

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

Helena de Castro e Gloria

**Influência da via de reparo de
malpareamento na citotoxicidade do
5-fluorouracil mediada por um
inibidor de PARP em células de
câncer colorretal**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2019

Helena de Castro e Gloria

**Influência da via de reparo de
malpareamento na citotoxicidade do
5-fluorouracil mediada por um
inibidor de PARP em células de
câncer colorretal**

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

**Orientador(a): Profa. Dra. Jenifer
Saffi**

**Coorientador(a): Profa. Dra. Natalia
Motta Leguisamo Meirelles**

Porto Alegre

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

GLORIA, HELENA DE CASTRO E

Influência da via de reparo de malpareamento na citotoxicidade do 5-fluorouracil mediada por um inibidor de PARP em células de câncer colorretal / HELENA DE CASTRO E GLORIA. -- 2019.

95 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2019.

Orientador(a): JENIFER SAFFI ; coorientador(a): NATALIA MOTTA LEGUISAMO MEIRELLES.

1. CÂNCER COLORRETAL. 2. REPARO DO DNA. 3. REPARO DE MALPAREAMENTO. 4. 5-FLUOROURACIL. 5. INIBIDOR DE PARP. I. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Instituições:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Laboratório de Genética Toxicológica (Lab GenTox)

Unidade Bioanalítica

Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia (ICFUC)

Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular (LCMC)

AGENTES FINANCIADORES

CNPq – Edital Universal Processo: Nº. 423039/2016-4

FAPERGS – Edital PPSUS Processo: Nº. 17/2551-0001 459-6

CAPES

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Jenifer Saffi, que mesmo sabendo que eu não possuía experiência alguma em laboratório me recebeu de braços abertos. Agradeço pela enorme paciência, pelo encorajamento, pelo apoio nos meus melhores e piores momentos. Muito obrigada.

À minha co-orientadora, Dra. Natalia Leguisamo Meirelles, por ter me oferecido uma oportunidade tão no início do curso e ter continuado a me estender os braços por todos esses anos. Por toda a parceria, nos momentos mais adversos, e pelos puxões de orelha nos momentos certos. Mas principalmente pela amizade que criamos. Sem a tua confiança eu não estaria aqui, te agradeço imensamente.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Toxicológica da UFCSPA pelo apoio, incentivo e pelas variadas lições. Especialmente à Paula Pellenz Tomasini e Franciele Faccio Busatto não apenas pelo auxílio técnico, mas pelo incentivo e ombro amigo.

Às maravilhosas cientistas do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do IC-FUC, agradeço por todos os ensinamentos, paciência, encorajamento e amizade. Especialmente à Laura Jesuíno Nogueira, Gabriela Maciel Lopes e Paola Victória da Costa Ghignatti pela parceria e loucura diárias.

Ao meu pai, João Alberto Rabello Gloria e meu avô Gabriel Coelho de Castro que durante toda a minha vida me incentivaram a estudar e sempre se orgulharam e me apoiaram, mas que infelizmente não estarão aqui para me ver realizar mais este sonho.

À minha mãe, Claudia Severo de Castro e Gloria, minha rocha, meu porto seguro, minha melhor amiga. À minha avó, Carmen Severo de Castro, por todo o apoio e conselhos. À minha irmã, Victoria de Castro e

Gloria, que está sempre a meu lado. Agradeço aos cinco por todas as oportunidades e apoio que me proporcionaram para que eu trilhasse o meu caminho sempre com força e determinação.

Finalmente, agradeço aos meus valiosos amigos e à minha família por todos os momentos que tanto me fazem feliz, me fortalecem e fazem esta jornada valer a pena.

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 | CÂNCER COLORRETAL | 15 |
| 1.1.1 | <i>Conceito e epidemiologia</i> | 15 |
| 1.1.2 | <i>Etiologia clínica e molecular</i> | 16 |
| 1.1.3 | <i>Diagnóstico e estadiamento</i> | 19 |
| 1.1.4 | <i>Agentes citotóxicos e combinações no tratamento do CCR....</i> | 21 |
| 1.2 | REPARO DO DNA E CÂNCER COLORRETAL | 24 |
| 1.2.1 | <i>Reparo do DNA e resistência ao 5-FU</i> | 26 |
| 1.3 | PARP1 E INIBIDORES DE PARP | 32 |
| 1.3.1 | <i>Inibidores de PARP no tratamento do câncer colorretal</i> | 35 |
| 2 | OBJETIVOS | 38 |
| 2.1 | <i>OBJETIVO GERAL</i> | 38 |
| 2.2 | <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> | 38 |
| 3 | ARTIGO CIENTÍFICO | 39 |
| 4 | CONCLUSÕES | 84 |
| 5 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 85 |
| 6 | ANEXOS | 91 |
| 6.1 | ANEXO LATTES | 91 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES:

5-FU - 5-fluorouracil

AJCC - American Joint Committee on Cancer

APC - Adenomatous Polyposis Coli

APE1 - Apurinic/aprimidinic Endodeoxyribonuclease 1

ART - (ADP- ribosil) Transferase

ATM - Ataxia-telangiectasia mutated kinase

BER - Base Excision Repair

BRCA1 – Breast Cancer 1

BRCA2 – Breast Cancer 2

CCR - Câncer colorretal

CIMP - CpG Island Methylator Phenotype

CIN - Chromosomal Instability

DSB - Double Strand Breaks

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor

EXO1 – Exonuclease 1

FA – Fanconi Anemia

FEN1- Flap structure-specific Endonuclease 1

FdUMP - Monofosfato de Fluorodesoxiuridina

FdUTP - Trifosfato de Fluorodesoxiuridina

FUTP- fluorouridina-5-trifosfato

HER2 - Human Epidermal growth factor Receptor-type 2

HNPCC – Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer

HR - Homologous Recombination

INCA - Instituto Nacional do Câncer

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

MAP – Polipose adenomatosa associada ao MUTYH

mCCR – Câncer Colorretal Metastático

MGMT - O⁶-Metilguanina-DNA Metiltransferase.

MLH1 - MutL homolog 1

MMR – Mismatch Repair

MRE11 – Meiotic Recombination 11

MSH2 – MutS homolog 2

MSH3 – MutS homolog 3

MSH6 – MutS homolog 6

MSI –Microsatellite Instability

MSS – Microsatellite Stability

NER – Nucleotide Excision Repair

NHEJ - Non-Homologous End Joining

PAF – Polipose adenomatosa familiar

PARP – Poli (ADP-ribose) polymerase 1

PARPi - Inibidor de PARP

PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen

PD-1 – Programmed Cell Death 1

PD-L1 – Programmed Cell Death Ligand 1

PMS2 – Post Meiotic Segregation Increased 2

Pol β – DNA Polimerase β

RAS – Ras 2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

RPA – Replication Protein

SSB - Single Strand Break

TLS – Translesion Synthesis

TMZ – Temozolomida

TNM - Tumor-Node-Metastasis

TOP1 – DNA Topoisomerase I

TP53 – Tumor Protein 53

TS – Timidilato Sintase

UDG - Uracil-DNA Glicosilases

UICC - International Union Against Cancer

UTP - Trifosfato de Uridina

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

XRCC1 - X-Ray Repair Cross- Complementing Protein

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Reparo de malpareamento

Figura 2 - Via de reparo por excisão de bases

Figura 3. Esquema da citotoxicidade de 5-fluorouracil

Figura 4 - Letalidade sintética de PARPi

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 - Viability assessment for treatment with 5-FU and Olaparib.

Figure 2 – Interaction index plots of 5-FU and Olaparib in HCT116 and HT29 cells.

Figure 3 – Clonogenic Survival Assay.

Figure 4 – Apoptosis detection.

Figure 5 – DNA damage.

Figure 6 – Cell cycle analysis.

Figure 7 - Adhesion measurements e and migration assay.

Supplementary Figure 1 - Viability curves for HCT116 and HT29 cell lines.

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Comparação entre os inibidores de PARP aprovados para uso clínico.

ARTIGO CIENTÍFICO

Supplementary table 1 - Combination index and dose reduction index for 5-FU and Olaparib combinations in CRC cell lines.

RESUMO

O progresso no tratamento do câncer colorretal (CCR) inclui a identificação da deficiência da via de reparo de malpareamento (MMR) para a predição do benefício do tratamento adjuvante com 5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatina, e, mais recentemente, imunoterapia. Apesar de os regimes utilizando 5-FU ainda serem o pilar da abordagem terapêutica contra o CCR, são considerados inespecíficos e subótimos, o que chama atenção para necessidade do desenvolvimento de novas estratégias. Um corpo crescente de evidências tem sugerido um novo racional para o uso de inibidores de poli-(ADP-ribose) polimerase (PARPi), como o Olaparib, em tipos de tumores além dos tumores com deficiências intrínsecas na via de reparo de recombinação homóloga (HR), particularmente em combinação com agentes indutores de dano ao DNA. Aqui apresentamos novas evidências na citotoxicidade de 5-FU mediada por Olaparib em células de CCR e como ocorre de maneira dependente de MMR. Além disso, reportamos efeitos genóxicos e antineoplásicos induzidos pela monoterapia de Olaparib em células de CCR proficientes em MMR. Observamos que células com deficiência em MMR, devido à perda de hMLH1 e hMSH3, são mais sensíveis a combinação de 5-FU e Olaparib do que células de CCR proficientes em MMR. Identificamos efeitos sinérgicos entre 5-FU e Olaparib em células com deficiência de MMR que prejudica características de agressividade tumoral como capacidade de migração e adesão e formação de colônias. Além disso, nossos resultados sugerem que estes efeitos são mediados pela indução de quebras simples no DNA e apoptose com parada de ciclo celular em G2/M. Portanto, nossos resultados sugerem um papel para a inclusão de Olaparib no tratamento do CCR: (1) em combinação com 5-FU para células de CCR com deficiência de MMR e (2) em monoterapia para células de CCR com proficiência em MMR.

ABSTRACT

The progresses in colorectal cancer (CRC) treatment include the identification of deficiencies in Mismatch Repair (MMR) pathway to predict the benefit of adjuvant 5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatin and, more recently, to immunotherapy. Despite 5-FU-based chemotherapy regimens are still the cornerstone of CRC therapeutic approaches, it is considered unspecific and suboptimal, drawing attention to the need of new strategies. A growing body of evidences have been suggesting new rationale for the use of Poly-(ADP-ribose) polymerase inhibitors, such as Olaparib, beyond tumors with intrinsic deficiencies in Homologous Recombination Repair (HRR), particularly in combination to DNA damaging agents. Here, add new evidences on Olaparib-mediated 5-FU cytotoxicity in CRC cells and how it occurs in a MMR-dependent fashion. Additionally, we report genotoxicity and antineoplastic effects induced by Olaparib monotherapy in MMR proficient CRC cells. We observed that MMR deficient cells, due to loss of hMLH1 and hMSH3 are more sensitive to 5-FU and Olaparib combination than MMR proficient cells. Beyond that our results suggest that these effects are mediated by induction of DNA strand breaks which generates G2/M cell cycle arrest and, ultimately, lids to and increase in apoptosis. Thus, our results suggest a role for inclusion of Olaparib for CRC treatment: (1) in combination with 5-FU for MMR deficient CRC and (2) as monotherapy for MMR proficient CRC.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal

1.1.1 Conceito e epidemiologia

O câncer colorretal (CCR) refere-se a todas as neoplasias que se apresentem no cólon (ascendente, transversal, descendente, sigmoide) e no reto (BELOV; ZHOU; CHRISTOPHERSON, 2011). Entretanto, embora comumente abordadas em conjunto, as neoplasias de cólon e de reto apresentam muitas diferenças além da localização anatômica, incluindo os aspectos etiológicos e epidemiológicos e as modalidades de tratamento empregadas (VASQUES; PERES, 2010). Estima-se que, globalmente, ocorreram cerca de 1,8 milhões de novos casos de CCR e 881 mil mortes associadas à doença em 2018 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). O CCR figura como o terceiro tipo de câncer em termos de incidência e é segundo maior responsável pela mortalidade associada ao câncer no mundo (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). No Brasil, estima-se 36.360 novos casos de CCR em 2019. Sendo 17.380 em homens e 18.980 novos casos em mulheres (INCA, 2018). Em 2017, a mortalidade chegou, em território nacional, a 18.867 casos, 9.207 homens e 9.660 mulheres (SIM, 2019).

Os estados da região sul são classificados como de elevada incidência para o CCR. Neste contexto, o Rio Grande do Sul ocupa lugar de destaque, apresentando as maiores taxas de incidência bruta entre homens (42,47/100.000) e mulheres (44,80/100.000) (INCA, 2018). Adicionalmente, o Rio Grande do Sul apresenta a maior taxa bruta de mortalidade entre os estados da região sul, cerca de 14 casos a cada 100.000 homens (SIM, 2013). Em Porto Alegre, essa taxa atinge 27,35/100.000 para indivíduos do sexo masculino e 29,64/100.000 para os do sexo feminino (INCA, 2018).

A etiologia do CCR é multifatorial e complexa. Contudo, por ser a neoplasia com melhor compreensão sobre os eventos relacionados ao seu desenvolvimento, diversos fatores genéticos, comportamentais e

ambientais já foram estabelecidos. O risco de desenvolvimento destes tumores está intrinsecamente associado à idade, à obesidade, ao etilismo, ao tabagismo e ao consumo de carne vermelha. Estima-se que o consumo de álcool (2-3 unidades por dia) aumente em 20% o risco de se desenvolver CCR. O tabagismo prolongado aumenta o risco em cerca de 50%. O consumo de carne vermelha ou carne processada aumenta o risco 1,16 vezes a cada 100 g de carne ingerida diariamente. Já o consumo de grãos, de vegetais frescos, de leite, de fibras e de vitamina D são considerados fatores protetores para o risco de CCR (KUIPERS et al., 2015).

1.1.2 Etiologia clínica e molecular

Assim como inúmeros tumores sólidos, o CCR é uma doença heterogênea, cuja apresentação clínica traduzirá a ampla gama de padrões moleculares possíveis (NGUYEN; DUONG, 2018). Todavia, didaticamente, é possível distinguir os tumores colorretais em três padrões principais conforme seu histórico de ocorrência: familiar, hereditário e esporádico.

A etiologia familiar (10 a 30 % dos casos) se refere à ocorrência de tumores colorretais em indivíduos com histórico familiar destes tumores, mas que não apresentam síndromes hereditárias (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015). Já o CCR hereditário (5 a 10% dos pacientes) possui duas variantes: (I) pacientes cuja ocorrência dos tumores se associam a quadros de polipose intestinal, as quais podem ser oriundas da polipose adenomatosa familiar (PAF), da polipose associada ao *MUTYH* (MAP) ou das síndromes polipoides hamartomatosas; e (II) a variante não associada à polipose ou HNPCC (do inglês: *Hereditary Non-Poliposis Colon Cancer*) (LYNCH; DE LA CHAPELLE, 2003).

Finalmente, o CCR esporádico (70-75% dos casos) abrange os tumores que ocorrem em pacientes em indivíduos sem histórico familiar ou mutações herdadas, sendo a sua ocorrência associada aos fatores de risco clássicos para a doença (ARVELO; SOJO; COTTE, 2015). Portanto, o

surgimento do CCR esporádico ocorre, mais frequentemente, em pacientes acima de 65 anos, portadores de comorbidades (obesidade, diabetes mellitus, dislipidemia) e com estilo de vida não saudável (sedentários, tabagistas, etc.) (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019).

O CCR é um exemplo de como tumores podem progredir de maneira contínua e progressiva. Mutações que afetam genes críticos na regulação dos processos de proliferação, de diferenciação e de morte celular se acumulam em células pré-neoplásicas, promovendo maior vantagem em relação às células intestinais saudáveis (PUNT; KOOPMAN; VERMEULEN, 2017). A aquisição de alterações genéticas e epigenéticas sequenciais estão bem definidas no que tange à carcinogênese molecular do CCR e são responsáveis pela iniciação e progressão de adenomas para carcinomas. Geralmente, a formação dos tumores colorretais se inicia pela transformação das células epiteliais da mucosa intestinal em adenomas benignos, mas é o acúmulo de múltiplas aberrações moleculares o que lhes confere as capacidades de invasividade e metastatização (NGUYEN; DUONG, 2018).

A duração de cada fase é difícil de estimar, mas se acredita que seja necessária uma década para que todos os estágios entre transformação do adenoma à carcinoma ocorram (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019). A ordem na qual as mutações são acumuladas durante o desenvolvimento de CCR não é aleatória. Aberrações em certos genes, como *APC* (do inglês: *Adenomatous Polyposis Coli*) e *KRAS* (do inglês: *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) são encontradas em lesões polipoides iniciais, mas os demais os demais eventos genéticos, como mutações que causam a inativação de *TP53* (do inglês, *Tumor Protein 53*), são observados apenas quando o processo carcinogênico está mais avançado. Esta situação, em que mutações específicas são associadas a distintas fases do desenvolvimento tumoral, também se traduz nos diferentes estágios clinicopatológicos da doença. Por isto, estas características indicam que intervenções terapêuticas para alvos moleculares específicos podem ser efetivas em determinados grupos de pacientes (PUNT; KOOPMAN; VERMEULEN, 2017).

