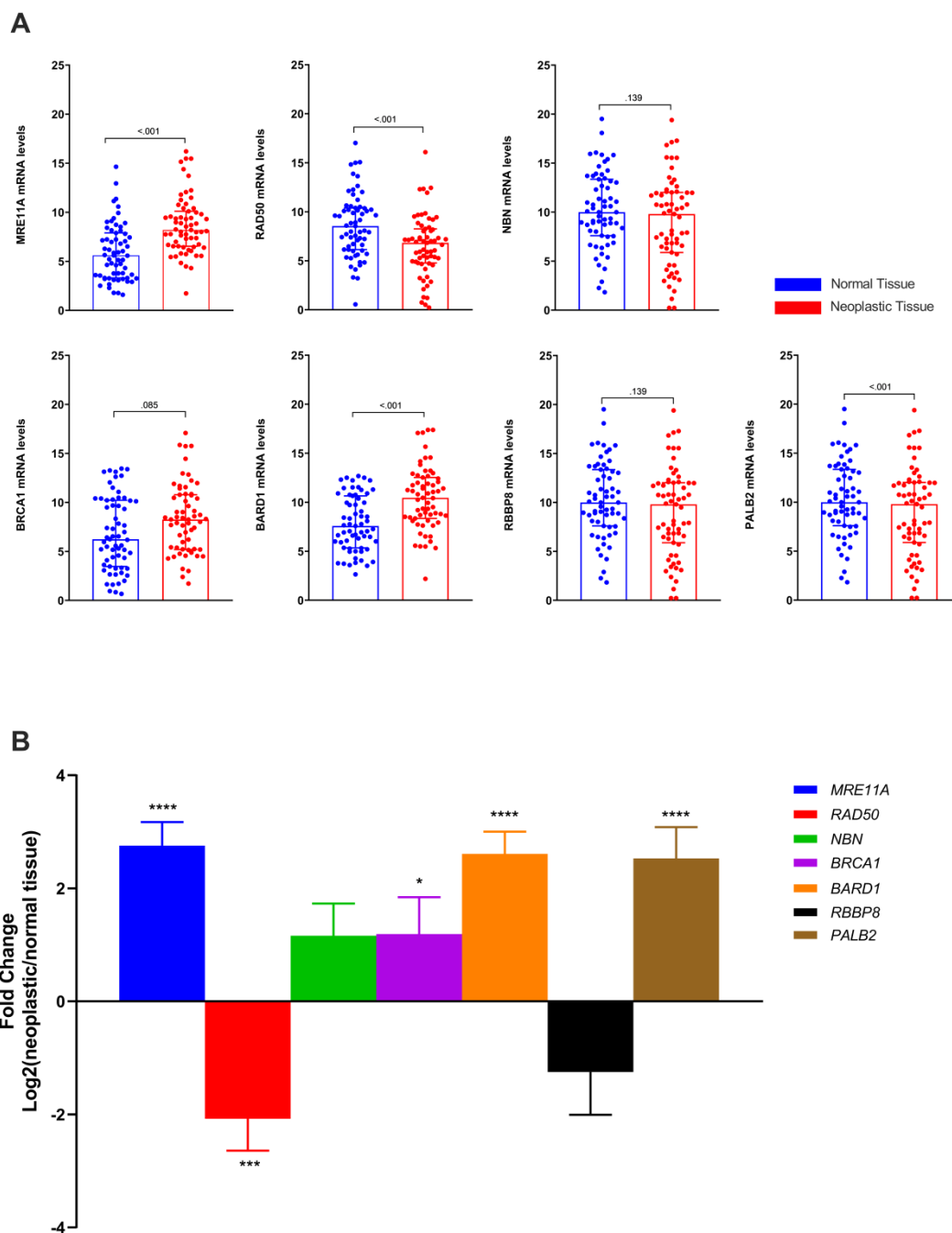


Figure 2. Changes in gene expression of representative HRR components in neoplastic colorectal specimens and matched healthy tissues. **(A)** Gene expression was obtained from 48 sporadic CRC; **(B)** Fold change between neoplastic and normal tissues. Gene expression means between normal and neoplastic tissue were compared using Mann-Whitney's test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

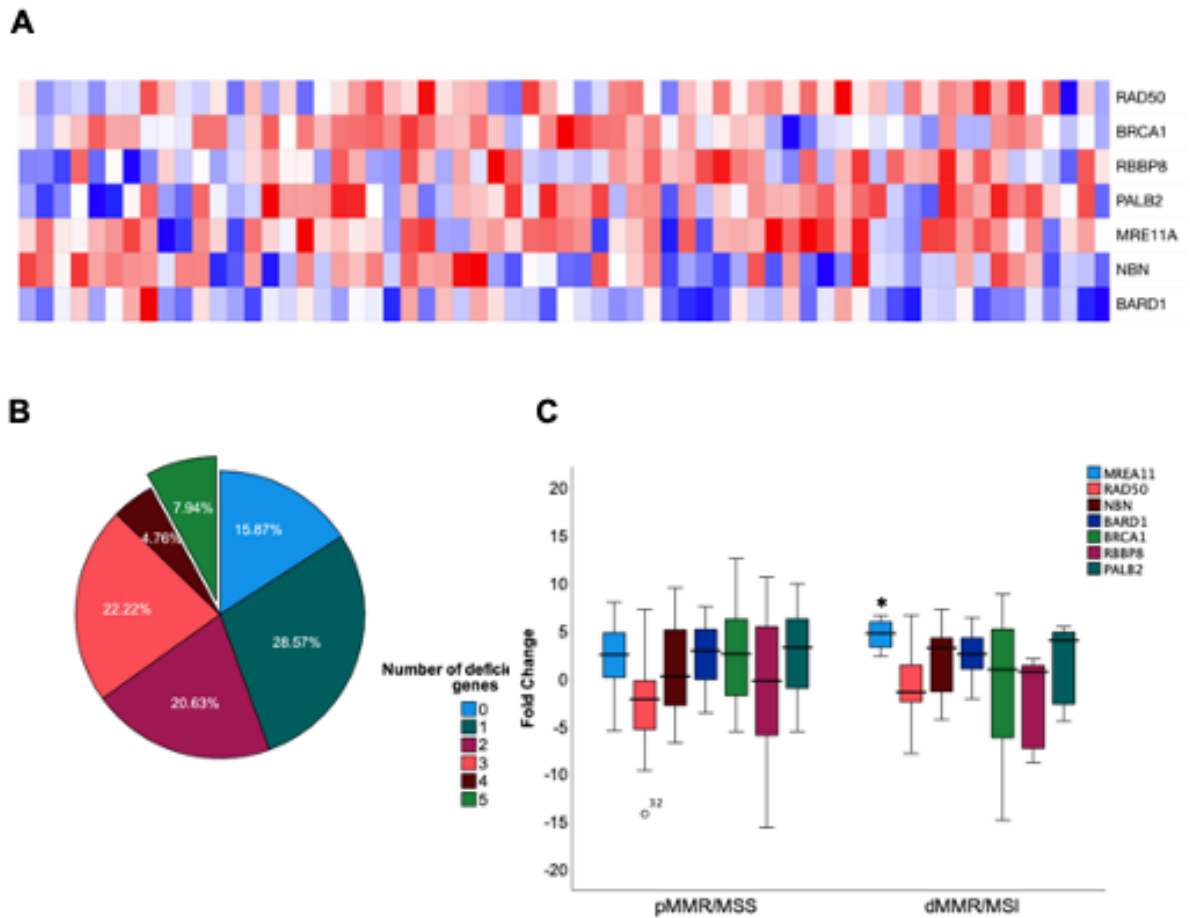


Figure 3. Characterization of HRR profile in CRC patients. (A) Heatmap showing the individual gene expression fold-change of HRR key-components in colorectal tumors. Blue represents the expression \leq median = low; red represents the expression $>$ median = high; (B) proportions of patients according to the number of deficient HRR genes in tumor samples (fold change $>$ -2.0); (C) boxplots of HRR genes fold change means according to MMR status. T-test for equality means. *p (2-sided) $<$ 0.05.

Associations between changes in HRR gene expression in colorectal neoplasms and clinicopathological features

Next, we investigated the possible associations between clinicopathological features of CRC patients and gene expression of *MRE11A*, *RAD50*, *NBN*, *BRCA1*, *RBBP8* and *PALB2* (**Table 2**). Low expression of *MRE11A* was found in 74% ($p=0.005$) was associated to occurrence of primary tumors in rectum instead of colon. Low expression of *MRE11A* was also found in 93% ($p=0.007$) of left-sided CRC, 65% ($p=0.041$) of the poorly differentiated tumors and 75% ($p=0.024$) of T1-T2 tumors. Conversely, overexpression of *MRE11A* was found in 92% ($p=0.007$) of right-sided CRC, 68% of tumors ≥ 5 cm ($p=0.007$) and 75% ($p=0.046$) of dMMR/MSI tumors. Low expression of *RAD50* was found in 68% of left-sided CRC ($p=0.049$) and increased *RAD50* mRNA levels occurred in 75% of colorectal tumors with no lymphovascular invasion ($p=0.007$). Low expression of *NBN* was found in 75% of tumors in T1-T2. Low expression of *BARD1* was found in 65% of patients with metastatic lymph nodes ($p=0.042$). Low expression of *RBBP8* was found in 84% of tumors with greater invasive depth (T3-T4) ($p=0.044$). Finally, low expression of *PALB2* was found in 65% ($p=0.040$) of primary tumors located in rectum, without lymphovascular invasion ($p=0.047$), node positive disease (63%, $p=0.031$) and advanced disease stages ($p=0.048$).

Table 2. Associations between fold-change of *MRE11A*, *RAD50*, *NBN*, *BRCA1*, *BARD1*, *RBBP8*, and *PALB2* gene expression and clinical features of CRC patients.