A etiologia molecular do CCR é determinante para os fenótipos clínicos e pode ser resultante de 3 principais mecanismos: instabilidade cromossômica (CIN, do inglês: *Chromosomal Instability*), fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP, do inglês, *CpG island Methylator Phenotype*) e instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês, *Microsatellite Instability*).

Cerca de 85% dos casos de CCR esporádico apresentam CIN, com alterações no número e na estrutura dos cromossomos. Estas alterações incluem ganhos e perdas de segmentos cromossomais, gerando rearranjos e perda de heterozigosidade, o que pode resultar em variações no número de cópias dos genes, promovendo a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores tumorais. Este mecanismo é considerado o responsável pelo desenvolvimento da clássica sequência adenoma-carcinoma descrita por Fearon e Vogelstein em 1990 (FEARON; VOGELSTEIN, 1989; KEUM; GIOVANNUCCI, 2019; NGUYEN; DUONG, 2018). O evento chave desta via é a hiperativação da via de sinalização WNT, o que pode ocorrer devido a mutações em *APC* (80% dos casos) ou mutações/alterações epigenéticas em outros componentes desta via, como no gene da β -catenina (MÜLLER; IBRAHIM; ARENDS, 2016).

A MSI, por sua vez, é um fenótipo molecular decorrente da deficiência ou inativação da via de reparo de malpareamento (MMR, do inglês, *Mismatch Repair*) (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019). Microssatélites são definidos como sequências de 1-6 nucleotídeos que se repetem de maneira contígua entre 6 e 40 vezes. Podem ocorrer como mono-, di-, tri- e tetranucleotídeos, estando presentes mais de 100.000 vezes no genoma humano (CARETHERS, 2017). A maioria dos microssatélites está localizado em regiões não-codificantes do DNA, com apenas cerca de 150-300 em regiões codificantes (CARETHERS, 2017).

As regiões de microssatélites possuem altas taxas de erros de pareamento devido a erros exercidos pela DNA polimerase durante a replicação do DNA. Em células normais, a maquinaria de reparo de malpareamento, além da função exonuclease das DNA polimerases, são responsáveis pela correção destes erros e pelo reestabelecimento da sequência correta do DNA, algo impossível de ser realizado em células

com deficiência em MMR. Nestas células, a inserção/deleção progressiva de nucleotídeos sem reparo adequado resulta no aparecimento de alelos com sequências mais curtas ou mais longas quando comparadas às sequências dos alelos de células saudáveis (NGUYEN; DUONG, 2018). Essas alterações podem criar mutações do tipo *frameshift* dentro de microssatélites em áreas codificantes de genes supressores tumorais e/ou proto-oncogenes, resultando na inativação da proteína e contribuindo para a tumorigênese colorretal (MÜLLER; IBRAHIM; ARENDS, 2016). Nos tumores colorretais, a MSI está presente em cerca de 15-20 % dos casos de CCR esporádicos e em cerca de 95 % dos casos dos tumores colorretais de etiologia hereditária não-polipoide (NGUYEN; DUONG, 2018).

Finalmente, o fenótipo CIMP decorre da perda de metilação global e do ganho de metilação em promotores gênicos dotados de dinucleotídeos CG repetitivos – ou ilhas CpG. CIMP ocorre em cerca de 20 % dos tumores colorretais esporádicos (NGUYEN; DUONG, 2018). Existe uma sobreposição entre as vias CIMP e MSI na carcinogênese colorretal, embora estes fenótipos moleculares possuam características diferentes, eles não são mutuamente exclusivos. CIMP e MSI estão correlacionados, já que hipermetilação de *MLH1*, um gene-chave da via MMR, é um mecanismo que inativa esta via e leva à MSI. Aproximadamente 70% dos casos de tumores colorretais com elevado nível de MSI (MSI-H, do inglês: *MSI-High*) também apresentam CIMP (KEUM; GIOVANNUCCI, 2019; NGUYEN; DUONG, 2018).

1.1.3 Diagnóstico e estadiamento

O diagnóstico do CCR se dá através do resultado de testes de rastreamento oncológico ou da avaliação de paciente com sintomas. O CCR apresenta diversos sintomas como alterações no hábito intestinal, desconforto abdominal, perda de peso ou presença de sangue nas fezes. A colonoscopia é utilizada como método de rastreamento, em grupos de médio risco (pessoas com 50 anos ou mais) e alto risco (pessoas com histórico pessoal ou familiar de CCR, de doenças inflamatórias) e como

método de investigação em pacientes sintomáticos (KUIPERS et al., 2015) (Ministério da Saúde, 2014, INCA, 2019).

Para a confirmação do diagnóstico é imprescindível a realização de biópsia, que pode ser realizada em cirurgia de ressecção do tumor (em casos de procedimento de emergência) ou durante a colonoscopia, em que se realiza a retirada de um fragmento do tumor (INCA, 2018). A partir da biópsia ou da peça cirúrgica será realizado o exame histológico, no qual é aplicado um sistema de estadiamento que irá analisar a forma anatomopatológica do tumor.

Para tanto, a classificação utilizada foi elaborada pela AJCC (do inglês: *American Joint Committee*) e pela UICC (do inglês: *International Union Against Cancer*) e se chama TNM (do inglês: *Tumour-Node-Metastasis*). Ela é composta por uma classificação clínica pré-operatória e patológica pós-operatória: classificação clínica (cTNM), classificação patológica pós-operatória (pTNM) e classificação após terapia neoadjuvante e cirurgia (ypTNM). Esta classificação avalia o grau de invasão mural do tumor (T), o comprometimento de linfonodos (ou a presença de metástases nodais) (N) e a presença de metástases à distância (M) (AJCC, 2019). Após o estadiamento, será definido o tratamento mais adequado.

A união da avaliação de T, de N e de M determina o estadiamento da lesão do paciente. De modo geral, tumores limitados ao cólon (estádios I, IIa e IIb) apresentam alta taxa de sobrevivência após 5 anos (92%, 87% e 63% respectivamente). Contudo, para pacientes com doença avançada (estádio IV), a taxa de sobrevivência após 5 anos é de apenas 11% (NCCN, 2018). Em caso de metástases hepáticas ressecáveis, a ressecção completa do tumor hepático pode resultar em sobrevivência de 5 anos de 25 a 40% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

De maneira geral, tumores de cólon em estágio I e II de baixo risco recebem tratamento exclusivamente cirúrgico. Contudo, pacientes em estágio II de alto risco (maior invasividade ou T4, perfurados ou obstruídos, com baixo grau de diferenciação celular, com invasão

linfovascular e histologia mucinosa) e III têm indicação de quimioterapia adjuvante baseada em 5-fluorouracil (5-FU) (O'CONNELL et al., 2008, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Pacientes com doença avançada (IV) têm indicação, em primeira linha, de esquemas combinados que poderão conter 5-FU, leucovorina, oxaliplatina e irinotecano (cujos esquemas são denominados FOLFOX, XELOX, FOLFIRI e FOLFIRINOX), mas podem também receber terapias biológicas, como bevacizumab, cetuximab, regorafenib, prescritas após testes moleculares específicos para predição da eficácia das drogas (NCCN, 2018). Estas terapias incluem os inibidores de VEGF (HANSEN et al., 2013), EGFR (RAGULAN et al., 2019) e PD-1/PD-L1 (LE et al., 2015).

Em sendo a lesão primária localizada no reto, tumores a partir do estágio II serão indicados à radioterapia associada ou não à quimioterapia neoadjuvante. O objetivo desta modalidade de tratamento é reduzir o tamanho da lesão de maneira a preservar a funcionalidade do órgão após a ressecção da lesão e reduzir o risco de recorrência local da doença (KNIJNENBURG et al., 2018). De qualquer forma, todos os esquemas terapêuticos em primeira linha para o tratamento das neoplasias colorretais serão baseados em 5-FU (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1.1.4 Agentes citotóxicos e combinações no tratamento do CCR

Os agentes antineoplásicos mais utilizados no tratamento de CCR (5-FU, oxaliplatina e irinotecano) exercem seus efeitos citotóxicos sobre as células tumorais através da indução de danos ao DNA e da disrupção do metabolismo de nucleotídeos. O 5-FU é considerado, desde os anos 60 até hoje, o pilar de todos os regimes de tratamento combinados utilizados no tratamento do CCR. Regimes contendo 5-FU reduzem a taxa de recidiva em 17% e aumentam a sobrevida global em torno de 15 % (GILL et al., 2004; TWELVES et al., 2011).

O 5-FU é um análogo da pirimidina, ativado por fosforilases e cinases. Ele possui três possíveis mecanismos de ação: (a) incorporação do metabólito fluorouridina-5-trifosfato (FUTP) ao RNA no lugar do

trifosfato de uridina (UTP), produzindo um RNA alterado e interferindo com a síntese proteica; (b) inibição da timidilato sintetase (TS) pelo o metabólito ativo FdUMP (monofosfato de fluorodesoxiuridina), o que resulta em uma diminuição na produção de timidina, desequilíbrio do *pool* de nucleotídeos disponíveis, incorporação de uracila ao DNA e formação de quebras simples (SSB, do inglês: *Single Strand Breaks*); (c) incorporação do metabólito trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) no DNA (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003; MATUO et al., 2010).

A oxaliplatina, por sua vez, é um agente platinado que forma ligações intra e intercadeia com o DNA. A maioria das lesões citotóxicas são adutos intracadeia, formados principalmente entre duas guaninas adjacentes. A formação dos adutos de DNA com metabólitos ativos da oxaliplatina impede a ligação da maquinaria de reparo de excisão de nucleotídeos (NER, do inglês: *Nucleotide Excision Repair*) e de malpareamento nas lesões, inibindo a síntese de DNA. Assim, oxaliplatina afeta a integridade do DNA e induz apoptose (COMELLA; SANDOMENICO, 2009; CULY et al., 2000). A oxaliplatina é utilizada junto ao 5-FU e a leucovorina no esquema denominado FOLFOX, ou junto à capecitabina, a pró-droga do 5-FU para administração por via oral, no esquema XELOX. A adição de oxaliplatina aumenta a sobrevida livre de doença em 5 anos de 6,2 a 7,5% e a sobrevida global de 2,7 a 4,2%, em pacientes com estágio III de câncer de colón (TWELVES et al., 2011).

Outra combinação bastante utilizada em neoadjuvância para o tratamento de CCR metastático é o FOLFIRI, composto por 5-FU, por leucovorina e por irinotecano. O irinotecano é um análogo sintético da camptotecina, um poderoso inibidor de topoisomerase I. Durante a replicação, a topoisomerase I cria uma quebra simples transiente no DNA que será posteriormente religada. O irinotecano estabiliza o complexo DNA-topoisomerase I (TOP1) e impossibilita a religação da fita. Durante a replicação do DNA, a colisão da forquilha de replicação com o complexo DNA-topoisomerase I resulta em quebras duplas, ativando a cascata apoptótica (FUCHS; MITCHELL; HOFF, 2006). Em comparação ao 5-FU empregado isoladamente ou em combinação com a Leucovorina, o esquema FOLFIRI aumenta o tempo médio de progressão livre de doença

de 4,3 meses para 7 meses e de sobrevida global de 14,1 para 17,4 meses (CASSIDY et al., 2011; DOUILLARD et al., 2000). Estudos clínicos de fase III comparando FOLFOX e FOLFIRI demonstraram que ambos possuem taxas de resposta similares (54% e 56%, respectivamente), assim como tempos livres de progressão da doença (8 e 8,5 meses, respectivamente) (TOURNIGAND et al., 2014).

Mais recentemente, especialmente em se tratando da abordagem do câncer colorretal metastático (mCCR), grandes avanços têm sido alcançados. Podemos apontar quatro classes principais de drogas que estão sendo adicionadas aos esquemas clássicos de tratamento do CCR: (1) anticorpos monoclonais inibidores de VEGF (do inglês: *Vascular Endothelial Growth Fator*): Bevacizumabe e Aflibercept; (2) anticorpos monoclonais inibidores de EGF (do inglês: *Epidermal Growth Fator*), utilizados em pacientes que não possuem tumores com mutações no gene *RAS* (do inglês: *Kirsten Rat Sarcoma virus*): Cetuximabe e Panitumumabe; (3) inibidores de quinases (Regorafenibe). (4) imunoterapia com anticorpos monoclonais que inibem PD-1 e PD-L1 para tumores com deficiências em MMR (SVEEN, 2019).

A angiogênese representa um dos componentes mais importantes do desenvolvimento tumoral e do processo metastático. Um dos principais responsáveis pela angiogênese é a atividade do VEGF, responsável pela proliferação de células endoteliais e pela formação de vasos. O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humano desenvolvido contra o VEGF. Por exemplo, o uso associado de Bevacizumabe e de FOLFIRI aumenta os tempos de sobrevida livre de doença em até 5 meses em relação ao uso apenas do esquema citotóxico (HOPIRTEAN; NAGY, 2018).

Outra via de sinalização tumoral responsável pelo crescimento e pela capacidade de metastatização do tumor é a do EGFR. O aumento na expressão deste receptor em pacientes com CCR aumenta a probabilidade de desenvolvimento de metástases e reduz a sobrevida (WANG et al., 2018). Os anticorpos monoclonais Cetuximabe e Panitumumabe agem ligando-se a esse receptor. A combinação de Cetuximabe e de irinotecano em pacientes com progressão de doença

resultou em aumento do intervalo livre de progressão em 4 meses (PATHAK et al., 2018).

1.2 Reparo do DNA e Câncer Colorretal

Diariamente o DNA é exposto a uma variedade de agentes e de processos que podem danificá-lo. Estes danos podem ser causados por processos endógenos, como as lesões oxidativas causadas por produtos do próprio pelo metabolismo celular, ou exógenos, a partir da exposição a agentes ambientais, e quimioterápicos (LORD, 2012). As lesões causadas ao DNA, se perpetuadas, podem levar à instabilidade genômica e, posteriormente, ao câncer. Para evitar a instabilidade genômica e manter a integridade do DNA, as células possuem complexos e sofisticados sistemas de mecanismos para manter a integridade genômica, são eles: sistema de reparo do DNA, tolerância a dano, *checkpoints* de ciclo celular e vias de morte celular, que coletivamente garantem a redução dos efeitos deletérios do dano ao DNA.

O comprometimento ou a perda da efetividade do reparo de DNA é um determinante para a progressão de câncer e, posteriormente, para a resposta tumoral à terapia. Identificadores da presença de danos ao DNA, ativadores e efetores de resposta ao dano podem ser agrupados em vias funcionais definidas por critérios genéticos, bioquímicos e mecânicos. Proteínas da mesma via frequentemente trabalham em uníssono para consertar um tipo específico de dano.

Essas vias são didaticamente divididas em: reparos direto e por excisão, esse composto pelas vias de reparo por excisão de bases (BER, do inglês: *Base Excision Repair*) e nucleotídeos (NER), responsáveis pela identificação e processamento de lesões em bases e nucleotídeos; reparo de mal pareamento (MMR), que corrige pequenos loops de inserções e deleções; reparos por recombinação, compostos pelas vias de reparo por Recombinação Homóloga (HR, do inglês: *Homologous Recombination*) e junção de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês: *Non-Homologous End Joining*), que processarão, principalmente, quebras duplas; e, finalmente, a Síntese Translesão (TLS, do inglês: *Translesion*

Synthesis), que opera independentemente ou em conjunto com outras vias diante promovendo a tolerância a erros que bloqueiam a atividade das DNA polimerases e a via de Fanconi, especializada no reparo de *crosslinks* (FA, do inglês: *Fanconi Anemia*) (CHATTERJEE; WALKER, 2017; KNIJNENBURG et al., 2018).

A compreensão do sistema de resposta a danos ao DNA é essencial para a compreensão e para o desenvolvimento da terapêutica no câncer, afinal, muitos dos agentes empregados exercem citotoxicidade especificamente induzindo danos ao DNA. Portanto, de forma geral, desequilíbrios, insuficiências ou deficiências nessas vias, são alvos estratégicos que garantem que a incapacidade de reparo de lesões induzidas por agentes antineoplásicos induza processos de morte celular.

Os principais exemplos clínicos deste conceito se referem ao sucesso do emprego de agentes indutores de danos ao DNA em tumores com deficiência específica comprovada em alguma das vias de reparo. Embora o racional óbvio para a indução de morte celular seja a geração de danos ao DNA impossíveis de serem processados pela célula, nem sempre este mecanismo diretamente é o que garante o sucesso dos agentes indutores de danos ao DNA.

Por exemplo, glioblastomas com metilação no promotor do gene *MGMT*, responsável pela produção da enzima O⁶-Metilguanina Metiltransferase (*MGMT*), apresentam marcada sensibilidade ao agente alquilante temozolomida (TMZ) (HEGI et al, 2005). Diferentemente, tumores de ovário, de mama e de próstata, com mutações germinativas em *BRCA 1* e *BRCA 2*, envolvidos no reparo de quebras duplas, são altamente sensíveis à inibição da proteína Poli (ADP-Ribose) Polimerase-1 (PARP1) e não à indução direta de danos ao DNA. PARP1 é um dos principais sinalizadores da presença de quebras no DNA e, neste contexto, atua como alvo letal na deficiência da via HR decorrente de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (MATEO et al., 2019).

Finalmente, deficiências em MMR em tumores colorretais garantem sensibilidade à imunoterapia (LE et al., 2015). A elevada carga mutacional destes tumores leva à produção de neoantígenos, os quais elevam a resposta imune antitumoral que, contudo, é bloqueada pela expressão de PD-L1 pelas próprias células tumorais, impedindo a ação do sistema imune. A imunoterapia neste caso, bloqueia PD-L1 e reestabelece a atividade antitumoral do sistema imune em tumores colorretais deficientes em MMR (LE et al., 2017).

1.2.1 Reparo do DNA e resistência ao 5-FU

No contexto do CCR, a relevância clássica dos sistemas de reparo é evidenciada pela atuação do MMR. Enquanto apenas recentemente a pesquisa por deficiências dessa via se tornou o marcador preditivo de resposta à imunoterapia, este mesmo fenótipo molecular foi descrito em 1993 em tumores colorretais hereditários, na doença referida como Síndrome de Lynch (DA SILVA et al., 2016). Enquanto na síndrome de Lynch a deficiência de MMR decorre de mutações nos genes *MLH1* e/ou *MSH2* em células germinativas, nos tumores colorretais esporádicos é resultado da inativação epigenética de *MLH1* (DUDLEY et al., 2016; SARGENT et al., 2010).

A principal marca resultante da deficiência de MMR é a MSI, identificada em cerca de 15-20% dos tumores colorretais esporádicos. Tumores colorretais com MSI são mais frequentemente diagnosticados no cólon direito e em estágios iniciais, embora apresentem maior invasividade e maiores graus de diferenciação celular (KANG et al., 2018). Apesar de apresentarem, em média, uma taxa de sobrevivência 15 % maior do que pacientes com proficiência de MMR (POPAT; HUBNER; HOULSTON, 2005) estes pacientes parecem não se beneficiar da quimioterapia baseada em 5-FU (KLOOR; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2016; RIBIC et al., 2003).

O MMR possui dois dímeros proteicos: MutS, que pode ser encontrado em sua forma α (formada pelo dímero MSH2/MSH6) ou β (formada por MSH2/MSH3), responsáveis pelo reconhecimento do malpareamento; e MutL que pode ser encontrado na forma α (MLH1 e PMS2) ou β (formada por MLH1 e PMS1) que irá coordenar o reparo da lesão (HEWISH et al., 2010). O reparo mediado por MMR pode ser dividido em quatro etapas: (1) reconhecimento do malpareamento pelo heterodímero MutS, MutS α é responsável pelo reconhecimento de inserções e deleções pequenas (até 3 nucleotídeos), MutS β reconhece malpareamentos causados por inserções/deleções maiores (até 13 nucleotídeos); (2) a excisão da porção da fita em que o erro está localizado é realizada quando MutS α ou MutS β recruta MutL α formando um complexo tetramérico que irá realizar a incisão do DNA formando um *flap*, o qual será excisado por RPA e Exo1; (3) a DNA polimerase δ é responsável pela ressíntese do DNA com base na fita molde; (4) a religação da extremidade da fita original e da fita molde é realizada pela DNA ligase I (LIU; KEIJZERS; RASMUSSEN, 2017) (FIGURA 1).

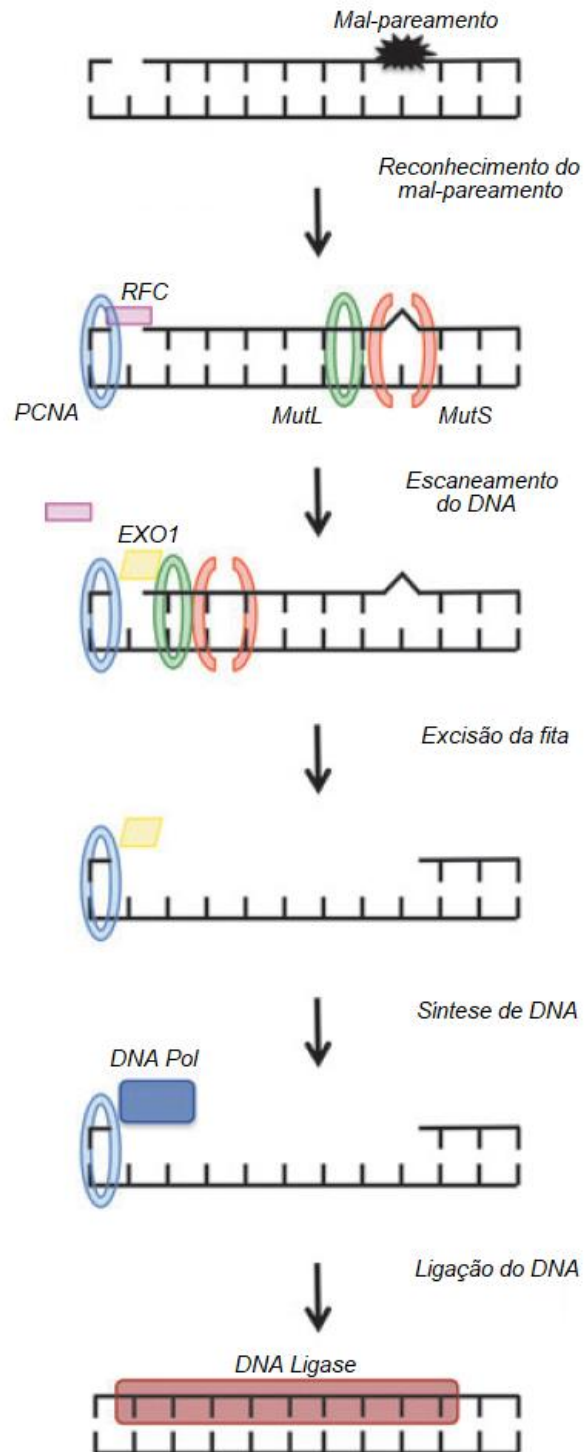


Figura 1. Reparo de malpareamento. Adaptado de BRIERLEY; MARTIN, 2013.

Como observado anteriormente, o 5-FU é o pilar dos tratamentos combinados utilizados no CCR. 5-FU é um análogo de uracila com um

átomo de flúor na quinta posição e é metabolizado pela célula como a uracila. A atividade citotóxica de 5-FU requer ativação metabólica por fosforilases e cinases celulares. Há a conversão de 5-FU em fluoronucleotídeos e FdUMP. O mecanismo de ação de 5-FU tem como base a disfunção do metabolismo de timina e sua incorporação no DNA. O metabólito FdUMP inibe a timidilato sintase (TS) resultando no desequilíbrio do pool de nucleotídeos com diminuição dos níveis de dTMP e aumento da concentração de dUMP. A maioria das DNA polimerases tem pouca discriminação entre dTTP e dUTP, assim, o aumento da concentração de dUMP resulta na incorporação de uracila no DNA (IWAIZUMI; TSENG-ROGENSKI; CARETHERS, 2011). A incorporação de dUMP ao DNA durante a replicação será identificada pelo complexo hMutS α , com maior afinidade, ou pelo complexo hMutS β do MMR.

Estima-se que cerca de 10% do 5-FU incorporado ao DNA seja reconhecido pelo MMR havendo assim a sinalização para reparo ou para morte celular de maneira dependente de MMR. Em células proficientes no reparo de malpareamento, um ciclo de reparo errôneo pode ocorrer, já que a maquinaria de MMR irá identificar o malpareamento e tentar repará-lo. No entanto, como há a inibição da timidilato sintase e a consequente diminuição de timina no pool de nucleotídeos, uracila e metabólitos de 5-FU continuam sendo erroneamente incorporados ao DNA, levando a um ciclo fútil que leva a morte celular. Em pacientes com deficiência de MMR estes eventos não ocorrem, a uracila e os fluoronucleotídeos incorporados ao DNA não serão processados por MMR, o que leva à resistência ao 5-FU (TAJIMA et al., 2011). Assim, células proficientes em MMR têm maior sensibilidade a 5-FU quando comparadas a células com deficiência em MMR.

Os danos no DNA induzidos pelo 5-FU podem ser reparados pelo MMR e pelo BER, mas pouco se sabe ainda sobre a natureza do *crosstalk* entre essas vias de reparo do DNA, além do fato de compartilharem substratos. Algumas evidências sugerem que o complexo MutS, mais precisamente pela atividade de MSH6, seja o requisito à montante da toxicidade do 5-FU. Paralelamente, viu-se que as endonucleases do BER

agem na mesma via do MMR clássico, colaborando na resposta ao 5-FU (SENGUPTA et al., 2013).

Caso a lesão ao DNA não tenha sido reparada por MMR, o BER identifica e inicia a remoção da base danificada por uma DNA glicosilase específica, seguido pela incisão do local da lesão pela própria DNA glicosilase ou uma AP endonuclease (APE1). Na via curta de BER (SP-BER, do inglês: *Short-Path Base Excision Repair*), a DNA polimerase β (Pol β) insere uma base na quebra simples resultante, seguida pela ligação fosfodiéster com a Ligase III. Na via longa de BER (LP-BER, do Inglês: *Long Patch Base Excision Repair*) a flap endonuclease 1 (FEN1) com assessoria de PCNA (do inglês, *Proliferating Cellular Nuclear Antigen*) fazem a remoção do *flap* de bases lesionadas antes da ligação pela ligase I (BEARD et al., 2019)(FIGURA 2).

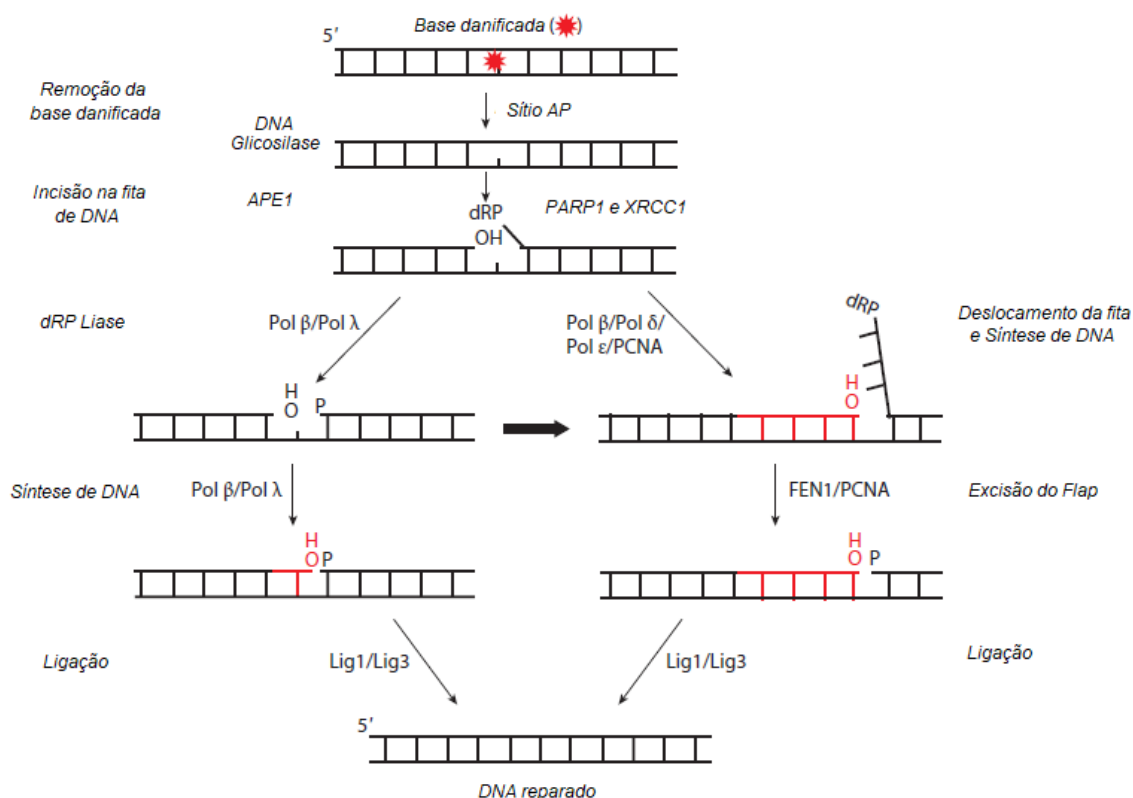


Figura 2. Via de reparo por excisão de bases. Adaptado de BEARD et al., 2019.

No caso do 5-FU, a uracila e fluoronucleotídeos mal inseridos no DNA são identificadas por uma das cinco uracil-DNA glicosilases (UDGs) que irão excisá-las, levando à formação de um sítio abásico (WYATT; WILSON III, 2009). Embora a excisão de uracila não seja essencial para a citotoxicidade do 5-FU, um reparo incompleto pode levar ao acúmulo de intermediários citotóxicos, incluindo sítios abásicos e quebras simples no DNA, que, em última instância, podem provocar a morte celular (MATUO et al., 2010).

Nessa via, a enzima PARP1 atua como um fator acessório, ao se ligar a quebras simples e ao recrutar enzimas do BER para a conclusão do processo de reparo (ROULEAU et al., 2010). Ela é responsável pelo recrutamento de XRCC1 (do inglês, *X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 1*) ainda no início da via, a qual age como um arcabouço para o recrutamento das outras proteínas, incluindo APE1, Pol β e Ligase III (BEARD et al., 2019). Caso haja falha na sinalização de quebras simples por PARP1, pode haver a formação de quebras duplas no DNA, que se não reparadas pela via de recombinação homóloga levaram a célula a morte (Figura 3).

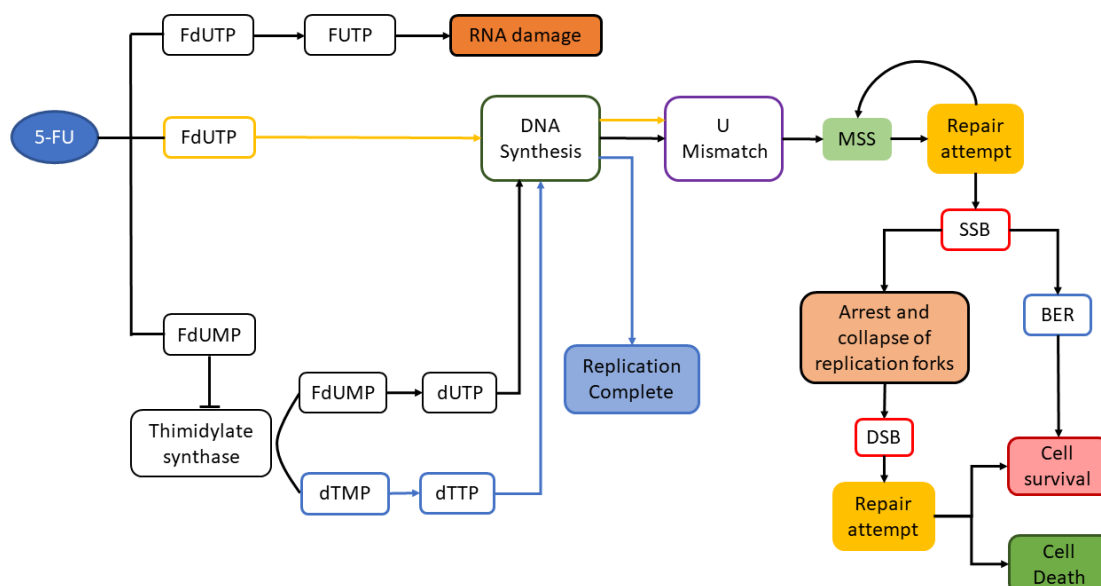


Figura 3. Esquema da citotoxicidade de 5-fluorouracil

1.3 PARP1 e Inibidores de PARP

PARP1 é uma enzima nuclear e constitutivamente expressa, e é o membro fundador da família de proteínas cuja primeira descrição ocorreu em 1963 (CHAMBON 1963). A família de PARPs conta com 17 membros (HASA, 2008), que têm em comum o uso de NAD⁺ como substrato para transferir a ADP-ribose para si mesmo, proteínas receptoras e histonas (LEUNG, 2017), atividade denominada parilação.