		<i>MRE11A</i>	<i>RAD50</i>	<i>NBN</i>	<i>BARD1</i>	<i>BRCA1</i>	<i>RBBP8</i>	<i>PALB2</i>
Age at diagnosis	χ^2	0.453	0.390	0.790	0.781	0.405	0.148	1.942
	<i>p</i>	0.262	0.355	0.543	0.564	0.262	0.448	0.127
Tumor site	χ^2	7.747	1.972	0.476	1.471	0.028	0.028	3.015
	<i>p</i>	0.005*	0.122	0.335	0.171	0.538	0.538	0.040
Laterality	χ^2	7.301	2.857	2.162	0.010	1.026	0.114	1.015
	<i>p</i>	0.007*	0.049*	0.129	0.592	0.250	0.500	0.252
CEA	χ^2	1.802	1.429	0.800	0.022	0.022	1.429	0.089
	<i>p</i>	0.148	0.185	0.276	0.560	0.560	0.185	0.489
Tumor size	χ^2	3.704	0.406	1.429	1.429	1.429	0.229	1.429
	<i>p</i>	0.040*	0.360	0.180	0.180	0.180	0.421	0.180
Tumor grade	χ^2	3.015	0.776	0.128	1.471	1.471	1.972	1.471
	<i>p</i>	0.041*	0.268	0.462	0.171	0.171	0.127	0.171
Lymphovascular invasion	χ^2	0.765	0.019	0.019	0.019	0.136	0.019	2.733
	<i>p</i>	0.267	0.546	0.546	0.546	0.454	0.546	0.047*
Perineural invasion	χ^2	0.005	5.709	2.167	1.176	1.516	0.423	1.516
	<i>p</i>	0.585	0.017	0.084	0.214	0.173	0.358	0.173
Tumor invasive depth	χ^2	5.028	0.005	5.028	1.176	0.255	3.278	0.426
	<i>p</i>	0.024*	0.585	0.024*	0.214	0.415	0.044*	0.358
Nodal metastasis	χ^2	0.067	0.003	0.323	3.284	1.180	0.003	4.504
	<i>p</i>	0.501	0.583	0.379	0.042*	0.204	0.583	0.031*
TNM stage	χ^2	0.384	0.013	0.813	1.985	0.813	0.156	3.671
	<i>p</i>	0.357	0.556	0.259	0.124	0.259	0.444	0.048*
MMR status	χ^2	3.866	0.002	0.836	0.018	0.302	0.259	0.018
	<i>p</i>	0.046*	0.650	0.300	0.598	0.433	0.456	0.598

χ^2 test and Fisher's exact test. *Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed); **Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). CEA: Carcinoembryonic Antigen; LMR: Lymphocyte-to-monocyte-ratio; NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio; MMR, mismatch repair.

Considering that systemic inflammatory factors also promote cancer growth and metastasis [34] and the crosstalk between DNA damage response and inflammation [35], we investigated the possible associations of perioperative absolute counts of lymphocytes, neutrophils, monocytes and platelets and their derived inflammation-based indexes with HRR gene expression profile (**Figure 3**). Median values NLR, LMR and PLR (2.78, 2.11 and 115.96, respectively) were used as a cut-off to determine subgroups with low (\leq median) or high ($>$ median) inflammatory blood indexes. Mean fold-change differences were significantly higher for *BRCA1* (3.65, IC 95% [1.18 - 6.12], $p=0.04$) and *PALB2* (2.29, IC 95% [0.13 - 4.45], $p=0.038$) in patients with low NLR (**Supplementary Table 2**). Associations of these indexes with clinicopathological features of CRC patients were also explored. Of note, high LMR was present in 81%

of left-sided CRC, and low LMR occurred in 72% of high-grade tumors. Low NLR was associated with tumor size (84% in tumors < 3 cm), and low PLR was present in 84% of the patients with colon tumors (**Supplementary Table 3**).

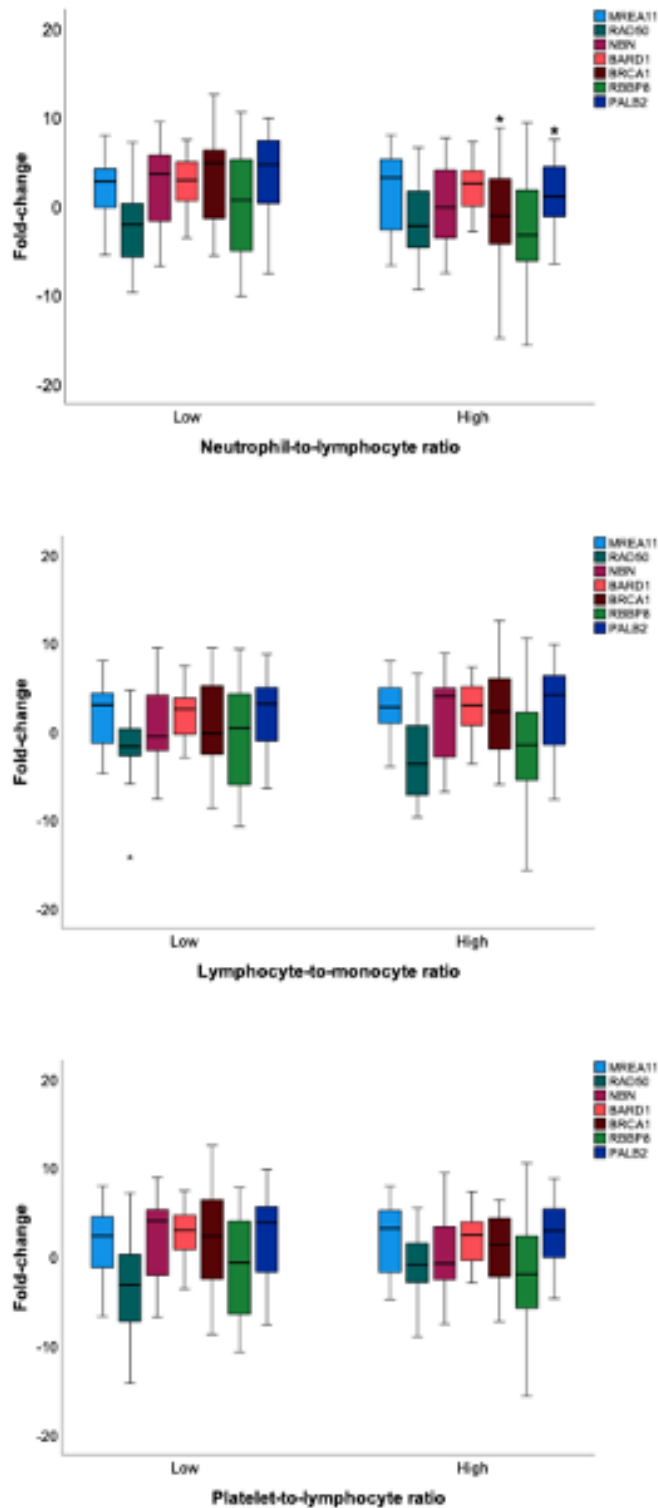


Figure 4. Fold-change of HRR representative genes according to composite inflammatory blood indexes. T-test for equality means. *p < 0.05.

Prognostic value of gene expression of HRR key components and clinicopathological features in CRC patients

Using univariate and multivariate analysis, we investigated clinicopathological characteristics with prognostic influence in PFS and OS. Univariate analysis of PFS (**Table 3**) identified as possible independent prognostic features: age ($p= 0.005$), perineural invasion ($p=0.097$), TNM III-IV stages ($p= 0.031$), NLR ($p= 0.106$), PLR ($p= 0.163$), MMR status ($p= 0.138$), *MRE11A* ($p= 0.191$) and *BRCA1* status ($p= 0.145$). Tests of model coefficients (which included variables with $p < 0.2$ in univariate analysis) reached statistical significance ($p= 0.037$). Only age > 65 years old (HR 13.76, CI 95% [1.53 – 23.85], $p= 0.019$) and TNM stages III-IV (HR 8.86, CI 95% [1.75 – 86.16], $p= 0.044$) showed an independent prognostic value. Mean PFS for patients with > 65 years was 45.2 and 37.7 months for TNM I-II and III-IV CRC, respectively. CRC diagnosis at older age is a poor prognostic factor irrespective of TNM stage, as shown in adjusted PFS Kaplan-Meier plots and hazard ratios in **Figure 5**.

Table 3. Univariate and multivariate analyses of progression free survival of CRC patients.