A reação de poli (ADP-ribosilação) é deflagrada através da interação de PARP1 com sítios danificados no DNA. Os dedos de zinco de PARP1 reconhecem os danos no DNA, levando à desestabilização da região auto inibitória do domínio catalítico de PARP1, (ADP- ribosil) transferase (ART). Utilizando a forma oxidada de NAD⁺ como substrato, PARP1 catalisa a ligação covalente de poli (ADP-ribose) nos resíduos de glutamato, aspartato, lisina, tirosina e serina das proteínas-alvo (ALEMASOVA; LAVRIK, 2019).

A parilação contribui para diversas funções de PARP1 no reparo do DNA, incluindo o reparo de quebras simples e duplas, estabilização de forquilhas de replicação e modificação da estrutura de cromatina (LEUNG, 2017). PARP1 é também responsável pela identificação e sinalização rápida dessas quebras simples ligando-se ao local da quebra. Diante desta lesão, PARP1 se autoparila e se autoativa e, em seguida, parila outras proteínas. Portanto, a inibição química do sítio de parilação da PARP1 causa a sua manutenção no local da lesão impedindo o reparo.

A estratégia de inibição de PARP envolve, particularmente, a inibição catalítica da atividade de PARP1 em tumores que possuem alterações em genes envolvidos no reparo de quebras duplas do DNA. Nestes tumores, a abordagem em que a inibição concomitante de dois genes ou proteínas incorre em morte celular denomina-se letalidade sintética (O'NEIL; BAILEY; HIETER, 2017). De fato, os inibidores de PARP (PARPis) foram considerados os primeiros inibidores de reparo do DNA.

A monoterapia com os PARPis Olaparib, Rucaparib e Niraparib é atualmente empregada no tratamento de tumores de mama, de ovário e de próstata que carregam mutações somáticas ou adquiridas nos genes

BRCA1 ou *BRCA2* (ASHWORTH; LORD, 2018; ZIMMER et al., 2018). Estes agentes atuam como inibidores de PARP1/2, especialmente pela abundância e relevância de PARP1 no contexto da resposta a danos ao DNA (LORD; ASHWORTH, 2017).

Inicialmente, acreditava-se que a letalidade sintética nestes tumores era fruto do (1) acúmulo de quebras simples e (2) da conversão das quebras simples não reparadas a quebras duplas na forquilha de replicação, as quais precisam de BRCA para iniciar o reparo (MURAI 2018). Hoje, sabe-se que a citotoxicidade dos PARPis é mediada pela capacidade destes agentes em estabilizar os complexos PARP-DNA nas quebras simples, o que é chamado de “PARP *trapping*” (POMMIER; CONNOR; BONO, 2016). (Tabela 1) (Figura 4).

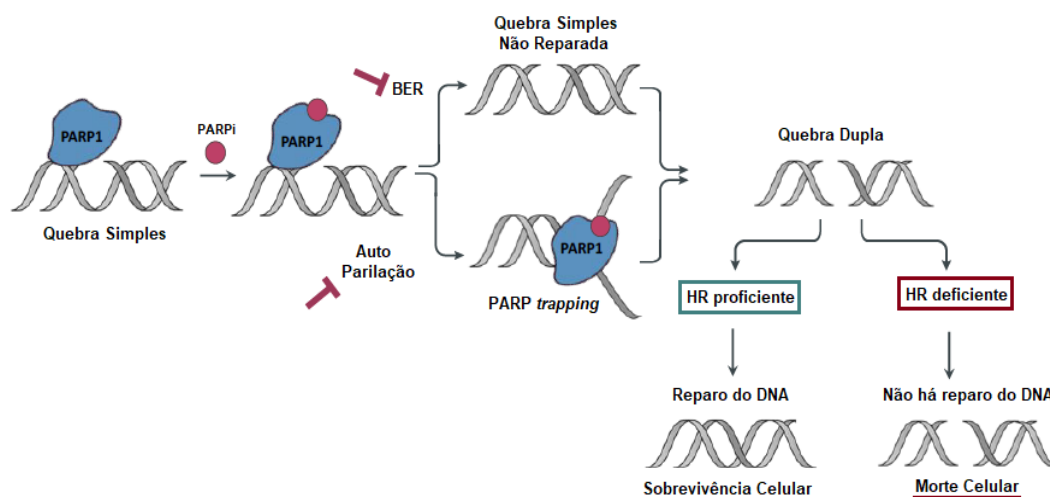


Figura 4. Letalidade sintética de PARPi. Adaptado de MATEO et al., 2019.

Este mecanismo é muito mais tóxico do que a geração de muitas quebras simples pela inativação de PARP1, pois leva a um bloqueio da replicação e à ativação dos *checkpoints* mitóticos, mantendo as células paradas na fase S do ciclo celular. Assim, fica claro que há um imenso potencial para o emprego de PARPis como um agente indutor de danos ao DNA em tumores que sejam deficientes na via de reparo por recombinação homóloga (MURAI; POMMIER, 2019). Portanto, como os complexos PARP-DNA são obstáculos para a replicação celular, a

estabilização da forquilha de replicação é descrita como um dos principais mecanismos de resistência aos PARPis (MURAI, 2017).

Tabela 1. Comparação entre os inibidores de PARP aprovados para uso clínico.

| | IC50 para inibição da atividade catalítica (μM) | Potência de “trapping” (vs. Olaparib) | Indicação clínica |
|-------------|--|---------------------------------------|--|
| Olaparib | 0,006 | 1 | Monoterapia em regime de manutenção para tumores de mama e tratamento de tumores de ovário com mutações em <i>BRCA</i> |
| Niraparib | 0,06 | 2 | Monoterapia em regime de manutenção para tumores de ovário |
| Rucaparib | 0,021 | 1 | Monoterapia em regime de manutenção para tumores de mama e tratamento de tumores de ovário com mutações |
| Talazoparib | 0,004 | 100 | Monoterapia para tumores de mama HER2 negativos avançados ou com suspeita de mutação em <i>BRCA</i> |
| Veliparib | 0,030 | <0,2 | Combinação com outros agentes ainda em estudo |

Adaptado de MURAI; POMMIER, 2019.

Até agora, uma estratégia clínica bem-sucedida para o uso de PARPis em combinação com quimioterapia ainda não foi desenvolvida. Os PARPis entraram na clínica pela primeira vez em 2003 em combinação

com agentes citotóxicos que danificam o DNA, com base em estudos pré-clínicos que demonstraram seu potencial de quimio- e radio sensibilização. No entanto, todos os estudos iniciais demonstraram o mesmo desafio clínico: ao inibir o reparo de quebras no DNA, a toxicidade nos tecidos saudável era muito elevada (YAP et al., 2019).

Embora ainda empregados somente sob a forma de monoterapia (Tabela 1), já está bem estabelecida a sensibilidade cruzada entre os PARPis e agentes platinados. Inclusive, os PARPis são a única classe de agentes antineoplásicos com indicação exclusiva a tumores previamente tratados com determinados agentes, como a cisplatina. Embora a inibição de PARP e o reparo de adutos e *crosslinks* induzidos pela cisplatina não compartilhem das mesmas vias, tumores de ovário com mutações em *BRCA2* são sensíveis a ambos os agentes. Adicionalmente, tumores de ovário com deficiências em NER são marcadamente mais sensíveis aos PARPis – daí a indicação clínica de Olaparib e de Rucaparib a tumores previamente tratados com cisplatina (COLEMAN et al., 2017; KONSTANTINOPOULOS et al., 2015).

PARPis apresentam altíssimo sinergismo com agentes alquilantes, como a temozolomida, e inibidores de TOP1, como a camptotecina. Ambos induzem quebras simples no DNA, as quais são sinalizadas pela PARP1. Todavia, os mecanismos que explicam este sinergismo são completamente diferentes. No caso da TMZ, este efeito é causado pelo *trapping* de PARP e pela inibição da parilação (SHELTON et al., 2013). Em relação aos inibidores do TOP1, o efeito resulta da inibição da atividade catalítica de PARP1 (DAS et al., 2014). Portanto, vê-se que a sensibilidade aos PARPis depende muito mais da forma como eles se ligam aos substratos de DNA do que à presença de alguma deficiência intrínseca na resposta a danos ao DNA.

1.3.1 Inibidores de PARP no tratamento do câncer colorretal

As primeiras investigações sobre o uso dos PARPis no tratamento do CCR foram com o inibidor ABT-888, mais tarde conhecido como

veliparibe (GENG et al., 2011). Seguindo a premissa de que os PARPis aumentariam a sensibilidade aos compostos genotóxicos nas células tumorais, o efeito dos PARPis tem sido testado em células de tumores colorretais em combinação com o irinotecano, a oxaliplatina, o 5-FU e a radiação ionizante.

Um estudo observou uma resposta sinérgica do ABT-888 com oxaliplatina e com irinotecano em células de CCR (DAVIDSON et al., 2013). Outro estudo demonstrou que a adição de ABT-888 aumentou a sensibilidade das células de CCR à radiação (SHELTON et al., 2013), apoiando ainda mais a hipótese de que o PARPi é uma opção viável para melhorar a resposta aos esquemas terapêuticos atuais no CRC. Um recente estudo aberto de fase II avaliou a eficácia do veliparibe PARPi em combinação com temozolomida em pacientes com mCCR refratários às terapias padrão. Cinquenta pacientes foram incluídos no estudo, 24% exibiram resposta de controle da doença e 4% mostraram resposta parcial à terapia combinada (PISHVAIAN et al., 2018).

Um dos mecanismos determinantes para a sensibilidade aos PARPis é a presença de bases danificadas. Isto acontece porque estas lesões necessitam de PARP1/2 para o início do BER. PARP1/2 se liga ao fosfato da 5'-desoxirribose (5'-dRP) gerada após a clivagem de sítios abásicos pela APE1. Por sua vez, a ativação de PARP recruta a proteína de arcabouço XRCC1 do BER com polimerase β (POLB) e ligase III. Isso explica por que as células com deficiência de XRCC1- e POLB são hipersensíveis a PARPis com mais PARP1 ligada ao DNA (MURAI; POMMIER, 2019).

A letalidade sintética tem sido claramente demonstrada em células que possuem defeitos nas vias de reparo de quebras duplas do DNA, especificamente células com mutações em BRCA (LORD and ASHWORTH, 2017; McCABE et al, 2006). Por esta razão, pode-se prever que células de CCR que respondem bem a PARPi devem possuir defeitos em proteínas do reparo de quebras-duplas. Um estudo observou que células de CCR que carregavam mutação que inativavam ATM possui uma aumentada sensibilidade ao PARPi Olaparib, devido a alterações na sinalização de checkpoint celular (WANG et al, 2017). Estes dados se

correlacionam com estudos anterior em canceres gástrico e de pulmão que encontraram que a perda de ATM aumentava a sensibilidade a inibição de PARPi (KUBOTA et al, 2014; SCHMITT et al, 2017). Entretanto, devido ao limitado número de modelos para estudos pré-clínicos, estes resultados ainda necessitam de confirmação em estudos clínicos maiores.

Além de explorar defeitos no reparo de quebras duplas em células de CCR, foi postulado que células que exibem MSI também podem ser suscetível a inibição de PARPi. Em 2014, um estudo demonstrou que a perda de MRE11 em células de CCR com MSI apresentavam uma maior sensibilidade ao PARPi ABT-888 (VILAR et al, 2011). Uma das explicações possíveis é a indução de mutações em genes do reparo de DNA nestas células, o que conferiria um fenótipo de deficiência de reparo e tornaria estas células mais suscetíveis aos efeitos da inibição de PARP. Esta hipótese foi apoiada em modelos de malignidades mieloides (GAYMES et al, 2013). Um estudo clínico de fase II investigou um uso *off-label* de PARPi em células de CCR com MSI e MSS (do inglês: microsatellite stability) para determinar se o status de microssatélites poderia ser utilizado como um marcador preditivo de resposta aos PARPi. Os resultados do estudo sugerem que PARPi em monoterapia não afetou o desfecho dos pacientes independentemente do status de microssatélites (LEICHMAN et al, 2016). Enquanto PARPi em monoterapia foram aprovados para o tratamento de outros tipos de cânceres que exibem deficiência no reparo de recombinação homóloga, PARPi não são utilizados em pacientes com CCR. Entretanto, apesar da importância da instabilidade de microssatélites para o CCR e da utilização de 5-FU nos esquemas de tratamento destes tumores a utilização de inibidores de PARP nestes casos ainda não foi aprofundada. Portanto, nossa hipótese é de que causando dano ao DNA, através da exposição a 5-FU, e impedindo a resposta a danos do DNA, através da exposição ao inibidor de PARP, criaremos uma nova estratégia de sensibilização ao 5-FU em tumores colorretais com deficiência em MMR.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Avaliar a influência da funcionalidade da via de reparo de malpareamento (*Mismatch Repair*) sobre a citotoxicidade do 5-fluorouracil mediada pelo inibidor de PARP, o Olaparib.

2.2 *Objetivos Específicos*

- Avaliar viabilidade das células de câncer colorretal HCT116 (deficientes em MMR) e HT29 (proficientes em MMR) tratadas com 5-FU e Olaparib em combinação;
- Avaliar o potencial de formação de colônias das linhagens HCT116 (deficientes em MMR) e HT-29 (proficientes em MMR) tratadas com 5-FU e Olaparib em combinação;
- Avaliar os mecanismos de morte celular das linhagens HCT116 (deficientes em MMR) e HT29 (proficientes em MMR) tratadas com 5-FU e Olaparib em combinação;
- Avaliar o ciclo celular das linhagens HCT116 (deficientes em MMR) e HT-29 (proficientes em MMR) tratadas com 5-FU e Olaparib em combinação;
- Avaliar a formação de dano ao DNA por cometa alcalino nas linhagens HCT116 (deficientes em MMR) e HT-29 (proficientes em MMR) tratadas com 5-FU e Olaparib em combinação;
- Avaliar o potencial de adesão das linhagens HCT116 (deficientes em MMR) e HT-29 (proficientes em MMR) tratadas com 5-FU e Olaparib em combinação;
- Avaliar o potencial de migração das linhagens HCT116 (deficientes em MMR) e HT-29 (proficientes em MMR) tratadas com 5-FU e Olaparib em combinação.

3 ARTIGO CIENTÍFICO**ARTIGO**

**Enhancement of 5-FU cytotoxicity by Olaparib is dependent on MMR
status in colorectal cancer cells**

Artigo a ser submetido a revista DNA Repair

<https://www.sciencedirect.com/journal/dna-repair>

Fator de Impacto: 3.711

Qualis A2

Manuscript title: Enhancement of 5-FU cytotoxicity by Olaparib is dependent on MMR status in colorectal cancer cells

Authors:

Helena de Castro e Gloria¹

Laura Jesuíno Nogueira²

Patrícia Bencke Grudzinski²

Paola Victória da Costa Ghignatti²

Natalia Motta Leguisamo²

Jenifer Saffi^{1#}

¹Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Sarmiento Leite St, 245, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular, Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/Fundação Universitária de Cardiologia (ICFUC), Princesa Isabel Av.,370, Porto Alegre, RS, Brazil.

#corresponding author. Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Sarmiento Leite St., 245, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: jenifers@ufcspa.edu.br; Phone: +55 51 3303 8824

Highlights

- **Olaparib enhances 5-FU cytotoxicity by reducing viability and clonogenic survival of MMR-deficient CRC cells.**
- **DNA damage induction by 5-FU is increased by Olaparib in MMR-deficient CRC cells.**
- **Olaparib does not enhance 5-FU-induced cell cycle perturbations, but promotes G2/M arrest in MMR-deficient CRC cells.**
- **Olaparib and 5-FU combination impairs adhesion and migration capacities irrespective of MMR status in CRC cells.**
- **Olaparib monotherapy induces DNA damage and impairs adhesion and migration capacities in MMR-proficient CRC cells.**

Abstract

The progresses in colorectal cancer (CRC) treatment include the identification of deficiencies in Mismatch Repair (MMR) pathway to predict the benefit of adjuvant 5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatin and, more recently, to immunotherapy. Despite 5-FU-based chemotherapy regimens are still the cornerstone of CRC therapeutic approaches, it is considered unspecific and suboptimal, drawing attention to the need of new strategies. A growing body of evidences have been suggesting new rationale for the use of Poly-(ADP-ribose) polymerase inhibitors, such as Olaparib, beyond tumors with intrinsic deficiencies in Homologous Recombination Repair (HRR), particularly in combination to DNA damaging agents. Here, add new evidences on Olaparib-mediated 5-FU cytotoxicity in CRC cells and how it occurs in a MMR-dependent fashion. Additionally, we report genotoxicity and antineoplastic effects induced by Olaparib monotherapy in MMR proficient CRC cells. Thus, our results suggest a role for inclusion of Olaparib for CRC treatment: (1) in combination with 5-FU for MMR deficient CRC and (2) as monotherapy for MMR proficient CRC.

Keywords: Colorectal cancer; Mismatch Repair; 5-fluorouracil; PARP; Olaparib

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a major health problem worldwide owing to its high prevalence and mortality rates (1). While early stage CRC patients present good prognosis, patients with nodal or distant metastasis frequently develop recurrence, and long-term survival may be as low as 5% in stage IV (2). The standard regimen of CRC consists in 5-fluorouracil (5-FU)-based chemotherapy alone or in combination with oxaliplatin and/or irinotecan and targeted-therapies (3). However, the improvements of these combinations in clinical outcomes are considered modest, mostly because of drug resistance (4). Thus, the identification of biological factors to enhance or hinder therapeutic response is the main hurdle to improve survival rates in CRC patients.

The substantial progresses in the comprehension of CRC molecular complexity allowed the recent developments in the clinical management of this disease, including the identification of *KRAS* activating mutations and microsatellite instability (MSI) (5,6). MSI in sporadic CRC occurs as a result of random *hMLH1* promoter hypermethylation, which leads to the inactivation of mismatch repair (MMR) pathway followed by accumulation of high level of mutations (7). MMR deficiency (dMMR) in early stage CRC predicts lower recurrence rates and partially justifies the absence of indication of fluoropyrimidine adjuvant monotherapy (8,9). In counterpart, patients harboring stage III MSI tumors benefit from oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy only, but not with fluoropyrimidine monotherapy (10,11). Recently, detection of MSI was introduced as a predictive biomarker for response to immunotherapy in patients with advanced CRC (12). Unfortunately, for most of patients with advanced CRC, treatment is still prescribed in a 'one-size-fits-all' fashion with the majority of patients still lacking of consistent benefits.

5-FU-mediated cell death mechanisms include thymidylate synthase (TS) inhibition, dNTP pool imbalances and misincorporation of uracil and fluorouracil basis into DNA during replication. The exact mechanism by which 5-FU exerts its cytotoxicity is not completely elucidated, but it is well established that it affects DNA damage response (DDR) and multiple

DNA repair pathways. Proficient MMR (pMMR) CRC cells have increased sensitivity to 5-FU in comparison to dMMR CRC cells. The differences between these two molecular phenotypes occur due to a generation of a futile cycle of repair in the attempt to remove uracil and fluorouracil basis during DNA replication in pMMR CRC cells (13). Base Excision Repair (BER) pathway also imposes its own toxicity, triggered by uracil–DNA glycosylase (UDG) because of misincorporation of uracil into DNA. Moreover, BER AP endonucleases act in the same pathway as MMR to mediate 5-FU toxicity (14–16). Finally, if 5-FU is not removed from DNA, UDG creates lesions, such as abasic sites, single-strand DNA breaks (SSBs) and double-stranded DNA breaks (DSBs) (17). The presence of DSBs activates Homologous Recombination Repair (HRR). In fact, 5-FU seems to activate Chk1 and Chk2 by ATR and ATM, respectively, interfering and decreasing the efficiency of HRR (18).

In this scenario, emerges the fundamental role of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP). PARP1 and PARP2 are typically associated to BER pathway, since it senses and binds SSBs (due to damage or active repair) and PARylates a variety of substrates to promote XRCC1 accumulation, favoring the assemble of DNA repair effectors at the site of damage (19). Besides its essential role in BER pathway, PARP-1 regulates replication fork progression and recruits critical DNA repair factors such as NBS1 and MRE11 to sites of DSBs (20) and prevents NHEJ Ku proteins to bind into damaged areas (21,22). Chemical inhibition of PARP1 impairs its catalytic activity and allosteric conformation, generating and impeding SSBs repair (23). Persistence of SSBs stall and collapse replication fork resulting in DSBs. DSB repair mainly relies on functional HRR mediated by BRCA proteins (24). HRR-deficient tumors are highly sensitive to PARP inhibitors (PARPis), such as Olaparib (AZD2281). Olaparib was the first PARPis introduced in clinical practice and is currently indicated for patients with germline BRCA-mutated breast and advanced ovarian cancers or as maintenance therapies for patients regardless of BRCA mutation with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer who have had complete or partial response to platinum-based chemotherapy (25–27).

Therefore, since PARPis antineoplastic effects are not limited to HRR-defective or platinum-sensitive tumors, it raises the question if PARPis DNA repair inhibition and cytotoxicity may occur in other settings. Indeed, in order to enable DNA repair following DNA strand breaks generated by genotoxic stress, PARP1 catalyzes the transference of ADP-ribose polymers to downstream DNA repair enzymes (28). Therefore, PARP inhibition enhances response to conventional therapy and is considered a radio- and chemosensitizer (29,30). It was recently proposed that replication stress-associated DSBs also induce MSI in MMR-deficient cells. In fact, colorectal adenomas exhibit endogenous replication stress, a phenotype that can be exploited through therapies that target this condition, such as PARPis. Despite outcomes in patients with CRC treated with PARPis monotherapy seem not to be influenced by MMR status (31), it has been postulated that MSI tumors exhibit mutations within DNA repair genes (32), which may implicate in increased susceptibility to the effects of PARP inhibition. Interestingly, these studies suggest that this effect is mediated by deficiencies in HRR pathway (MRE11, ATM, ATR) or HRR-like defect phenotype (lacking MSH3) (33–36). Although clinical relevance of MMR status in CRC prognosis and response to 5-FU is undeniable (37), information regarding efficacy of this agent and PARPis in CRC cells with different genetic backgrounds is still controversial (38–40). Thus, the aim of this study was to assess the influence of MMR status in the sensitivity of CRC cells to a combination of 5-FU and the PARPis Olaparib and the mechanisms underpinning this response.

Materials and Methods

Reagents and drugs

Culture media and supplements (Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose (DMEM); fetal bovine serum (FBS); penicillin/streptomycin, trypsin/EDTA; antimycotic) and Trypan Blue were all purchased from Gibco (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brazil). 5-fluorouracil (Cas number 51-21-8), MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Cas number 298-93-1), propidium iodide (PI; Cat number 25535-16-4) and Dimethyl Sulfoxide (DMSO; Cas number 67685) were all purchased from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Olaparib was purchased from Toronto Research Chemicals (Cat number 763113-22-0, Toronto Research Chemicals, North York, ON, Canada). PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I was purchased from BD Bioscience (Cat number 559763, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). All other chemicals and solvents used were of analytical or pharmaceutical grade.

Cell line and culture conditions

Two representative human colorectal cancer cell lines with different status of MMR proficiency, HCT116 (MSI, *MLH1*^{-/-} and *MSH3*^{-/-}, *KRAS*^{mut}, *TP53*^{wt}) (41) and HT29 (MSS, *BRAF*^{mut} and *TP53*^{mut}) (42) were originally obtained from ATTC® (Manassas, VA, USA). Cells were cultured in DMEM medium, supplemented with 10 % FBS and 1 % penicillin/streptomycin and antimycotic, incubated at 37° C in humidified atmosphere with 5 % CO₂. Cultured cell concentrations were adjusted to allow for exponential growth. At 80 % of confluence, cells were detached with 0.5 % of trypsin/EDTA and used for the experiments.

Experiment Setup

Cells were seeded at different densities according to the experiment performed. Following 24 h, cells were treated with 5-FU (5, 10, 20, 30 and

40 μM) or Olaparib (5 and 10 μM) or in combination for further 48 h or 72 h. Untreated cells were used as control. A 100 mM stock of 5-FU was prepared in absolute DMSO and stored at -20°C . Olaparib stock solution was prepared at 10 mM and stored at -20°C . Serial dilutions were prepared in culture medium.

Cell Viability

Cell viability was assessed by MTT assay. HCT116 and HT29 cells were adjusted to a density of 1×10^4 cells and transferred to 96-well plate with a volume of 100 μL per well. After treatment, 100 μL of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well and incubated at 37°C for 3 h. Next, cell culture supernatant was removed and 100 μL of DMSO was added to each well to dissolve the formazan crystals. Absorbance readings of DMSO extracts were performed in SpectraMax® microplate reader (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA) at 540 nm.

The mode of interaction (synergy, antagonism or additivity) was determined by calculating the combination index (CI) (43) using CompuSyn software program (CompuSyn, Inc., Paramus, NJ). The degree of drug synergy was classified as follows: if $\text{CI}=1$, additive effect; if $\text{CI} < 1$, synergistic effect; if $\text{CI} > 1$, antagonistic effect (44).

Clonogenic Survival

Cells were treated as previously described. After 48 or 72 h of exposure to treatments, cells were detached, counted and seeded in 6-well plates at a density of 6×10^2 cells per well in complete medium. Therefore, cells were further incubated for 14 days to allow colony formation. Colonies were fixed with ice-cold methanol for 20 min, stained with crystal violet (0.5 % w/v) solution for 10 min.

Apoptosis Determination

Assessment of cell death profile was performed as follows: HCT116 or HT29 cells were seeded in a density of 2×10^5 cells in 6 well-plate (2 mL per well) and treated for 48 h or 72 h. Next, cells were detached and processed according to PE-Annexin V Apoptosis Detection Kit I manufacturer instructions (BD Biosciences). Cells were stained with PE-Annexin V and 7AAD at room temperature for 15 min in the dark. Finally, quantification of live (Annexin⁻/7AAD⁻), early apoptotic (Annexin⁺/7AAD⁻) and late apoptotic/necrotic (Annexin⁺/7AAD⁺) cells was carried out on BD FACSCanto™ II flow cytometer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) after 10,000 events acquisition.

Cell Cycle Perturbation

Cells were seeded in 6 well-plates (2×10^5 cells/well) and treated as previously described. After treatment, adherent and detached cells were fixed with chilled 80% ethanol at -20° C for at least 24 h. After removing ethanol, cells were permeabilized (0.1 % TritonX-100 in PBS), stained at 37° C for 30 min in PBS containing 25 μ g/mL PI and 50 μ g/mL RNase. Data was acquired was in BD FACSCanto™ II flow cytometer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) after 20,000 events acquisition. The analysis was performed with CellQuest software (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

DNA Damage Induction

DNA damage induction was assessed by Comet Assay. Cells were seeded in 24 well-plates (1×10^4 cells/well) and treated as previously described. At the end of treatment, HCT116 or HT29 cells were detached and mixed with 100 μ L 0.75 % low melting point agarose at 37° C and spread on the agarose-coated slides using a coverslip. Coverslips were removed after resting at 4° C for 3 min. The slides were immersed in cold lysis solution at 4° C for 24 hours. Next, slides were placed in an

electrophoresis chamber filled with fresh alkaline buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) for 20min at 4° C. Electrophoresis was performed at 300 mA and 25 V for 20 min. The slides were washed 3 times with 10 mM Tris buffer (pH 7.5) for neutralization. Finally, the slides were stained with silver nitrate and analyzed at 200x magnification using an optical microscope. DNA damage was evaluated using visual classification from 0 (no damage, no tail) to 4 (maximum damage, long tails). One hundred cells were counted for each slide. The DNA damage level was expressed in arbitrary units (A.U.) 0-400.

Adhesion measurements

Cells were treated for 48 h as previously described. Next, 3×10^2 alive cells were counted and then transferred to each well of a 24-well plate, and attached cells were counted on a light microscope following 2, 4, 6 and 24 h of seeding (45). The adherence capacity (AC) was calculated as follows: $AC = (\text{number of attached}/\text{number of plated cells}) \times 100$.

Migration Measurements

Cell motility was assessed in 8- μ m pore polycarbonate membrane ThinCerts™ inserts (Greiner Bio-one Brasil, Americana, SP, Brazil). Cells were treated, detached, counted with trypan blue 0.4 % and then 100 μ L containing 2×10^5 cells suspended in DMEM/FBS-free medium were added to the top of the insert, except for one, which contained DMEM/10 % SFB as a negative control. In the insert bottom was added DMEM/20 % FBS. Cells were allowed to migrate for 24 h. For quantification, non-migrated cells were removed with a swab, the membrane were fixed in methanol for 10 min and stained in Giemsa solution for 20 min. The membranes were washed with distilled water, removed with a scalpel and the bottom of the membrane was placed up in a slide. The membrane was covered by a coverslip. Migrated cells were counted in five different random fields.

Statistical Analysis

For data quantification, mean values and standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM) were calculated from at least three experimental replicates. Data were analyzed by Graphpad Prism, version 8.0 (Graphpad InStat – NIH, Bethesda, MD, USA) using ANOVA test (Analysis of Variance) one or two-way according to the experimental design, followed by post-hoc of Tukey or Bonferroni. Two-sided P-values < 0.05 were considered significant.

Results and Discussion

Synergism of 5-FU and Olaparib is affected by MMR status in colorectal cancer

Conventional cancer regimens rely on chemotherapy, which generally exert its effects by inducing DNA damage or disrupting the mitotic machinery. While 5-FU has been the backbone of sporadic CRC treatment since 1960, advances in molecular comprehension, including the role of MMR deficiencies in response to therapy, brought to light a mechanism for 5-FU resistance. Despite immunotherapy seems the best therapeutic approach for advanced CRC harboring MSI, its efficacy has not been established for stages II and III (46). Alternatively, benefit may arise from combination therapy based on agents with non-overlapping mechanisms to reach synergistic or additive mechanism to overcome 5-FU resistance in the MMR deficient subset of colorectal tumors.

PARPi monotherapy has encountered its greatest efficacy in solid tumors with intrinsic HRR deficiencies. However, with the advances in the comprehension of PARPi sensitive-determining factors emerged the possibility of combinations with DNA damaging agents. In fact, PARPi are considered chemosensitizers of alkylating agents (temozolomide) and Topoisomerase 1 (TOP1) inhibitors (camptotecins) (29). Based on the fact that chemotherapy can increase DNA damage and PARPi can diminish the ability of PARP enzymes to repair DNA damage (47), it seems counterintuitive to explore these combinations. Thus, we hypothesized that causing DNA damage (via 5-FU) and impairing DNA damage response (via PARP inhibition) is potential a strategy to recreate 5-FU sensitivity in colorectal tumors with MMR deficient background.

First, we examined the anti-proliferative properties of the single drugs and their combination in 1:1, 1:2, 4:1 and 2:1 mixtures by exposing MSI (HCT116) and MSS (HT29) CRC cell lines during 48 h or 72 h (Figure 1). We observed a clear reduction of viability in both cell lines, when treating with 5-FU alone, and a slight effect with 10 μ M of Olaparib alone

(mean reduction of 25%). As expected, HT29 cells were more sensitive to 5-FU ($IC_{50} = 36.7 \mu\text{M}$, 48 h) than HCT116 ($IC_{50} = 58.7 \mu\text{M}$, 48 h), which is attributed to the requirement of proficient MMR to achieve 5-FU toxicity (8,48). In combination, Olaparib increased the cytotoxic effect of 5-FU in HCT116 in a time, but not in a dose-dependent manner. While after 48 h of treatment, this effect was achieved only in combination to 20 μM of 5-FU (mean of 48% increment in cell death) (Figure 1A), after prolonged exposure (72 h), it was also observed following exposure to Olaparib in combination to 5 μM of 5-FU (mean increment of 53% in cell death) (Figure 1C). Conversely, sensitivity of HT29 to 5-FU was not influenced by Olaparib addition (Figures 1B and 1D).