Univariate Analysis		Multivariate Analysis		
Variable	p	Variable	HR (95% CI)	p
Gender	0.832			
Age	0.005	< 65 years	1.00	0.019
		> 65 years	13.76 (1.53 - 23.85)	
CEA	0.520			
Tumor location	0.969			
Sidedness	0.397			
Tumor size	0.868			
Tumor grade	0.897			
Tumor invasive depth (pT)	0.378			
Nodal metastasis (pN)	0.354			
Lymphovascular invasion	0.336			
Perineural invasion	0.097	No	1.00	0.598
		Yes	1.52 (0.32 - 7.33)	
TNM stage	0.031	I-II	1.00	0.044
		III-IV	8.86 (1.75 – 86.16)	
NLR	0.106	Low	1.00	0.693
		High	1.38 (0.28 - 6.73)	
LMR	0.262			
PLR	0.163	Low	1.00	0.117
		High	0.51 (0.22 – 1.18)	
MMR status	0.138	pMMR/MSS	1.00	0.540
		dMMR/MSI	1.79 (0.28 - 22.57)	
MRE11A	0.191	Normal	1.00	0.110
		Deficient	3.43 (0.75 - 5.56)	
RAD50	0.681			
NBN	0.497			
BARD1	0.633			
BRCA1	0.145	Normal	1.00	0.907
		Deficient	1.08 (0.29 - 4.02)	
RBBP8	0.881			
PALB2	0.356			

CEA: Carcinoembryonic Antigen; LMR: Lymphocyte-to-monocyte- ratio; NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio; MMR, mismatch repair; dMMR: mismatch repair deficient; pMMR: mismatch repair proficient; MSS: microsatellite stable; MSI: microsatellite instability

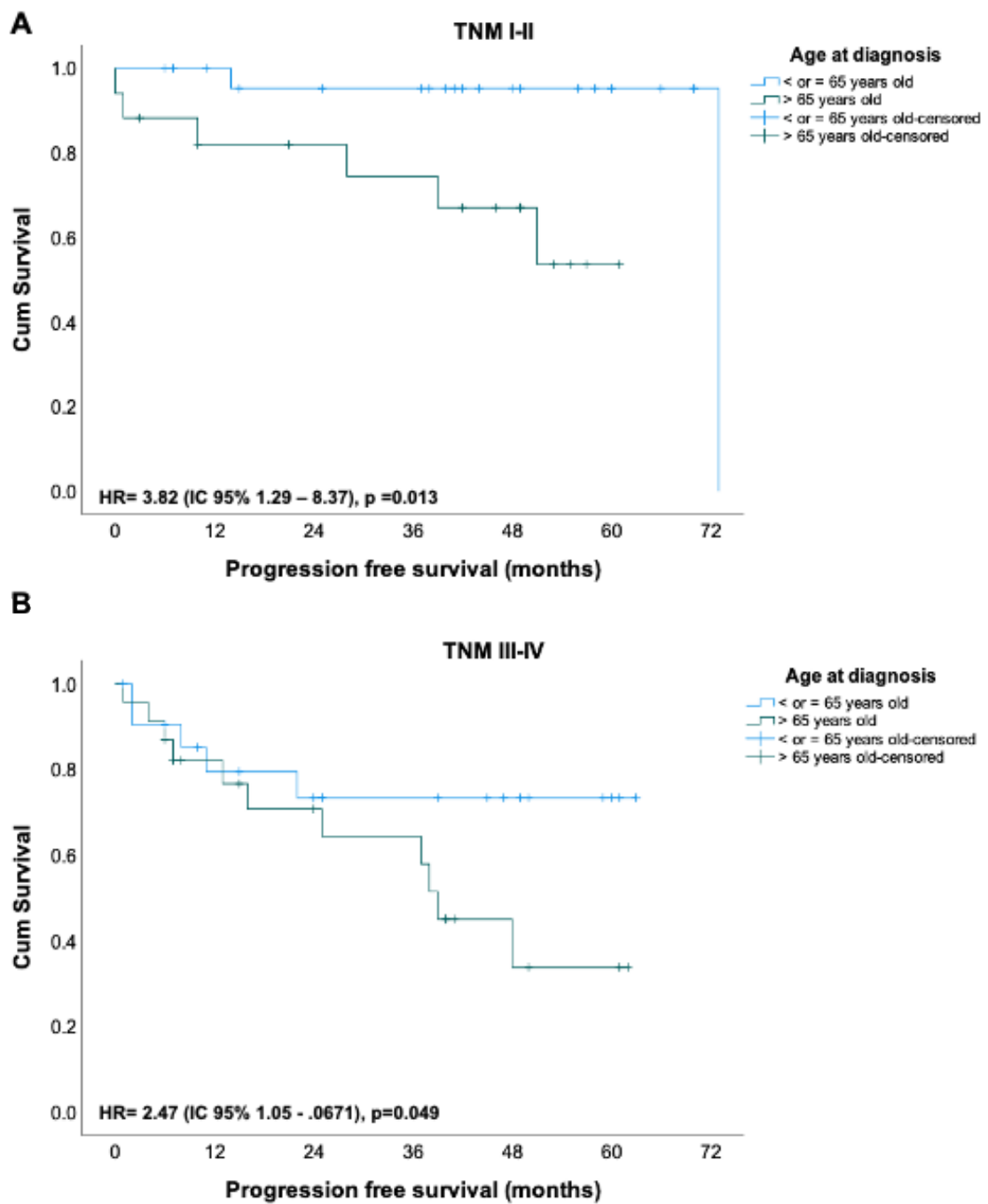


Figure 5. Kaplan-Meier plots for progression free survival adjusted by age and TNM stage. (A) TNM I-II and (B) TNM III-IV.

Mean OS was 55.4 months (IC 95% 49.6 – 60.8). Univariate analysis of molecular and clinicopathological variables identified gender ($p= 0.152$), tumor size ($p= 0.183$), tumor invasive depth ($p= 0.022$), perineural invasion ($p= 0.058$), TNM stage ($p= 0.068$), MMR status ($p= 0.020$), *MRE11A* status ($p= 0.071$) and BRCA1 status ($p= 0.134$) as candidates to independently predict the risk of death in CRC patients (**Table 4**). Tests of model reached statistical significance ($p= 0.010$). Cox regression confirmed independent prognostic value for gender (HR 0.06 IC 95% [0.01 – 0.55], $p= 0.029$), MMR status (HR: 5.38, IC 95% [1.09 – 11.99] $p= 0.44$) and *MRE11A* (HR: 5.48, IC 95% [1.26 – 19.04] $p= 0.032$). Kaplan-Meier plots for OS adjusted by *MRE11A* status are shown in **Figure 6**. *MRE11A* status adjusted for MMR proficiency presented independent prognostic value for patients with pMMR/MSS CRC (HR= 3.48 [IC 95% 1.97 – 12.45], $p = 0.035$). For patients with dMMR/MSI, a tendency for *MRE11A* independent prognostic value was observed (HR: 2.39 [IC 95%, 0.86 – 6.65], $p = 0.087$). Longest mean OS was observed in *MRE11A* positive/pMMR CRC patients (64.1 months, IC 95% 57.5 - 70.5), while *MRE11A* positive/dMMR presented the shortest OS across these subgroups (34.5 months, IC 95% 17.4 - 51.5).

Table 4. Univariate and multivariate analyses of overall survival of CRC patients.

Univariate Analysis		Multivariate Analysis		
Variable	p	Variable	HR (95% CI)	p
Gender	0.152	Male	1.00	0.029
		Female	0.06 (0.01 - 0.55)	
Age	0.296			
CEA	0.794			
Tumor location	0.343			
Sidedness	0.694			
Tumor size	0.183	< 5 cm	1.00	0.162
		> 5 cm	3.29 (0.62 - 7.15)	
Tumor grade	0.406			
Tumor invasive depth (pT)	0.022	T1-T2	1.00	0.057
		T3-T4	9.98 (0.93 - 17.14)	
Nodal metastasis (pN)	0.292			
Lymphovascular invasion	0.220			
Perineural invasion	0.058	No	1.00	0.374
		Yes	1.87 (0.47 - 7.46)	
TNM stage	0.068	I-II	1.00	0.065
		III-IV	2.73 (0.94 - 7.91)	
NLR	0.659			
LMR	0.703			
PLR	0.577			
MMR status	0.020	pMMR/MSS	1.00	0.044
		dMMR MSI	5.38 (1.09 - 11.99)	
MRE11A	0.071	Normal	1.00	0.032
		Deficient	5.48 (1.26 - 19.04)	
RAD50	0.369			
NBN	0.620			
BARD1	0.857			
BRCA1	0.134	Normal	1.00	0.237
		Deficient	1.61 (0.45 - 5.77)	
RBBP8	0.937			
PALB2	0.274			

CEA: Carcinoembryonic Antigen; LMR: Lymphocyte-to-monocyte- ratio; NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio; MMR, mismatch repair; dMMR: mismatch repair deficient; pMMR: mismatch repair proficient; MSS: microsatellite stable; MSI: microsatellite instability.

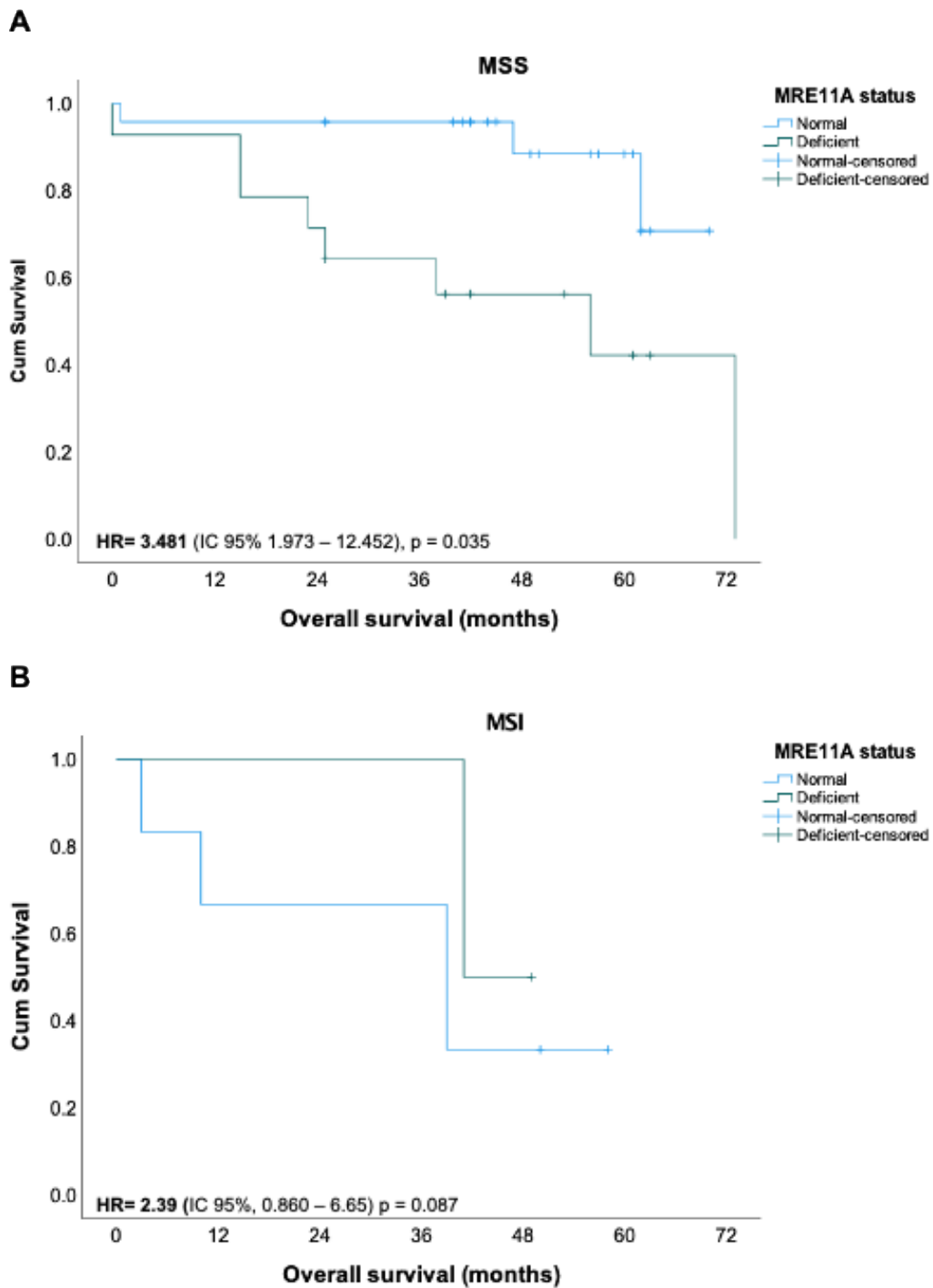


Figure 6. Kaplan-Meier plots for overall survival of CRC patients according to MMR status. (A) MMR proficient CRC; (B) MMR deficient CRC.

Discussion

Many genomic aberrations beyond germline *BRCA1/2* mutations can cause a HRD phenotype. Since DSBs repair via HRR is a multistep process with multiple proteins besides *BRCA1/2*, pathogenic variants or loss of gene encoding any of these proteins may cause HRD. Both PARP inhibitors and innovative therapies targeting other DDR pathway factors (e.g, ATM, ATR, and WEE1), are under investigation for HRD cancers, including CRC, which have HRR alterations or HRD in up to 20% of CRC cases [15], [25], [27], [28], [36], [37]. Thus, identifying additional HRD phenotypes is fundamental to expand the number of patients who could benefit from DDR inhibitors. Here, we report that five of seven key representative HRR genes are differentially expressed in colorectal tumors - *MRE11A*, *RAD50*, *BARD1*, *BRCA1*, and *PALB2*. Also, CRC patients presented downregulation of at least three HRR genes. Both up and downregulation patterns were associated with several recognized prognostic features in CRC, but only *MRE11A* demonstrated independent prognostic role.

MRE11 is essential for preserving genomic stability through its important roles in DDR, DSBs repair, and telomere maintenance [38]. In our cohort, low expression or *MRE11A* deficiency was associated with rectal, left-sided colon tumors and low grade, while overexpression was more frequently observed in right colon, larger (> 5cm) and MMR deficient tumors. Aligned to our results, previous reports have also described that upregulation of MRN complex due to *MRE11* protein and gene overexpression in colorectal tumors are associated with features of poor prognosis, including high grade, right-sided colon tumors, chemotherapy resistance and MMR deficiency [39]. In counterpart, *MRE11* deficiency has been often associated with clinical features of good prognosis, response irinotecan, 5-FU oxaliplatin and survival [21], [40], [41].

Recent studies have reported higher gene and/or protein MRE11 expression in neoplastic tissues, particularly in proficient MMR, where MRE11 overexpression is associated with favorable prognosis in left-sided, but not right-sided CRC [42]. We identified *MRE11A* deficiency as an independent predictor of poor OS for pMMR CRC patients. For these patients, *MRE11A* deficiency was associated with a 16.7-months shorter OS and a 3.5 higher risk of death in relation to those with normal *MRE11A* expression. Though a statistical tendency was observed, an independent prognostic role for *MRE11A* status has not been observed among dMMR CRC. Of note, HRD colorectal tumors are strongly enriched in the MSI-H/dMMR subgroup, likely as a product of the underlying DNA repair defect [29]. While this results possibly reflect the small number of MSI/*MRE11A* deficient patients (n= 2), further investigation are needed to disclosure if the prognosis might is also driven by *MRE11A* levels in dMMR/MSI CRC.

The potential interaction between MMR and MRE11 is of particular interest for CRC patients whose treatment still relies on chemotherapy regimens. Overall, defective MMR/MSI CRC have longer overall and cancer-specific survival compared to patients with MSS tumors, and are eligible to immunotherapy [43]. However, MMR proficient phenotype accounts for 85% of all CRC and still represents an unmet medical need and exploiting defects in DDR genes might signify a new treatment prospect for this subgroup with poor prognosis and limited therapeutic options. For example, it has been suggested that MRE11 expression MRE11 expression is strongly correlated with activation of immune response and differs CRC according to the levels of tumor-infiltrating inflammatory cells [42]. Thus, could be a potential predictive biomarker for response to immunotherapy. Also, pathogenic mutations in *MRE11A* and lack of MRE11 protein function sensitizes CRC cells to agents causing DNA replication

inhibition and PARP inhibitors [43], [44]. It may suggest a role for PARP and MRE11 targeting in pMMR/MSS CRC. PARP inhibitors induce DNA DSBs during replication, which are not repaired in the absence of MRE11 in MMR deficient cells, thus increasing sensitivity to these agents [43]. Likewise, a MRE11 inhibitor may trigger intolerable levels of replication stress [44], and combination DSB-inducers agents (oxaliplatin or irinotecan, for example) for pMMR/MSS with functional *MRE11A* might be a promising approach as CRC cells harboring MRE11 deficiencies are more sensitive to platinum salts and irinotecan combination [21].

BARD1 dimerization with BRCA1 is the next step following DSBs recognition by MRN complex [45]. CRC cells expressing a higher level of a splice variant of *BARD1* are likely to present a more unstable BARD1/BRCA1 complex thus being more susceptible to PARP inhibition [45]. Although mean *BARD1* expression in neoplastic tissues was almost 3-fold higher than in normal tissues, the only association with clinicopathological features was with node positive disease. On its turn, *BRCA1* was investigated as potential prognostic factor for PFS and OS, but it was not been confirmed in multivariate analyses. Allelic losses at *BRCA1* have been detected in almost 50% of sporadic CRC and low expression of BRCA1/2 was associated with tumor aggressiveness and poorer DFS and OS [46] In a recent study involving 6396 CRC tumor samples, pMMR tumors presented a very small prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations (0.7% and 1.2%, respectively). In counterpart, a much higher frequency of these mutations were seen in pMMR/MSI and independently associated with high tumor-mutational burden. The authors suggested that somatic *BRCA1/2* deficiency might predict the benefit of checkpoint inhibitors in CRC [29]. Therefore, we conducted an exploratory analysis of *BRCA1* expression according to MMR status in our cohort in regard to OS. Pairwise comparisons were significantly different for

normally/highly expressed *BRCA1* according to MMR status (mean OS: 61.5 vs. 32.1 months, MMS vs MSI, $p=0.033$, data not shown). However, since this interaction was not observed for *BRCA1* deficient CRC tumors, it is likely that prognosis had been mostly driven by MMR status rather than *BRCA1* expression levels. In light of novel information that *BRCA2* is altered in 24% of dMMR CRC [29], which account for up to 15% of CRC cases, this might be a superior biomarker candidate for sporadic CRC.

PALB2 and *BRCA1* mean fold-change was significantly lower in patients with high NLR. Several evidences suggest that MMR and HRD induce higher mutational, neoantigen loads and migration of activated T cells to tumor microenvironment[47]–[51]. Moreover, DNA damage sensors directly activate immune signaling, which indicates a crosstalk between DDR pathway and the innate immune response [52]. In CRC, high NLR has been associated with poor clinical outcomes While low lymphocyte counts may indicate poor cell-mediated immunity, circulating neutrophils count may result from tumor-mediated stimulation of bone marrow and may be linked to tumor-promoting inflammation[53], [54]. Thus, elevated NLR in HRD tumors may indicate augmented tumor-promoting activity and poor anti-tumor immunity. However, these results must be interpreted cautiously, since neutrophils and lymphocytes counts are non-specific parameters and a definitive cut-off is yet to be determined.

Our study has some limitations. First, the small number of participants. Second, missing information with regard to HRR gene expression and MMR repair status for all included patients; third, we did not include information on mutational status of *KRAS*, *NRAS*, and *BRAF*.

Overall, HRR genes were differentially expressed in our cohort of patients with sporadic CRC - *MRE11A*, *RAD50*, *BARD1*, *BRCA1*, and *PALB2*. However, only *MRE11A* deficiency was confirmed as an independent predictor of OS. More

importantly, *MRE11A* status was identified as independent prognostic factor in proficient MMR, but not in dMMR CRC. Exploratory analyses suggested that downregulation of *PALB2* and *BRCA1* in tumor samples are associated with high NLR, which may denote an enriched immune activation in colorectal tumors. Finally, *BRCA1* gene expression may also have a prognostic role in dMMR/MSI, which need to be confirmed in a larger cohort. These results may provide new rational for investigations of novel biomarkers and therapeutic approaches based on HRR targeting and immunotherapy for CRC

Acknowledgments

The authors would like to thank the Hospital Santa Rita of Irmandade Santa Casa of Misericórdia of Porto Alegre for providing data as well as the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre for supporting this study.

(agências de fomento? Capes, Fapergs ou CNPq?)

Supplementary Table 1. Mean fold-change difference of HRR gene according to MMR status of colorectal cancer tumors.