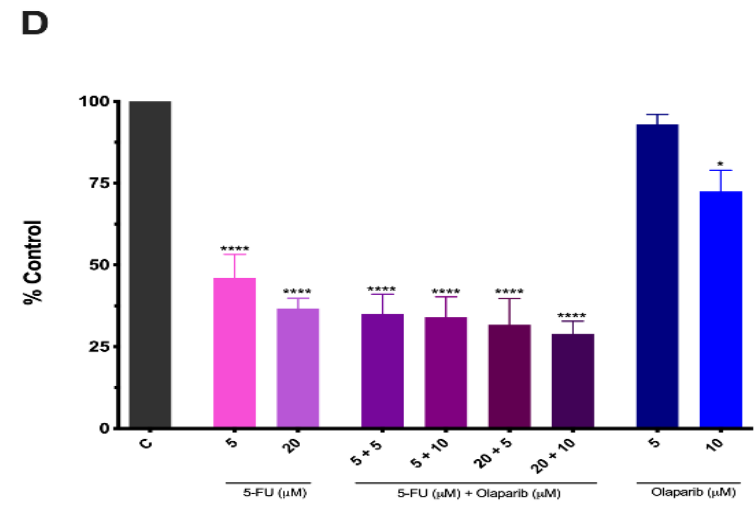
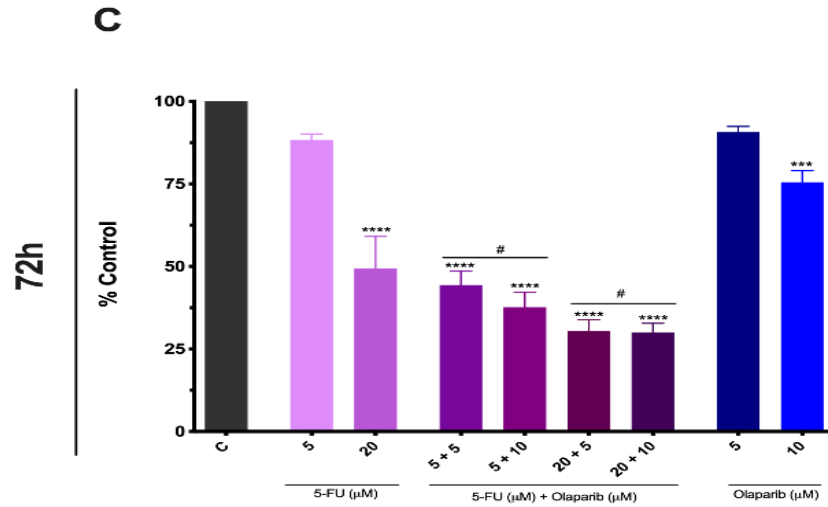
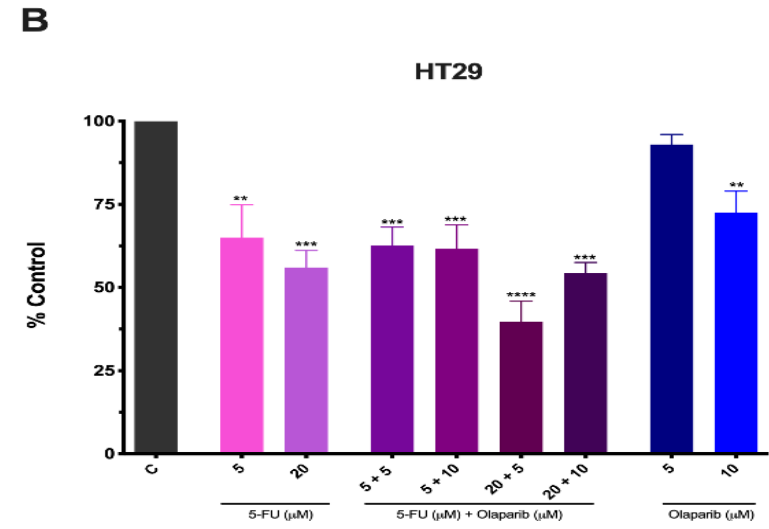
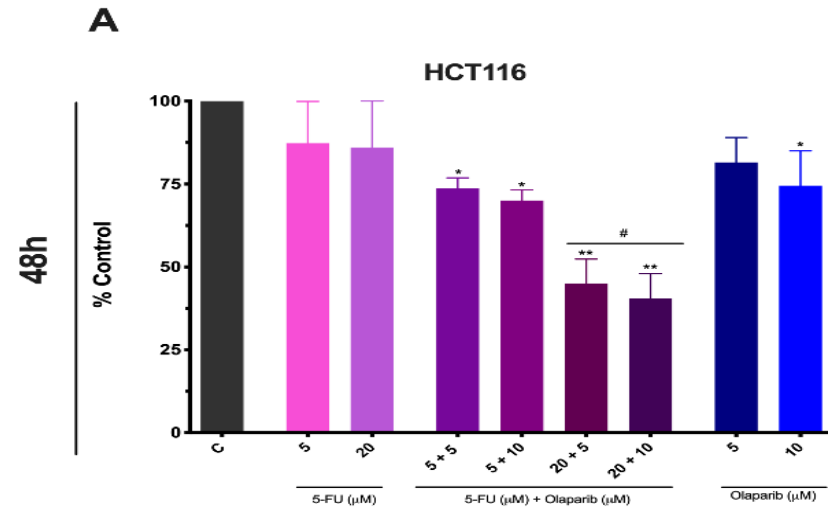


Figure 1. Viability assessment for treatment with 5-FU and Olaparib. (A, C) MTT assay of HCT116 cells treated with 5-FU and/or Olaparib for 48h and 72h, respectively (n=3). (B, D) MTT assay of HT29 cells treated with 5-FU and/or Olaparib for 48h and 72h, respectively (n=3). Untreated cells were used as negative control (c). *p<0.05, **p<0.01 and p<0.001 vs. control; #p<0.05 vs. 5-FU in monotherapy in the same concentration.

To determine whether the enhanced inhibitory effect observed in HCT116 cells following 5-FU and Olaparib combinations was additive or synergistic, we computed combination indexes using the aforementioned Chou and Talalay method (43). As presented in Figure 2 and Supplementary Table 1, the interaction indexes of each 5-FU and Olaparib concentration pair were <1.0, indicating synergism, with a proportion showing CI <0.5. Thus, the strongest synergistic inhibitory effect on HCT116 cell growth was reached with 5 μ M 5-FU + 5 μ M Olaparib.

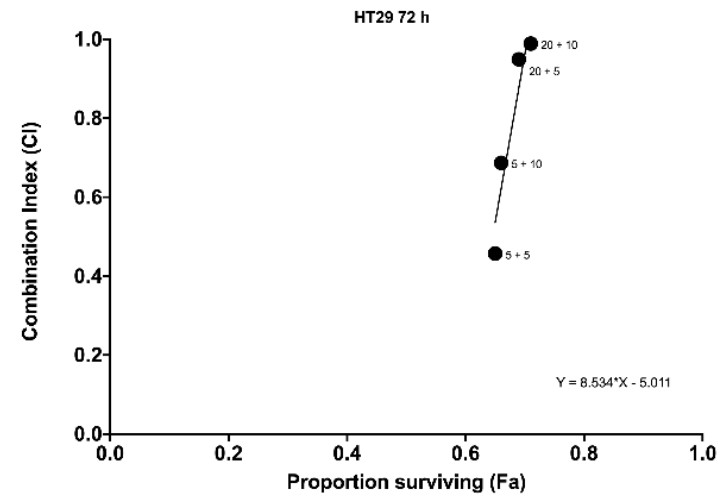
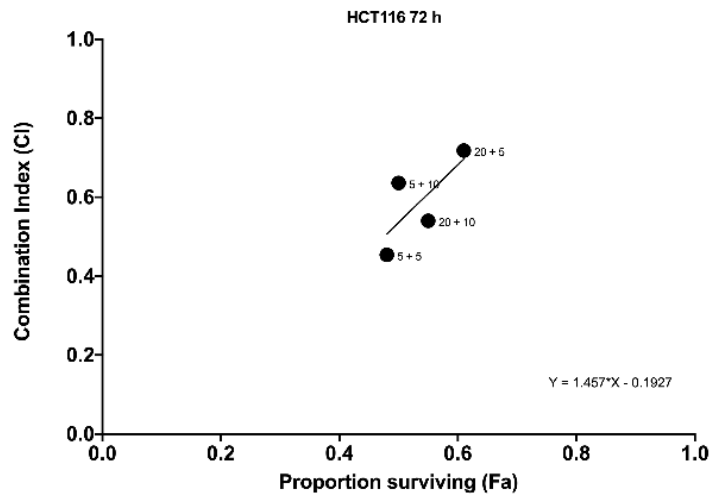
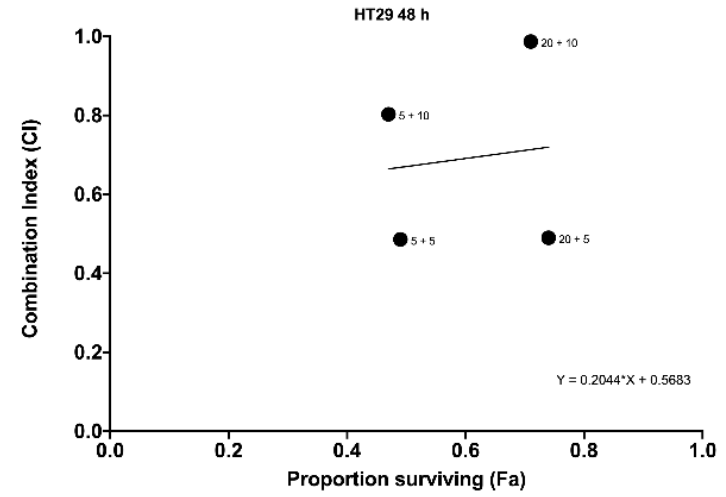
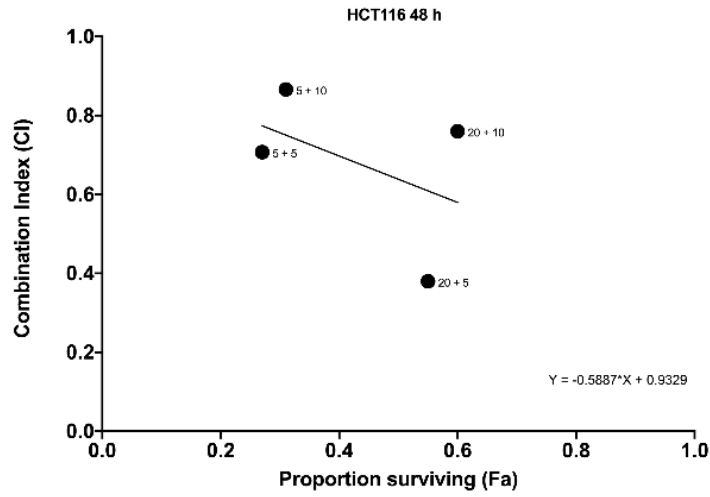


Figure 2. Interaction index plots of 5-FU and Olaparib in HCT116 and HT29 cells. Cells were treated with 5-FU and/or Olaparib for 48 h or 72 h, and then cell viability was measured using an MTT assay. Interaction index plots were computed with the median-effect equation. Synergy was defined as an interaction index <1.0 . The data of interaction plots are shown as the mean of all experiments (n=3).

Some drugs may possibly cause a lethal injury which does not become manifest until several cell generations. Thus, since the mechanisms by which synergistic effects of 5-FU and Olaparib happen may include DNA damage, mitotic dysfunction and chromosome missegregation (49), we speculated to what extent this combination could also affect clonogenic survival (Figure 3). The ability of CRC cancer treated for 48 h and 72 h to form colonies was investigated after 14 days with the clonogenic assay. In consonance to MTT assay results, HT29 were more sensitive than HCT116 to 5-FU alone and in combination to Olaparib (Figure 3). Addition of Olaparib to 5-FU for 48 h implicated in a reduction of 70 % (5 μ M 5-FU + 5 μ M Olaparib) and 97 % (5 μ M 5-FU + 10 μ M Olaparib) ability of HCT116 to form colonies (Figure 3A). Also, Olaparib monotherapy reduced the number of colony formation in both cell lines after 72h (Figure 3B).

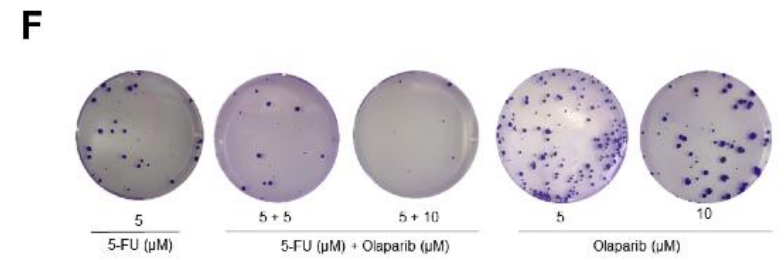
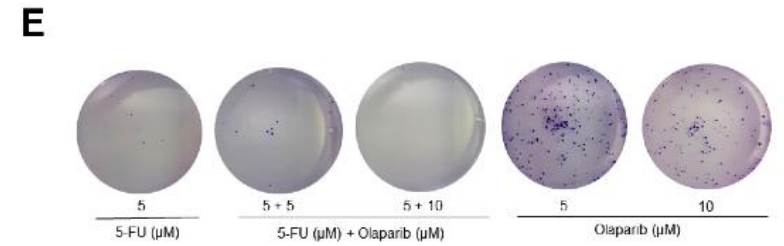
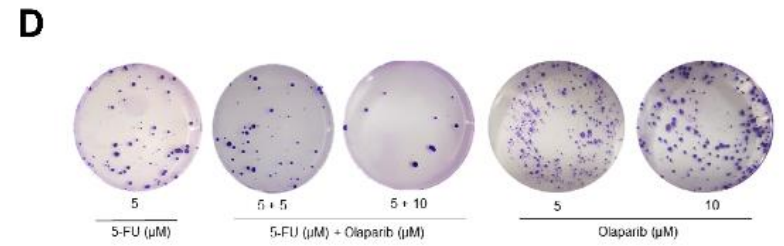
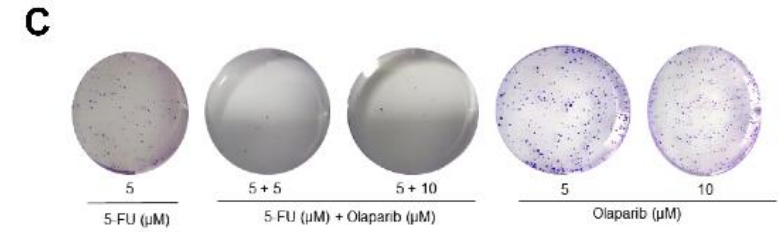
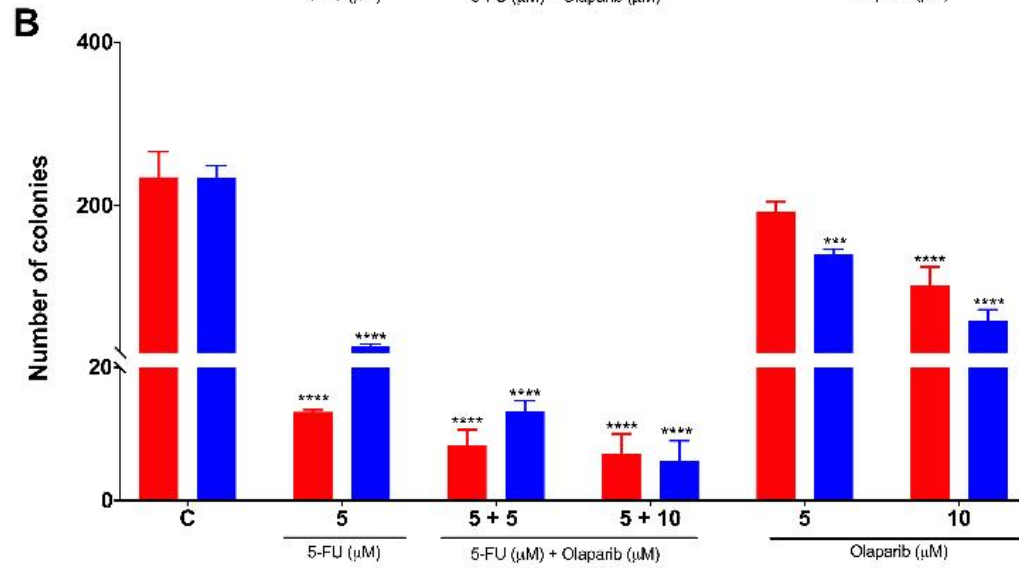
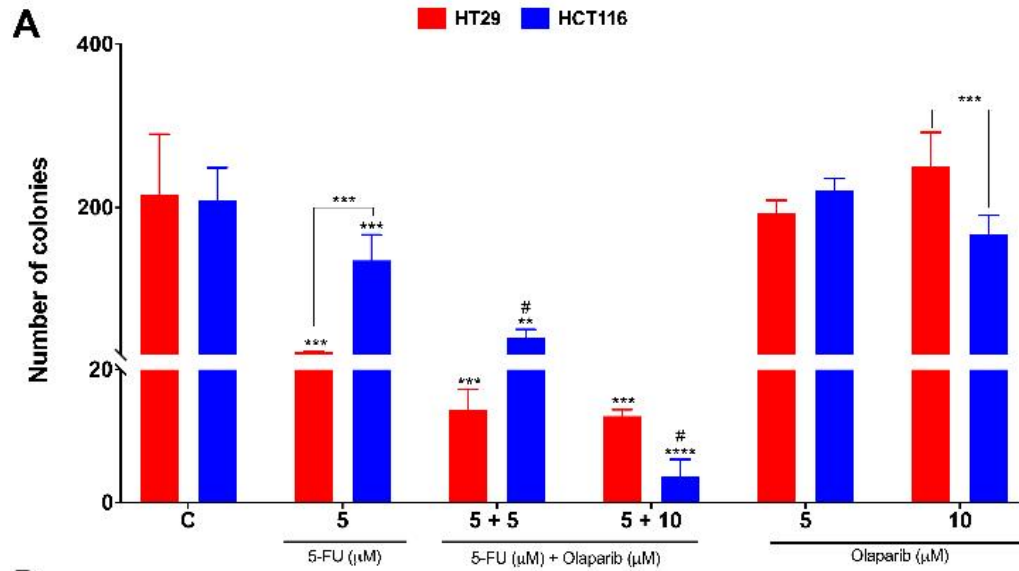
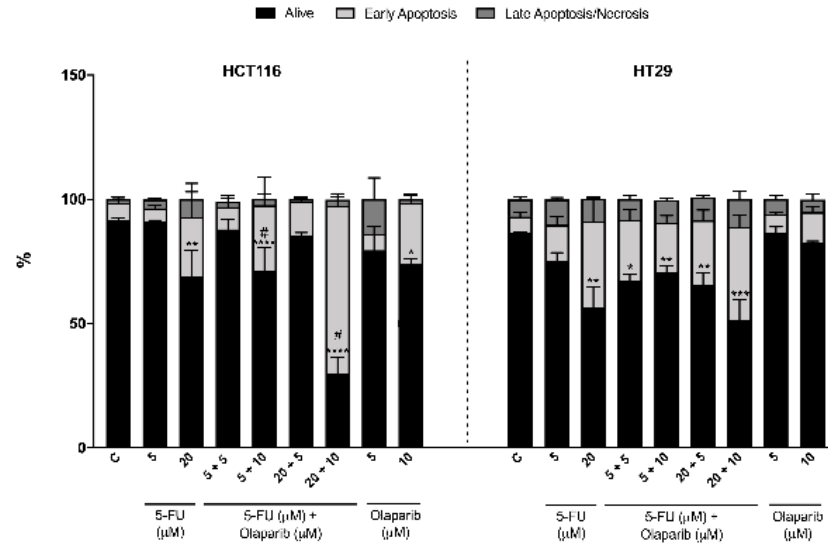