	Mean difference	IC 95%	p
<i>MREA11A</i>	- 2.43	- 4.96 – 0.10	0.005*
<i>RAD50</i>	- 1.82	-5.32 – 1.67	0.296
<i>NBN</i>	- 0.57	- 4.18 – 3.06	0.726
<i>BARD1</i>	- 0.12	- 2.31 – 2.55	0.914
<i>BRCA1</i>	- 3.07	- 1.12 – 7.27	0.148
<i>RBBP8</i>	- 1.55	- 3.18 – 6.29	0.512
<i>PALB2</i>	- 1.14	- 2.18 – 4.47	0.836

test for mean equality. *p (2-sided)< 0.05

Supplementary Table 2. Mean fold-change differences of HRR gene for perioperative inflammatory blood indexes status of CRC patients.

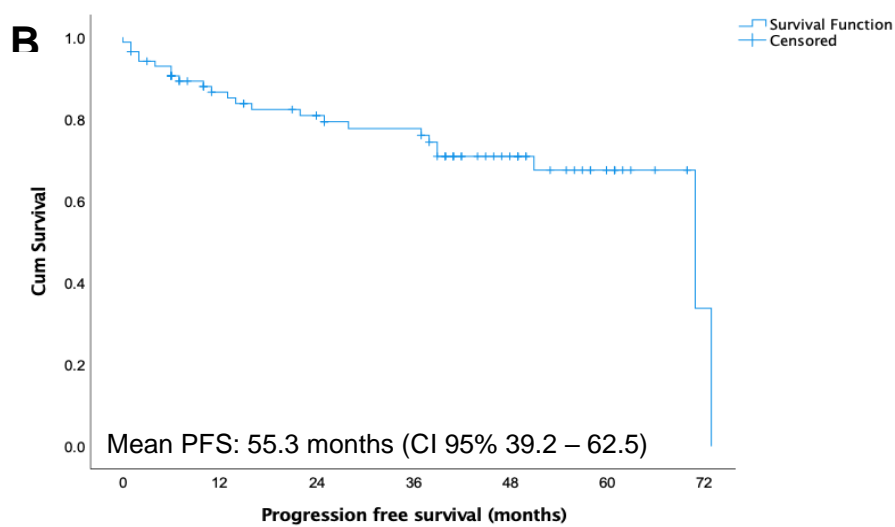
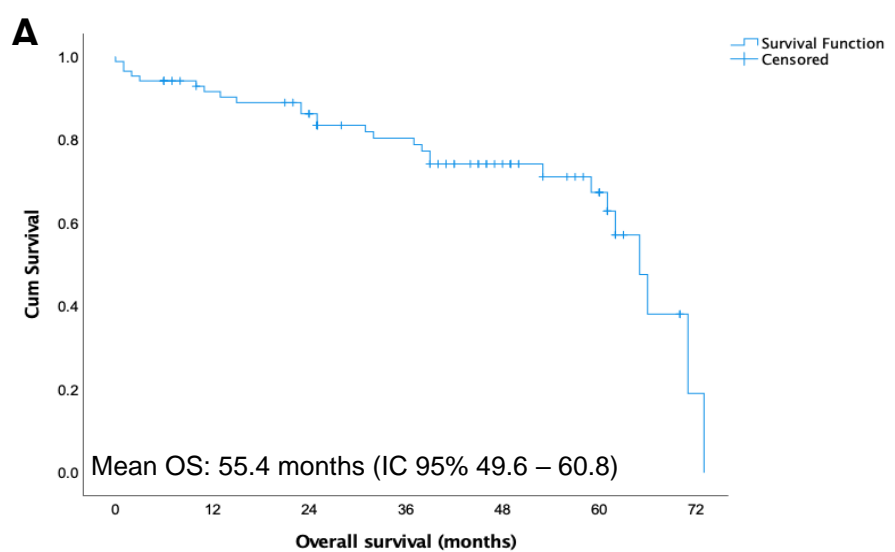
	Mean difference (IC 95%)					
	NLR	p	LMR	p	PLR	p
<i>MREA11</i>	0.08 (-1.89 - 2.05)	0.932	-0.42 (-2.41 - 1.54)	0.665	-0.28 (-2.025 - 1.69)	0.775
<i>RAD50</i>	- 0.43 (-2.71 - 1.84)	0.706	1.44 (-0.81 - 3.68)	0.206	-1.66 (-3.09 - 0.57)	0.142
<i>NBN</i>	1.86 (-0.38 - 4.11)	0.101	-1.15 (-3.44 - 1.12)	0.314	1.98 (0.25 - 4.22)	0.081
<i>BARD1</i>	0.46 (-1.12 - 2.04)	0.561	-0.91 (-2.49 - 0.66)	0.253	0.94 (-0.62 - 2.51)	0.232
<i>BRCA1</i>	3.65 (1.18 - 6.12)	0.004	-0.54 (-3.2 - 2.12)	0.685	-1.28 (-1.33 - 3.89)	.0331
<i>RBBP8</i>	2.28 (-0.79 - 5.28)	0.132	0.95 (-2.09 - 3.99)	0.533	0.22 (-2.82 - 3.28)	.0882
<i>PALB2</i>	2.29 (0.13 - 4.45)	0.038	0.60 (-2.86 - 1.65)	0.597	-0.28 (-2.52 - 1.95)	0.799

NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio; MMR: mismatch repair status. T-test for mean equality. p (2-sided)< 0.05.

Supplementary Table 3. Associations between inflammatory-blood indexes and clinicopathological features of CRC patients.

		LMR	NLR	PLR
Age at diagnosis	χ^2	1.683	0.748	0.748
	<i>p</i>	0.140	0.258	0.258
Tumor site	χ^2	0.050	0.050	0.454
	<i>p</i>	0.500	0.500	0.327
Sidedness	χ^2	2.874	0.258	2.099
	<i>p</i>	0.040*	0.417	0.125
Tumor size	χ^2	2.199	3.909	3.909
	<i>p</i>	0.108	0.041*	0.041*
Tumor grade	χ^2	3.185	1.792	0.199
	<i>p</i>	0.049*	0.132	0.412
Nodal metastasis	χ^2	0.579	0.293	0.293
	<i>p</i>	0.293	0.373	0.373
TNM stage	χ^2	0.047	0.047	0.047
	<i>p</i>	0.500	0.500	0.500
Lymphovascular invasion	χ^2	0.047	0.047	1.165
	<i>p</i>	0.500	0.500	0.194
Perineural invasion	χ^2	2.345	1.042	0.047
	<i>p</i>	0.101	0.222	0.500
MSI	χ^2	0.618	2.477	0.618
	<i>p</i>	0.329	0.109	0.329

χ^2 test and Fisher's exact test. *Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). LMR: Lymphocyte-to-monocyte-ratio; NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio; MMR: mismatch repair status.



Supplementary Figure 1. Kaplan-Meier plots of **(A)** Overall survival and **(B)** Progression Free Survival for all CRC patients included.

References

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2019," *CA Cancer J Clin*, vol. 69, no. 1, pp. 7–34, 2019, doi: 10.3322/caac.21551.
- [2] R. Wang, M.-J. Wang, and J. Ping, "Clinicopathological Features and Survival Outcomes of Colorectal Cancer in Young Versus Elderly," *Medicine*, vol. 94, no. 35, Sep. 2015, doi: 10.1097/MD.0000000000001402.
- [3] H. Li *et al.*, "Re-Evaluation of the Survival Paradox Between Stage IIB/IIC and Stage IIIA Colon Cancer," *Frontiers in Oncology*, vol. 10, Nov. 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.595107.
- [4] B. Huang, S. Mo, L. Zhu, T. Xu, and G. Cai, "The survival and clinicopathological differences between patients with stage IIIA and stage II rectal cancer: An analysis of 12,036 patients in the SEER database," *Oncotarget*, vol. 7, no. 48, Nov. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.12970.
- [5] E. van Cutsem *et al.*, "ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer," *Annals of Oncology*, vol. 27, no. 8, Aug. 2016, doi: 10.1093/annonc/mdw235.
- [6] J. Guinney *et al.*, "The consensus molecular subtypes of colorectal cancer," *Nature Medicine*, vol. 21, no. 11, Nov. 2015, doi: 10.1038/nm.3967.
- [7] A. Sveen, C. Cremolini, and R. Dienstmann, "Predictive modeling in colorectal cancer: time to move beyond consensus molecular subtypes," *Annals of Oncology*, vol. 30, no. 11, Nov. 2019, doi: 10.1093/annonc/mdz412.
- [8] R. Dienstmann, L. Vermeulen, J. Guinney, S. Kopetz, S. Tejpar, and J. Tabernero, "Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 17, no. 2, Feb. 2017, doi: 10.1038/nrc.2016.126.
- [9] P. G. Pilié, C. Tang, G. B. Mills, and T. A. Yap, "State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 16, no. 2, Feb. 2019, doi: 10.1038/s41571-018-0114-z.
- [10] D. T. Le *et al.*, "PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency," *New England Journal of Medicine*, vol. 372, no. 26, Jun. 2015, doi: 10.1056/NEJMoa1500596.
- [11] A. Copija, D. Waniczek, A. Witkoś, K. Walkiewicz, and E. Nowakowska-Zajdel, "Clinical Significance and Prognostic Relevance of Microsatellite Instability in Sporadic Colorectal Cancer Patients," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.3390/ijms18010107.
- [12] A. B. Benson *et al.*, "Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology," *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, vol. 19, no. 3, Mar. 2021, doi: 10.6004/jnccn.2021.0012.
- [13] C. Chung, "Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in colorectal cancer: A 2021 update on current development, evidence, and recommendation," *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, Apr. 2021, doi: 10.1177/10781552211005525.