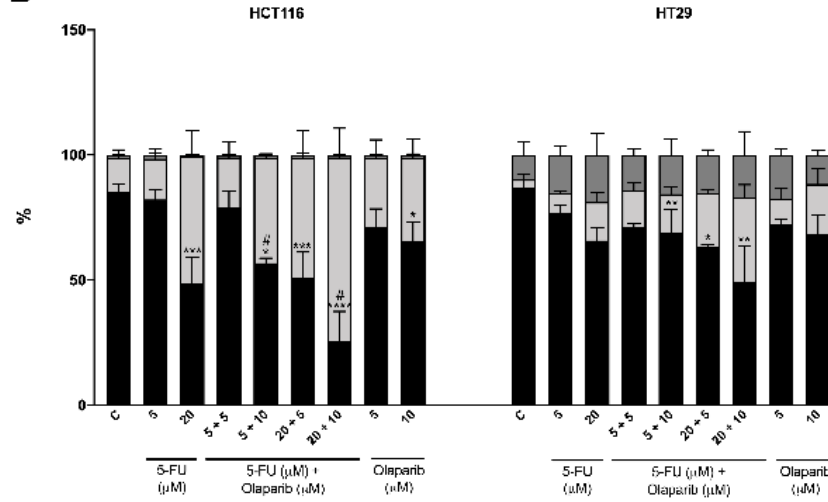
Figure 3. Clonogenic Survival Assay. (A) Quantification of clonogenic survival assay for HT29 and HCT116 cell lines after 48h treatment with 5-FU and/or Olaparib (n=3). (B) Quantification of clonogenic survival assay for HT29 and HCT116 cell lines after 72h treatment with 5-FU and/or Olaparib (n=3). (C, D) Representative images of clonogenic survival assay for HT29 and HCT116 cell lines after 48h treatment with 5-FU and/or Olaparib, respectively. (E, F) Representative images of clonogenic survival assay for HT29 and HCT116 cell lines after 72h treatment with 5-FU and/or Olaparib, respectively. Untreated cells were used as negative control (c). *p<0.05, **p<0.01 and p<0.001 vs. control; #p<0.05 vs. 5-FU in monotherapy in the same concentration.

As a strong synergistic anti-proliferative effect was observed following exposure to 5-FU and Olaparib combination in HCT116 cells, we aimed to determine whether the decreased cell survival was related to apoptosis. Combinations of 5 μ M or 20 μ M 5-FU + 10 μ M Olaparib increased the population of HCT116 apoptotic cells after 48 h (increase of 21% and 38%, respectively) and 72 h (increase of 41 % and 28 %, respectively) of treatment. However, none of combinations enhanced apoptotic population in HT29 cells (Figure 4). Interestingly, single administration of Olaparib induced apoptosis in HCT116 (24 %, p = 0.002) after 48 h and necrosis in HT29 after 72 h (18 %, p = 0.003). Hence, our data suggest that, when Olaparib is combined with 5-FU, the apoptosis induction is enhanced in dMMR, but not pMMR CRC cells.

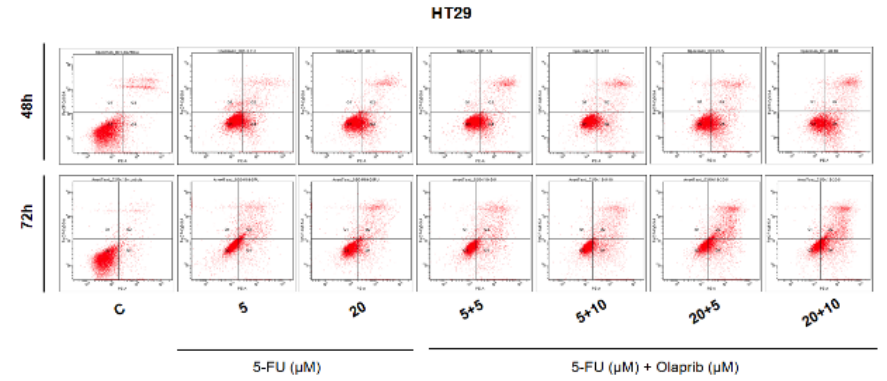
A



B



C



D

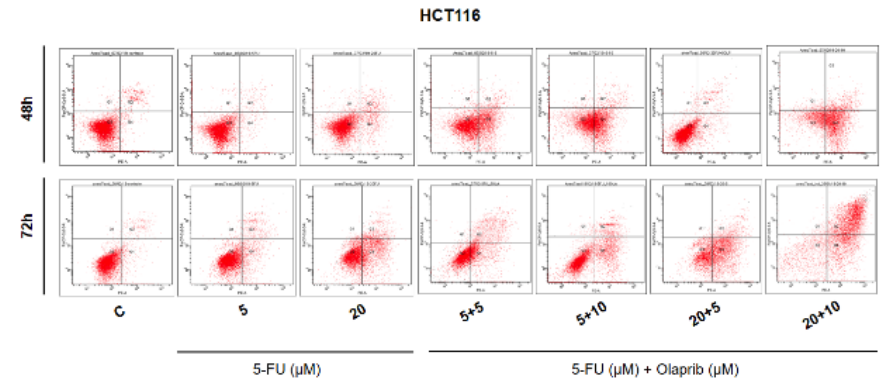


Figure 4. Apoptosis detection. (A) Annexin-V and 7AAD staining was quantified by flow cytometry for HCT116 and HT29 treated with 5-FU and/or Olaparib for 48 h (n=3). (B) Annexin-V and 7AAD staining was quantified by flow cytometry for HCT116 and HT29 treated with 5-FU and/or Olaparib for 72 h (n=3). (C, D) Representative dotplots showing cell distribution between compartments in flow cytometry analysis using Annexin-V and 7-AAD staining for HT29 cells treated with 5-FU and Olaparib for 48h and 72h and HCT116 cells treated with 5-FU and/or Olaparib for 48 and 72 h treatment. Untreated cells were used as negative control (c). *p<0.05, **p<0.01, p<0.001 and p<0.0001 vs control; #p<0.05 vs. 5-FU in monotherapy in the same concentration.

It has been postulated that apoptotic signaling cascade could be activated by the direct interaction of the damage-bound MMR heterodimers, hMutS α and hMutL α , and proteins of the ATR-Chk1 pathway. Consequently, it is thought that MMR acts as a DNA damage sensor, which has been referred as the “direct signaling model” (50,51). In this model, MMR role is beyond DNA repair, as it participates of signal transduction for cell death. Indeed, MMR protein-dependent pro-death signaling in response to various DNA-damaging agents have been well characterized, including 5-FU (13). FU:G and FdUrd:G mismatches caused by 5-FU incorporation into DNA during replication are recognized by MSH2, inducing a futile cycle of repair (52). Continuous attempts to daughter strand excision ultimately lead to disruption of DNA replication, which activates a MMR-dependent ATR-Chk1 signaling (53). Contrariwise, in the absence of a functional MMR (particularly as a result of loss *hMLH1*, as in HCT116), mediated-MLH1 caspase-3 cleavage, an apoptosis initiator, does not occur and nor apoptosis cascade is triggered (54).

Besides *hMLH1*, HCT116 cells also lacks *hMSH3* and have low levels of ATM protein expression in comparison to other CRC cell lines (41,42). CRC harboring frameshift/nonsense mutation in *hMSH3* accounts for almost 50 % of all MMR-deficient CRC (55), which brings clinical relevance to this molecular phenotype. Some *hMSH3*-deficient tumors

behave like HRR-deficient tumors and present replication fork stress, since MSH3 is involved with DSBs and interstrand crosslinks (ICLs) repair (56). Consequently, *hMSH3*-deficient tumors are potentially sensitive to PARPis (33). However, few articles have investigated the effects of *in vitro* combinations of PARPis and 5-FU in colon cancer cell lines, with controversial results (38,39).

When DNA damage occurs in the presence of a PARP inhibitor, such as Olaparib, PARP1 binds to damage sites and remains tightly bound or trapped onto the chromatin. PARP trapping, whereby PARP inhibitors act as DNA poisons by trapping PARP on damaged DNA, resulting in cytotoxic PARP–DNA complexes. These complexes are much more cytotoxic than merely unrepaired SSBs, since PARylation is inhibited, and PARP1 remains bound to the lesion, which leads to stalled replication fork (30,57). Taken together, our results suggest that once PARP1 is trapped to DNA, it cannot proceed with their role in fork stabilization and recruitment of the fork protection machinery (53,58). Consequently, replication fork collapse into DSBs, ultimately leading to cell death.

Enhancement of 5-FU cytotoxicity by Olaparib is mediated by generation of DNA strand breaks in MMR-deficient colon cancer cells

5-FU treatment sensitizes colorectal cancer cells towards DSBs and reduces HRR-mediated repair, which provide a biological rationale for its use as chemo- and radiosensitizer (15,18). While PARPis are synthetic lethal in HRR-deficient tumors, accumulating evidence suggests that PARylation is involved in both SSBs and DSBs repair (59). However, whether MSI-tumors may also be susceptible to PARP inhibition it is still a matter of discussion. Recently, a phase II trial reported that Olaparib monotherapy did not affect patient outcomes regardless of microsatellite status (31). However, DNA repair genes MSI-induced mutations in *MRE11* and *ATM* sensitizes gastrointestinal cancer cells to PARP inhibition (35,60). To date, chemical inhibition of PARP leads to replication fork collapse or accelerated fork progression that generates SSBs and DSBs

(22,61). Thus, to gain insights into the mechanisms underlying the apparent synergistic activity of 5-FU and Olaparib in MSI CRC, we examined genome integrity using single cell gel electrophoresis (comet) assay (Figure 5).

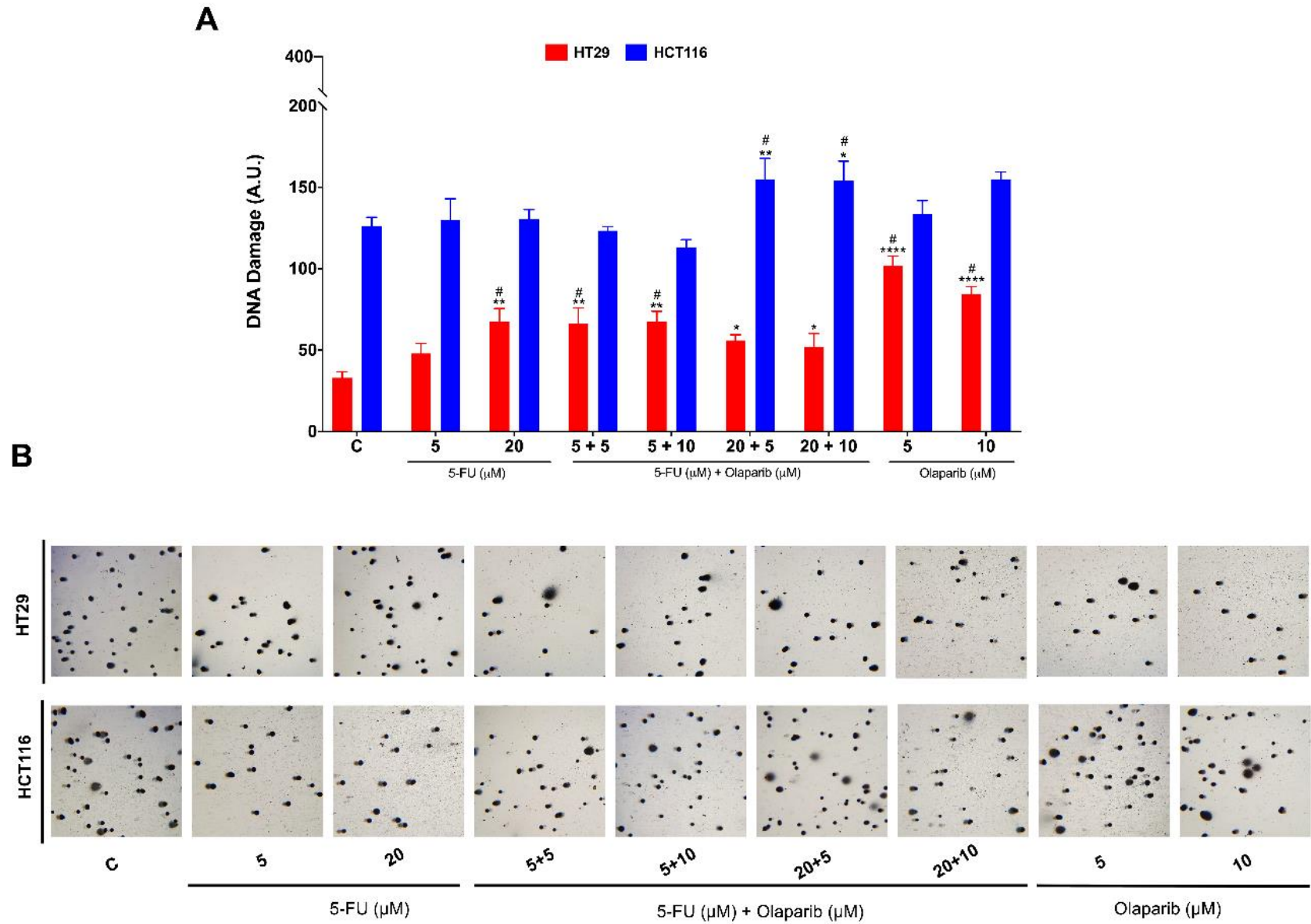


Figure 5. DNA damage. DNA damage quantification by alkaline comet assay was performed immediately after 48 h treatment with 5-FU and/or Olaparib in HCT116 and HT29 and cell lines (n=3). (B) Representative images of alkaline comet assay for HT29 and HCT116 cell lines after 48 h treatment with 5-FU and/or Olaparib. Untreated cells were used as negative control (c). *p<0.05, **p<0.01, p<0.001 and p<0.0001 vs control; #p<0.05 vs. 5-FU in monotherapy in the same concentration.

Exposure of pMMR CRC cells to 5 μ M of 5-FU alone or in combination with 5 or 10 μ M of Olaparib induced DNA strand breaks after 48 h (Mean DNA damage: 67 A.U.; p<0.01). Regarding dMMR CRC cells, this effect was observed after treatment with both combinations of 20 μ M of 5-FU and Olaparib (Mean DNA damage: 155 A.U.; p<0.01). Interestingly, we observed a reduction of DNA damage induction in HT29 cells treated with 20 μ M of 5-FU and Olaparib, indicating that the potential of PARPis to mediate 5-FU SSBs and DSBs formation may be dependent not only on MMR status, but also on the level of provoked DNA damage. Since PARP1 promotes the repair of non-toxic single-strand DNA breaks, which are converted into potentially toxic DSBs during S-phase (62), enhancement of 5-FU cytotoxicity by Olaparib observed in HCT116, but not in HT29, may be partially attributed to increase in DNA strand breaks. It was recently reported that cells with a MMR-deficient background repair DSBs via a PARP-mediated pathway.

Unexpectedly, we identified number of DNA strand breaks 3-fold higher in non-treated HCT116 cells in comparison to HT29. While HT29 cells have chromosomal instability (CIN), HCT116 presents MSI due to MMR deficiency. As aforementioned, HCT116 cells lack both *hMLH1* and *hMLH3*. It has been suggested that *hMLH3* plays a prominent role to elicit DSBs repair and DNA-damage response (33). Actually, it was demonstrated that *hMSH3* silencing results in a 2-fold increase of DSBs (63). In addition to the fact that MSI is associated with downregulation of MRE11 in colon cancer cells, which is essential for optimal signaling of ATM in response to DSBs (64), HCT116 cells also carry a mutation (c3380C>T) in one *ATM* allele, affecting ATM expression to half of normal

(35). It meets previous evidence on mantle cell lymphomas, gastric and colorectal tumors harboring mutations in *ATM* that result in loss of protein or function decrease which are more sensitive to PARPis (35,60,65). Therefore, taking these evidences together, we suggest that PARP inhibition sensitization of dMMR colon cancer cells to 5-FU is partially mediated by impairment, but not deficiency, of HRR pathway.