- [14] G. L. De'angelis *et al.*, "Microsatellite instability in colorectal cancer," *Acta Biomedica*, vol. 89. Mattioli 1885, pp. 97–101, 2018. doi: 10.23750/abm.v89i9-S.7960.
- [15] H. Arai *et al.*, "The Landscape of Alterations in DNA Damage Response Pathways in Colorectal Cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 27, no. 11, Jun. 2021, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3635.
- [16] A. Trenner and A. A. Sartori, "Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment," *Frontiers in Oncology*, vol. 9, Dec. 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.01388.
- [17] F. Marini, C. C. Rawal, G. Liberi, and A. Pellicoli, "Regulation of DNA Double Strand Breaks Processing: Focus on Barriers," *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 6, Jul. 2019, doi: 10.3389/fmolb.2019.00055.
- [18] H. Farmer *et al.*, "Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy," *Nature*, vol. 434, no. 7035, Apr. 2005, doi: 10.1038/nature03445.
- [19] H. H. Y. Chang, N. R. Pannunzio, N. Adachi, and M. R. Lieber, "Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 18, no. 8, Aug. 2017, doi: 10.1038/nrm.2017.48.
- [20] R. Scully, A. Panday, R. Elango, and N. A. Willis, "DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 20, no. 11, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0152-0.
- [21] K. IHARA *et al.*, "Expression of DNA double-strand break repair proteins predicts the response and prognosis of colorectal cancer patients undergoing oxaliplatin-based chemotherapy," *Oncology Reports*, vol. 35, no. 3, Mar. 2016, doi: 10.3892/or.2015.4488.
- [22] P.-C. Lin *et al.*, "Sequential and co-occurring DNA damage response genetic mutations impact survival in stage III colorectal cancer patients receiving adjuvant oxaliplatin-based chemotherapy," *BMC Cancer*, vol. 21, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1186/s12885-021-07926-1.
- [23] H. E. Bryant *et al.*, "Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase," *Nature*, vol. 434, no. 7035, Apr. 2005, doi: 10.1038/nature03443.
- [24] M. R. Mirza *et al.*, "The forefront of ovarian cancer therapy: update on PARP inhibitors," *Annals of Oncology*, vol. 31, no. 9, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.annonc.2020.06.004.
- [25] A. L. Heeke *et al.*, "Prevalence of Homologous Recombination–Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types," *JCO Precision Oncology*, no. 2, Nov. 2018, doi: 10.1200/PO.17.00286.
- [26] N. M. Reilly, L. Novara, F. di Nicolantonio, and A. Bardelli, "Exploiting DNA repair defects in colorectal cancer," *Molecular Oncology*, vol. 13, no. 4, Apr. 2019, doi: 10.1002/1878-0261.12467.

- [27] S. H. AIDubayan *et al.*, "Inherited DNA-Repair Defects in Colorectal Cancer," *The American Journal of Human Genetics*, vol. 102, no. 3, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.ajhg.2018.01.018.
- [28] T. A. Knijnenburg *et al.*, "Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas," *Cell Reports*, vol. 23, no. 1, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.076.
- [29] R. Moretto *et al.*, "Homologous Recombination Deficiency Alterations in Colorectal Cancer: Clinical, Molecular, and Prognostic Implications," *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Sep. 2021, doi: 10.1093/jnci/djab169.
- [30] C. J. Lord and A. Ashworth, "BRCAness revisited," *Nature Reviews Cancer*, vol. 16, no. 2, Feb. 2016, doi: 10.1038/nrc.2015.21.
- [31] M. R. Weiser, "AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer," *Annals of Surgical Oncology*, vol. 25, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.1245/s10434-018-6462-1.
- [32] A. Min *et al.*, "Homologous repair deficiency score for identifying breast cancers with defective DNA damage response," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-68176-y.
- [33] J. L. Sylman *et al.*, "The Predictive Value of Inflammation-Related Peripheral Blood Measurements in Cancer Staging and Prognosis," *Frontiers in Oncology*, vol. 8, Mar. 2018, doi: 10.3389/fonc.2018.00078.
- [34] W.-Z. He *et al.*, "Systemic neutrophil lymphocyte ratio and mismatch repair status in colorectal cancer patients: correlation and prognostic value," *Journal of Cancer*, vol. 9, no. 17, 2018, doi: 10.7150/jca.26669.
- [35] R. Nakad and B. Schumacher, "DNA Damage Response and Immune Defense: Links and Mechanisms," *Frontiers in Genetics*, vol. 7, Aug. 2016, doi: 10.3389/fgene.2016.00147.
- [36] P. P. Tomasini *et al.*, "Analyzing the Opportunities to Target DNA Double-Strand Breaks Repair and Replicative Stress Responses to Improve Therapeutic Index of Colorectal Cancer," *Cancers*, vol. 13, no. 13, Jun. 2021, doi: 10.3390/cancers13133130.
- [37] W. Pan, K. Lu, W. Wang, J. Yao, and Y. Hou, "PALB2 as a potential prognostic biomarker for colorectal cancer," *Computational Biology and Chemistry*, vol. 87, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.compbiolchem.2020.107289.
- [38] R. Lu, H. Zhang, Y.-N. Jiang, Z.-Q. Wang, L. Sun, and Z.-W. Zhou, "Post-Translational Modification of MRE11: Its Implication in DDR and Diseases," *Genes*, vol. 12, no. 8, Jul. 2021, doi: 10.3390/genes12081158.
- [39] V. Ho *et al.*, "Overexpression of the MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex in rectal cancer correlates with poor response to neoadjuvant radiotherapy and prognosis," *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1186/s12885-018-4776-9.
- [40] T. Pavelitz *et al.*, "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*, vol. 9, no. 10, Oct. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0108483.

- [41] V. Ho *et al.*, "MRE11 and ATM Expression Levels Predict Rectal Cancer Survival and Their Association with Radiotherapy Response," *PLOS ONE*, vol. 11, no. 12, Dec. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0167675.
- [42] C.-W. Fan *et al.*, "Prognostic Heterogeneity of MRE11 Based on the Location of Primary Colorectal Cancer Is Caused by Activation of Different Immune Signals," *Frontiers in Oncology*, vol. 9, Jan. 2020, doi: 10.3389/fonc.2019.01465.
- [43] E. Vilar *et al.*, "MRE11 Deficiency Increases Sensitivity to Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibition in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers," *Cancer Research*, vol. 71, no. 7, Apr. 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1120.
- [44] M. Petroni *et al.*, "MRE11 inhibition highlights a replication stress-dependent vulnerability of MYCN-driven tumors," *Cell Death & Disease*, vol. 9, no. 9, Sep. 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0924-z.
- [45] W. Zhao *et al.*, "BRCA1–BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing," *Nature*, vol. 550, no. 7676, Oct. 2017, doi: 10.1038/nature24060.
- [46] G.-H. Wang, C.-M. Zhao, Y. Huang, W. Wang, S. Zhang, and X. Wang, "BRCA1 and BRCA2 expression patterns and prognostic significance in digestive system cancers," *Human Pathology*, vol. 71, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.humpath.2017.10.032.
- [47] J. K. Pine *et al.*, "Systemic neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer: the relationship to patient survival, tumour biology and local lymphocytic response to tumour," *British Journal of Cancer*, vol. 113, no. 2, Jul. 2015, doi: 10.1038/bjc.2015.87.
- [48] D. E. Germini *et al.*, "Association of expression of inflammatory response genes and DNA repair genes in colorectal carcinoma," *Tumor Biology*, vol. 41, no. 4, Apr. 2019, doi: 10.1177/1010428319843042.
- [49] K. W. Mouw, M. S. Goldberg, P. A. Konstantinopoulos, and A. D. D'Andrea, "DNA Damage and Repair Biomarkers of Immunotherapy Response," *Cancer Discovery*, vol. 7, no. 7, Jul. 2017, doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0226.
- [50] M. Patel *et al.*, "The relationship between right-sided tumour location, tumour microenvironment, systemic inflammation, adjuvant therapy and survival in patients undergoing surgery for colon and rectal cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 118, no. 5, Mar. 2018, doi: 10.1038/bjc.2017.441.
- [51] K. C. Strickland *et al.*, "Association and prognostic significance of BRCA1/2-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade serous ovarian cancer," *Oncotarget*, vol. 7, no. 12, Mar. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7277.
- [52] B. Nandi *et al.*, "The roles of homologous recombination and the immune system in the genomic evolution of cancer," *Journal of Translational Science*, vol. 5, no. 6, 2018, doi: 10.15761/JTS.1000282.
- [53] M. E. Shaul and Z. G. Fridlender, "Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 102, no. 2, Aug. 2017, doi: 10.1189/jlb.5MR1216-508R.

- [54] R. C. Furze and S. M. Rankin, "Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow," *Immunology*, vol. 125, no. 3, Nov. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x.

6. CONCLUSÕES

- Os níveis de médios de mRNA de *MRE11A*, *BARD1* e *PALB2* apresentaram-se elevados no tecido neoplásico quando comparados ao tecido normal; diferentemente, os níveis de *RAD50* apresentaram-se reduzidos no tecido neoplásico. Não foram observadas diferenças nos níveis de *NBN*, *BRCA1* e *RBBP8* entre os tecidos avaliados; A razão da expressão gênica entre o tecido neoplásico e o tecido normal, expressa através do índice *fold-change*, confirmou a superexpressão de *MRE11A*, *BARD1* e *PALB2* e a redução para *RAD50*. Com a normalização do índice *fold-change*, um aumento significativamente maior na expressão de *BRCA1* no tecido neoplásico foi revelada.
- Em relação às associações entre a expressão dos genes da via HRR e às características clinicopatológicas, observou-se:
 - A baixa expressão de *MRE11A* foi associada à ocorrência de tumores primários no reto, no lado esquerdo do cólon, com alto grau de diferenciação e T1-T2. Já níveis normal ou elevados de *MRE11A* foi associada a tumores no lado direito do cólon, maiores do que 5cm e deficientes em MMR.
 - A baixa expressão de *RAD50* foi associada a tumores do lado esquerdo do cólon, enquanto níveis mais elevados de *RAD50* ocorreram mais frequentemente em tumores sem invasão linfocelular.
 - A redução na expressão de *NBN* no tecido tumoral foi associada a tumores menos invasivos (T1-T2).
 - A baixa expressão de *BARD1* foi mais frequentemente observada em pacientes com comprometimento linfonodal.

- A baixa expressão de *PALB2* foi associada a tumores no reto, sem invasão linfovascular, linfonodos positivos e doença em estágios mais avançados (III – IV).
- A redução da expressão de *RBBP8* foi associada a tumores com maior grau de invasividade (T3-T4).
- Na análise multivariada da sobrevida livre de progressão, somente idade superior a 65 anos e estágio avançado ou metastático (III-IV) apresentaram valor prognóstico independente.
- Na análise multivariada da sobrevida global, sexo, status de MMR e *MRE11A* apresentaram valor prognóstico independente. O status *MRE11A* foi identificado como um fator prognóstico independente em tumores com MMR proficiente (pMMR) (HR = 3,48 [IC 95% 1,97 - 12,45], $p = 0,035$), mas não MMR deficiente (dMMR). O maior tempo médio de SG foi observado em pacientes com *MRE11A* positivo/pMMR (64,1 meses), enquanto *MRE11A* positivo/dMMR apresentou a menor SG dentre os subgrupos (34,5 meses) avaliados.

7. ANEXOS

Anexo 1 - Parecer Substanciado do CEP

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 NOGCHI 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 substanciado anterior do CEP.

Objetivo da Pesquisa:

Já descritos no parecer substanciado 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. Annes Dias, 298 Hosp. Dom Vicente Salazar
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.000-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-0571 Fax: (51)3214-0571 E-mail: cep@santacasa.isc.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.730.328

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 à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA, Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o Investigador deverá apresentar a 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 Meireles	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ISCMPA_Versao2.docx	14/09/2016 10:44:03	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Gustavo_Laporte_Versao_1.docx	28/07/2016 19:03:02	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Outros	TCLE_UFCSIPA_Versao1.pdf	28/07/2016 18:41:42	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Outros	Termodecompromisso_UFCSIPA.pdf	28/07/2016 18:34:14	Natalia Motta Leguisamo Meireles	Aceito
Outros	Termodeanuencia_Lab_UFCSIPA.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	Aceito

Endereço: R. Prof. Arnaldo Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8871 Fax: (51)3214-8871 E-mail: cep@santacasa.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.730.008

Outros	Formulario_de_Inscricao.pdf	28/07/2016 18:32:31	Meirelles	Aceito
Outros	Chefia_Lab_GenToxicol.pdf	28/07/2016 18:30:58	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Cronograma	Cronograma_Detalhado_Gustavo_Versao2.pdf	28/07/2016 18:25:34	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ISCMPA_Versao2.pdf	28/07/2016 18:23:52	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	04/07/2016 14:01:06	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Orçamento	Orcamento_Detalhado_Gustavo.pdf	13/06/2016 09:54:11	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Lattes_Laporte.pdf	06/06/2016 19:26:19	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Lattes_Jenifer.pdf	06/06/2016 19:25:34	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Lattes_Kall.pdf	06/06/2016 19:25:14	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Lattes_Daniel.pdf	06/06/2016 19:17:44	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Lattes_Helena.pdf	06/06/2016 19:17:29	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Lattes_Natalia.pdf	06/06/2016 19:17:13	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Declaracao_de_Autorizacao_da_Chefia_responsavel_Cirurgia_Onco.pdf	06/06/2016 17:08:21	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Outros	Declaracao_de_Autorizacao_da_Chefia_responsavel_Coloproctolog.pdf	06/06/2016 17:03:59	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_confidencialidade_do_sujeito_no_estudo.pdf	06/06/2016 17:01:10	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Isencao_de_Onus_a_instituicao.pdf	06/06/2016 16:59:55	Natalia Motta Leguisamo Meirelles	Aceito

Endereço: R. Prof. Annes Dias, 295 - Hoop, 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@portocasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



Continuação do Parecer: 1.730.328

Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Uso_de_Dados_e_Materiais.pdf	06/06/2016 16:59:40	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Uso_e_Publicacao_de_dados.pdf	06/06/2016 16:59:02	Natalia Motta Legisamo Meireles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados_e_prontuarios.pdf	06/06/2016 16:58:29	Natalia Motta Legisamo 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. Profª Anna Dias, 295 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-4871 Fax: (51)3214-4871 E-mail: cep@santacasa.iscma.br

Página 04 de 04

Anexo 2 - Regras da revista *Journal of Surgical Oncology*

AUTHOR GUIDELINES

Quick Links:

- *Journal of Surgical Oncology* Author Guidelines (PDF)
- For an enhanced suite of additional online tools, visit [Author Resources](#). Features include Article Tracking, E-mail Publication Alerts and Customized Research Tools.
- Sample forms for [Permissions Requests](#) and [Patient Consent](#).
- For those interested in the Wiley policy on the **NIH Public Access Mandate**, [please visit our policy statement](#).
- **Production Questions?** Contact Teresa Huang: JSOprod@wiley.com.
- **Editorial Questions?** Contact Erica Byrd at JSO@wiley.com.

The *Journal of Surgical Oncology* publishes peer reviewed, original papers in the field of surgical oncology and broadly related surgical sciences, including reports on experimental and laboratory studies related to surgical oncology, as well as brief technical innovations (“How I Do it”) and Letters to the Editor. The Journal discourages submission of case reports.

All manuscripts submitted to the *Journal of Surgical Oncology* must be submitted solely to this Journal and may not have been published in any part or form in another publication of any type, professional or lay, except as an abstract of a meeting presentation.

ONLINE SUBMISSION AND PEER REVIEW

JSO uses online submission and peer review system ScholarOne Manuscripts for the processing of all manuscripts. To submit your manuscript online, please follow the steps below:

1. Prepare your submission files according to the scientific and style instructions of the journal, given on this page. These are also accessible on the submission site under “Instructions and Forms.”
2. If you have not already done so, create an account for yourself at the submission site, <http://mc.manuscriptcentral.com/jso> by clicking on the "Create an Account" button. To monitor the progress of your manuscript throughout the review process, just login periodically and check your Author Center.
2. Let the system guide you through the submission process. You are able to exit/re-enter the process at any stage before finally “submitting” your work. All submissions are kept strictly confidential. If you have any questions, do not hesitate to contact the Editorial Office at jso@wiley.com.
3. All co-authors must be listed during electronic submission, or the article will be returned to the submitting author without peer review. The submitting author will receive correspondence during the submission and review process. NOTE: After acceptance, the corresponding author

listed on the title page of the manuscript file will receive all correspondence about copyrights, galley proofs, and publication details.

4. Provide a cover letter in the “Details & Comments” section online submission form. Note that a **Disclosure Statement** is required in this section. All authors must disclose any affiliations that they consider to be relevant and important with any organization that to any author’s knowledge has a direct interest, particularly a financial interest, in the subject matter or materials discussed. Such affiliations include, but are not limited to, employment by an industrial concern, ownership of stock, membership on a standing advisory counsel or committee, being on the board of directors, or being publicly associated with a company or its products. Other areas of real or perceived conflict of interest would include receiving honoraria or consulting fees or receiving grants or funds from such corporations or individuals representing such corporations. This requirement will apply to every sort of article submitted to the Journal, including original research, reviews, editorials, letters to the editor, or any others, and should be disclosed at the time of submission in the cover letter. This information will be held in confidence while the paper is under review. It will not be shared with peer reviewers, and it will not influence the editorial decision to accept or reject the manuscript. When an article is accepted for publication, the editors will usually discuss with the authors the manner in which such information is presented. All editorial correspondence should be sent to jso@wiley.com.

PREPARATION OF SUBMISSION FILES

Manuscript File

- Use the following sources as guidelines for manuscript preparation: [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#) [1] and, for the abbreviation of journal titles in the references, List of Journals Indexed in Index Medicus [2].
- Manuscripts must be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) format. Do not embed tables or figures. Please include the title page, abstract, main body, references, acknowledgements, and figure legends in a single file. Refrain from complex formatting; the Publisher will style your manuscript according to journal specifications.
- It is strongly recommended that authors whose first language is not English arrange for their manuscript to be written in idiomatic and grammatically correct English prior to submission. Manuscripts can be rejected solely on the basis of poor English. American, rather than British, spelling is preferred. If a manuscript requires English editing, authors may consider submitting the paper to Wiley’s English Language Editing Service at <http://wileyeditingservices.com>. Note that while this service will greatly improve the readability of your paper, it does not guarantee acceptance. Fee for service.

Title page. The first page of the manuscript must contain: 1) The complete title of the paper based on the subject matter. 2) The names and academic degrees of each author. (NOTE: List no more than 10 authors. For a more extensive authorship, consult with the Editor-in-Chief.) 3) The name(s) of the institution(s) where the study was performed. 4) The corresponding author’s name, complete address, telephone and fax numbers, and e-mail address. If there is a different address (and name) for reprint requests, please supply it. 5) A shortened title of not more than 40 characters to serve as a running head. 6) The name and grant number (if any) of any source of

financial support for the study. (Other acknowledgments must be supplied at the end of the manuscript, as the last element of the text, before the references.)

Disclosures and Funding Sources. All information on support and financial issues from all authors relevant to the research covered in the submitted manuscript must be disclosed. Corporate funding for research covered in the submitted manuscript should also be noted here.

Synopsis for Table of Contents. All scientific and clinical Research Articles should include a brief (1-3 sentences) summary on the title page.

Abstracts. No Abstract is required for *How I Do It* contributions, *Guest Editorials*, and *Letters to the Editor*. Scientific and clinical *Research Articles* must include factual Abstract of not more than 200 words, structured under the subheadings: Background and Objectives, Methods, Results, and Conclusions. *Review Articles* must have a factual, unstructured Abstract of no more than 75 words.

Key words. Following the Abstract, supply a list of 3-6 key words or phrases, to supplement those already appearing in the title of the paper, to be used for indexing purposes. Use terms from the medical subject headings (MeSH) list [3] of Index Medicus; if suitable MeSH terms are not yet available for recently introduced terms, use terms commonly known. Please also refer to the suggestions for Search Engine Optimization (SEO) at the end of this page.

Main Text. The text should have the following format: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusions. Use subheadings and paragraph titles whenever possible. Letters of permission must be submitted with any material that has previously been published.

Previously Published Material. Figures, tables, or direct quotes of more than 250 words of text or such amended material must be accompanied by letters of permission from the copyright holder (usually the original publisher).

Attention: Please note manuscript submissions are now submitted for plagiarism detection through CrossCheck.

Ethics: When reporting experiments on human subjects, indicate whether informed consent has been obtained and procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (Institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or the National Research Council's guide for, or any national law on, the care of and use of laboratory animals was followed.

References. In the text, references should be cited as full-size numerals in square brackets. In the final list, they should conform to *Index Medicus* style, contain inclusive page numbers, and be in numerical order. References that are cited first or only in tables or figures should be numbered by where that table or figure is cited in the text. **Accuracy of references is the responsibility of**

the author. List all authors for up to four authors. For five or more authors, list the first three authors followed by "et al." Note the following examples:

Journal Articles

1. Nozuc M, Lee I, Manning JM, et al.: Oxygenation in tumors by modified hemoglobins. *J Surg Oncol* 1996;62:109-114.

Books

2. Bollack CG, Jacqmin D (eds). *Basic Research and Treatment of Renal Cell Carcinoma Metastasis*. New York: Wiley-Liss, 1990.

Chapters in Books

3. Katzner M, Schvingt E: Operative treatment of bone metastases secondary to renal carcinoma. In Bollack CG, Jacqmin D (eds). *Basic Research and Treatment of Renal Cell Carcinoma Metastasis*. New York: Wiley-Liss, 1990:151-168.

Abstracts

4. Abstract in a meeting program: Mendez MF, Manoc-Espalliar R, Lanska DJ, Burstine TH: Epilepsy and suicide attempts [abstract]. In American Academy of Neurology 41st annual meeting program: 1989 Apr 13–19: Chicago. Cleveland (OH): Edgefl Communications. 1989:295. Abstract PP369. 5. Abstract in a journal Issue: Fohrman SA, Joinor KA: Binding of the third component of complement C3 by *Taxoplasma gondii* [abstract]. *Clin Res* 1987;35:475A.

Figure Legends. This section contains descriptive legends typed in double spacing for each illustration. Legends must define all abbreviations and acronyms used in the figure. Any permissions should also be stated here.

Journal Style Notes:

- All material, including references, must be double spaced and have generous margins.
- Number all pages in sequence: title page, synopsis, abstract plus key words, text, references, figure legends, tables, and figures.
- Manuscripts must be thoroughly checked for accuracy of all mathematical calculations, typing of numerals, spelling and typographical errors, and conformance to journal style.
- State whether *P* values are derived from either one-tailed or two-tailed tests. Exact *P* values must be supplied.
- When it is necessary to mention the trade names of equipment, instruments, or supplies, the name of the supplier, city, state, or country, must be given, and the trade name must be noted with either trademark (®) or the register mark (®). Use generic names whenever possible.
- In the text, all results quoted as percentages must show both the numerators and the denominators.
- Measurements of length, height, weight, and volume are reported in metric units (meter, kilogram, liter, etc.) or their decimal equivalents. Temperatures are given in degrees Celsius. Blood pressure is given in millimeters of mercury (mm Hg). Hematologic and clinical chemistry measurements are reported in the metric system using the International System of Units (IS).

Editorial. Invited editorial of an accepted manuscript. Text must be 3-5 double-spaced pages and contain less than 5 references.

Letters to the Editor. Brief reports or letters regarding articles published in the Journal, concisely written in an objective, constructive fashion, will be considered for publication. The Editor reserves the right to shorten text, delete objectionable comments, and make any other changes that may be necessary to comply with the style of the journal. The Editor may forward Letters to the Editor to the corresponding author of the article under discussion to afford an opportunity for rebuttal. The paper under discussion must be listed first in the reference list. If necessary, one figure and one table prepared in accordance with journal guidelines may be included. Up to 10 references may be included, typed double spaced on a separate page. Authors should indicate their permission for publication of their letters in a postscript to the body of the letter. Brief reports with more than one author should carry a postscript stating that all authors are familiar with the contents of the report and agree to its publication. No abstract is required.

How I Do It. Brief communications of authors' innovations in clinical or research techniques that simplify procedures or improve results are invited. Authors should briefly state the problem, describe the solution, and give a short summary of the results, where appropriate. These manuscripts should be clearly marked as "How I Do It," typed double spaced throughout, and submitted in complete triplicate. Acronyms should be used only if absolutely essential and should be defined. When it is necessary to mention trade names of equipment, instruments, or supplies, the name of the supplier, city, state, and countries must be mentioned, and trade names must be noted with TM or ®. If techniques are described, appropriate high-quality illustrations should accompany the manuscript.

Research Article. Text must be within 20 double-spaced pages, excluding the title page and Abstract, but including references. Abstract must be within 200 words and formatted with the following headings: Background and Methods, Results, Conclusions, and Discussion.

Review Article. A review of a specific topic of current interest, most commonly found in *Seminars to Surgical Oncology*. Text must be within 20 double-spaced pages, including references. An unformatted abstract must be included with no more than 75 words.

Inappropriate Submissions and Publications

The editors, members of the editorial board, and publisher's staff at the *Journal of Surgical Oncology (JSO)* take their responsibility seriously to assure that the highest ethical publishing standards are maintained by assisting in safe guarding the medical scientific literature against fraudulent publications. Please note manuscript submissions are now submitted for plagiarism detection through CrossCheck. Wiley-Blackwell policy is based on the "Guidelines on Good Publication Practice" published by the Committee on Publication Ethics (COPE) and can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/publicationethics.asp>.

Examples of fraud in scientific research include (but are not limited to): 1) The submission

of duplicate publications using similar data (ie, attesting that work submitted is original when, in fact, it was submitted to or accepted by another journal); 2) Falsification of data, copyright, or information regarding conflict of interest; 3) Submission of work from other sources that was not done by the author (plagiarism); 4) Authorship (allowing one's name to appear as an author or adding an author to a manuscript) without substantial input or without having agreed to submission of the manuscript.

The above examples are not meant to be a comprehensive list of fraudulent publication practices. Rather, it should provide adequate basis for careful consideration of avoidable conflicts and editorial scrutiny regarding inappropriate preparation and submission of manuscripts.

Manuscripts that have appeared in publications that are not peer-reviewed, are not registered in PubMed, or are available only on the Internet, will be considered for publication in *JSO* as long as the Editor is informed and grants approval prior to submission of the manuscript for review. If there are questions as to any issues regarding in appropriate submission, the Editor should be consulted prior to the submission (jso@wiley.com).

If a submitted or published manuscript is discovered or suspected to be inappropriate, the authors will be asked for a written explanation. If the rationale provided by the authors remains unsatisfactory in the judgment of the editors, the manuscript will be rejected or retracted. Retractions become a matter of public record and are registered in PubMed. The provost (or equivalent) of the authors' academic institutions will be informed of inappropriate submissions or publications, and the authors will not be allowed to subsequently submit their research to *JSO*. The leadership of *JSO* will also inform the editors and publishers of other journals which have published manuscripts judged to be inappropriately submitted to *JSO*.

PUBLISHER NOTES

Copyright. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Wiley's Author Services; where, via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

Note to NIH Grantees. Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Search Engine Optimization. Driving usage and readership is critically important to raising the visibility of your published research. One of the key factors in sustaining long-term usage is through search engine optimization (SEO). Below is a list of suggested ways of maximizing your SEO.

1. Make sure your article title is SEO-friendly. It should be descriptive, and it must include a key phrase from your topic. Key words should appear within the title's first 65

characters.

2. Provide up to five topic-specific key words or phrases in the key word field.
 3. Be sure your key words and phrases appear in your abstract several times, but don't go overboard or the search engine may kick you out.
 4. When referencing authors, be consistent. Use their names as they generally appear in past online publications.
 5. When appropriate, use your key words in article section headings.
- Remember: They can't read it if they can't find it!

For more detailed information on SEO, including helpful examples, go to <http://authorservices.wiley.com/bauthor/seo.asp>.

OnlineOpen is available to authors who wish to make their article available to non-subscribers upon publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper to OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: <http://onlinelibrary.wiley.com/onlineopenorder>.

Prior to acceptance, there is no requirement to inform the Editorial Office that you intend to publish your article OnlineOpen if you do not wish. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
Creative Commons Attribution Non-Commercial - No Derivs License OAA

To preview the terms and conditions of the open access agreements, please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services at http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by the Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK), you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license, supporting you in complying with Wellcome Trust and RCUK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy, please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors, click on the link below to preview the terms and conditions of this license.

Creative Commons Attribution OAA.

To preview the terms and conditions of these open access agreements, please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services at

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

REFERENCES

1. International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *N Engl J Med* 1997;336:309-315. Available at:

<http://www.icmje.org> or <http://www.ascp.com/public/pubs/tcp/unireqs.shtml>.

2. National Library of Medicine: List of journals indexed in Index Medicus. Washington, DC: US Government Printing Office (published annually). Available at:

<http://www.nlm.nih.gov/pubs/libprog.html>.

3. National Library of Medicine: Medical subject headings. Supplement to Index Medicus. Washington, DC: US Government Printing Office (published annually). Available at:

<http://www.nlm.nih.gov/mesh>.