Olaparib does not enhance 5-FU-induced cell cycle perturbations, but promotes G2/M arrest in MMR-deficient colon cancer cells

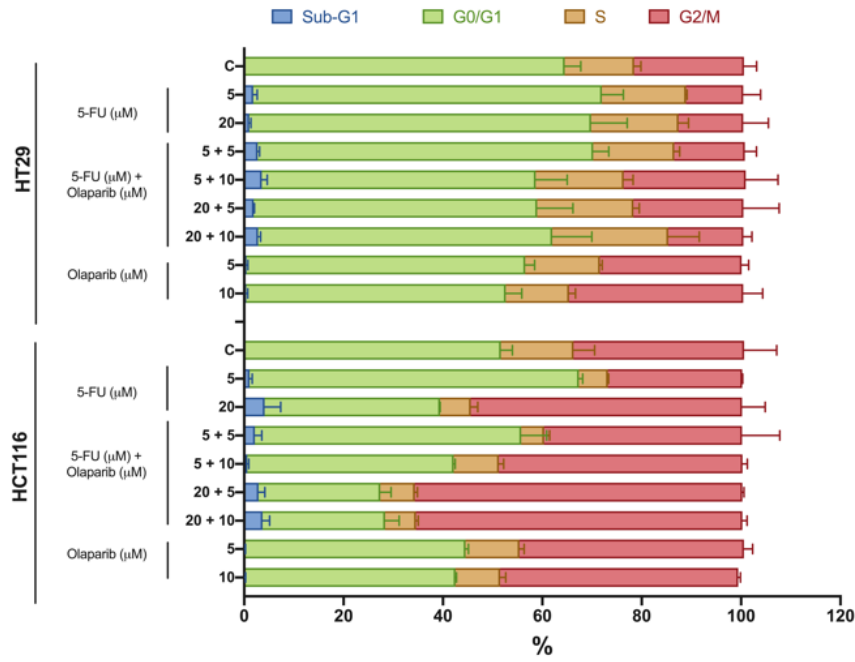
Whereas drug-responsive cancer cells repair DNA damage and go into senescence or apoptosis, loss of cell cycle checkpoints and increase of DNA damage tolerance allows cancer cells perpetuate harmful mutations (66). Therefore, to investigate whether cell cycle arrested contributed to cell death or growth inhibition, we measured cell cycle distribution by flow cytometry after 48 h of treatment (Figure 6). It has been postulated that PARPis-induced cytotoxicity requires disruption cycles of both replication and mitosis machinery, where PARP inhibition promotes stalling or collapse of replication forks. Consequently, replication blockage may be a consequence of entrapment and accumulation of inactive PARP1 (28).

No dramatic alterations are detected upon administration of 5-FU and Olaparib on HT29 CRC cells. Inversely, 5 μ M of 5-FU + 10 μ M Olaparib treatment significantly increased the percentage of HCT116 cells in the G2/M phase (44 % vs. 26 % untreated cells, $p = \text{xxxx}$). Strikingly, we detected a specific interference with G2/M progression following Olaparib treatment, as a significative population of both cell lines cells presented accumulated in this phase. While the mitotic arrest might be correlated with the marked increase observed in DNA damage in HT29 as shown by the prevalence of distinct comet tails (Figure 5B), we did not observe it HCT116 cells. Thus, if G2/M arrest in HT29 is associated to activation of DNA damage response in response to Olaparib, in HCT116 it might have occurred for another reason, such as polyploidy induction.

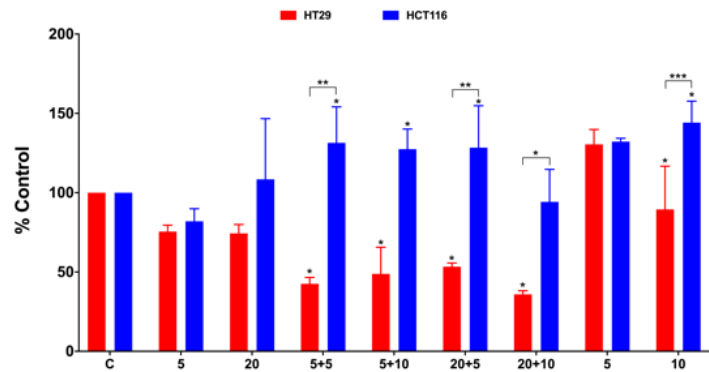
The cellular responses to mitotic delay are widely variable and appear to depend on an intriguing molecular competition between pathways leading to either apoptosis or slippage.

Polyploid tumor cells are created by cytotoxic and targeted therapies, and elevated ploidy is likely to significantly increase during therapy. These cells are supposed to play an integral role in disease recurrence and the acquisition of a therapy-resistant, increasingly malignant disease in patients during therapy (67). However, since PARPis have been implicated in accumulation of polyploidy cells and in accordance to the hypothesis that polyploidy can result from mitotic defects, it may points out to a mechanism by which PARPis induce cell death (68).

A



C



B

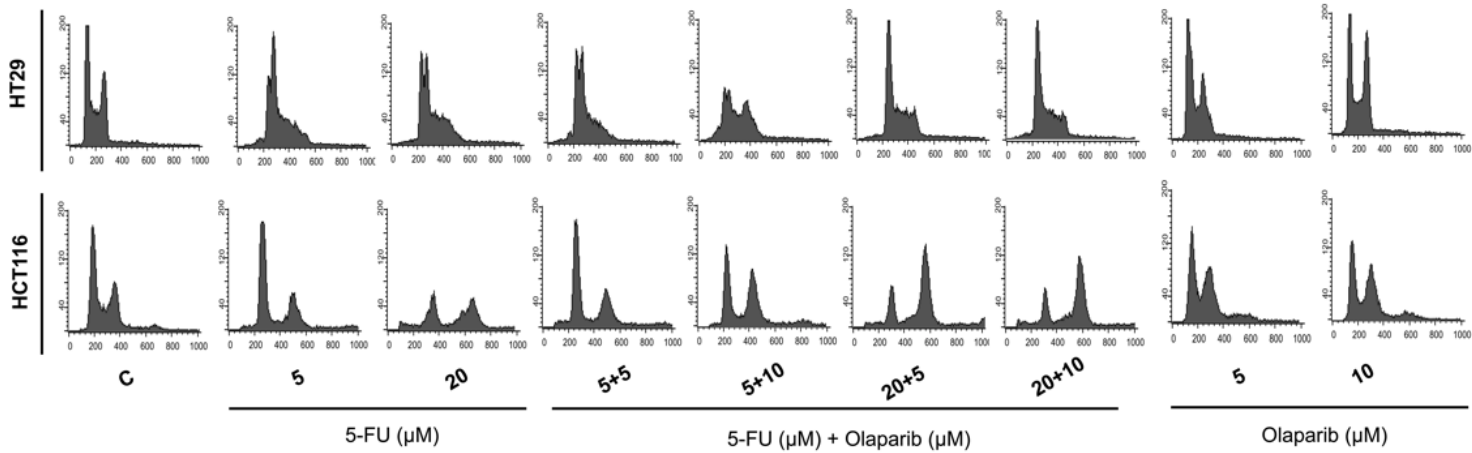


Figure 6. Cell cycle analysis. (A) Quantification of cell cycle profile analyzed by flow cytometry in HT29 and HCT116 cell lines after 48 h treatment with 5-FU and/or Olaparib (n=2). (B) Representative histograms of cell cycle profile in HT29 and HCT116 cell lines after 48 h treatment with 5-FU and/or Olaparib. (C) Polyploidy (>4n) population accumulation following 48 h treatment with 5-FU and/or Olaparib. Untreated cells were used as negative control (c). Two-way ANOVA and Tukey's pos hoc. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. the same concentration of 5-FU alone.

Interestingly, we observed two completely different responses with regard to the number of polyploidy/multinucleated cells after combination of olaparib and 5-FU or olaparib alone after 48 h (Figure 6C). While both treatments increased the population of HCT116 cells with DNA content above 4n, we found HT29 polyploidy population reduced. It was recently reported that a low ploidy score is associated with improved response to treatment in metastatic patients with CRC (69). Nevertheless, the role of tumor cells with significantly elevated genomic content is far from being elucidated.

By acting on replicating cells, olaparib entraps PARP1 and obstructs replication fork progression, resulting in loss of sister chromatid cohesion in G2 cells, which was reported to be independent on the levels of DNA damage induction (70). Additionally, MLH1 is known to be involved in DNA damage-induced checkpoint, favoring G2/M arrest through Chk1 phosphorylation (71). So, as we did not observe increase in apoptosis following Olaparib treatment in HCT116 cells, we suggest that the proficiency of MMR favored the induction of G2/M arrest over apoptosis.

Olaparib monotherapy impairs adhesion and migration capacities in MMR-proficient colon cancer cells

Cell attachment is necessary for adherent cells to survive, proliferate and establish metastatic niches. For the best of our knowledge,

this is the first study to explore the effects of 5-FU and Olaparib combination with regard to CRC cells adhesion and migration abilities. Thus, we treated both cells for 48 h and investigated adhesion capacity after 2, 4, 6, 12 and 24 hours (Figure 7A). Concerning HT29 cells, we observed two patterns, according to the reduction of cells attached after 24 h in comparison to controls: (1) intermediate (adhesion capacity was reduced to 50 %): Olaparib treated cells; and (2) low (adhesion capacity was reduced to 30 %): cells treated with 5 μ M 5-FU alone or in combination with olaparib (Figure 7A).

Despite cell viability and DNA damage induction were not altered by combination of Olaparib and 5-FU (vs. 5-FU alone) in MMR proficient cells, it decreased adhesion capacity of these cells. Unexpectedly, we observed that Olaparib monotherapy reduced adhesion capacity of HT29 cells, but no effect was exerted in HCT116 cells (Figure 7B). In fact, these observations led us to investigate the metastatic potential of these cells by transwell assay (Figures 7C and 7D). While 5 μ M did not affected HT29 cells migratory capacity, Olaparib addition to 5-FU resulted in a reduction of 30% in the number of migrated cells.

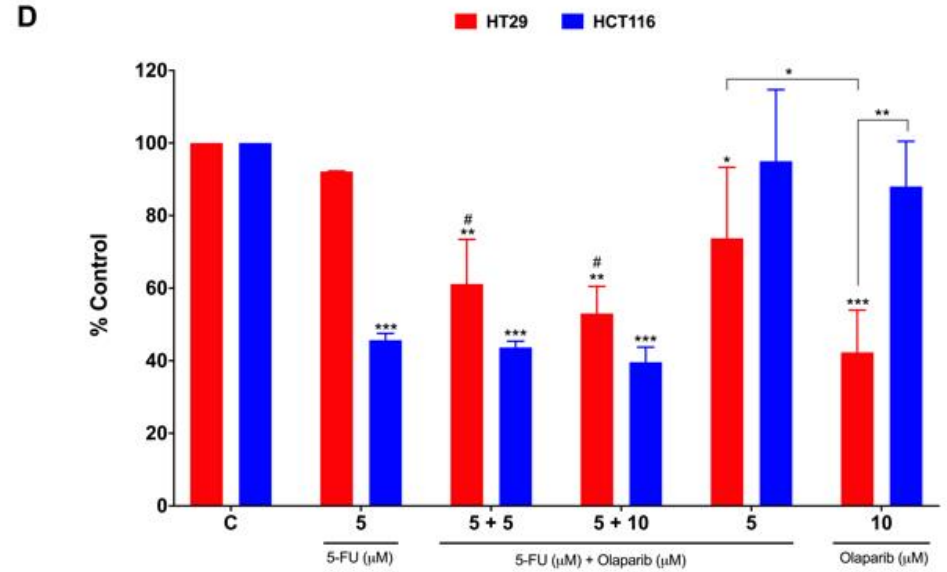
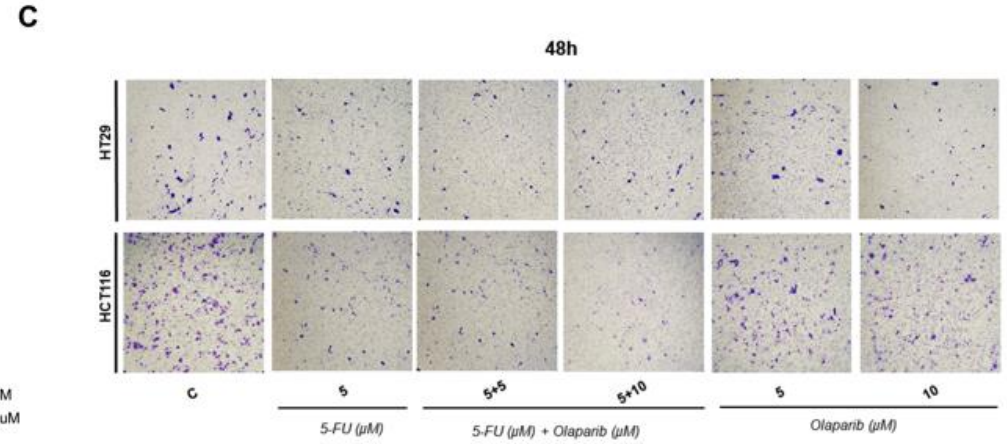
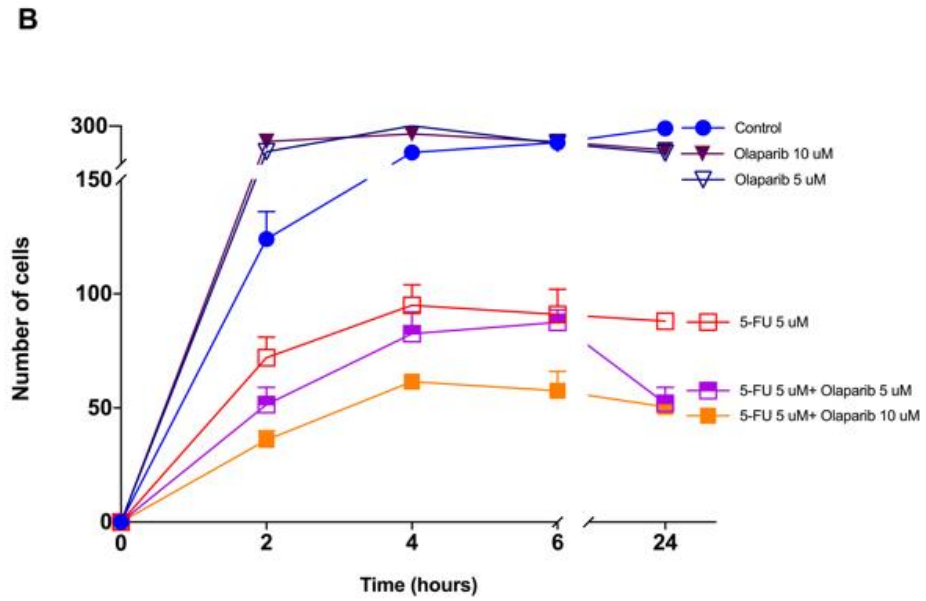
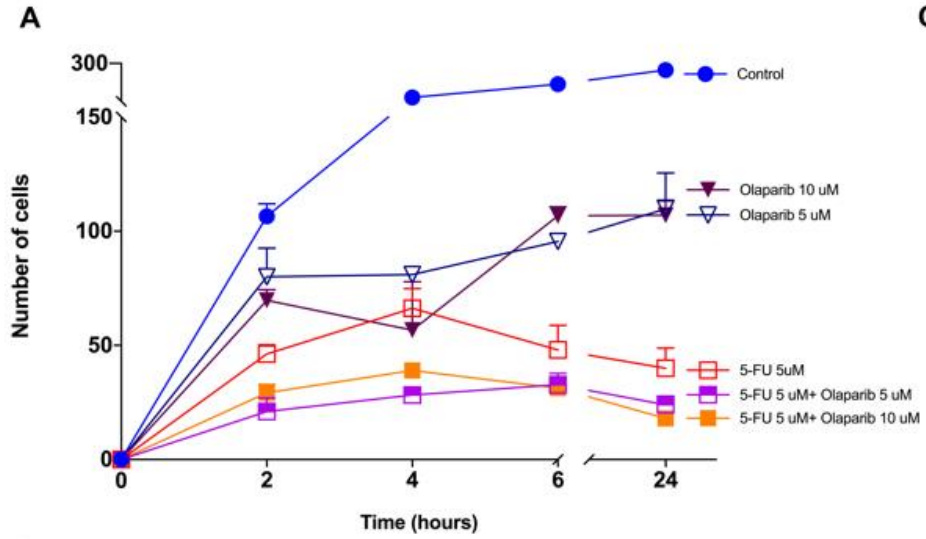


Figure 7. Adhesion measurements and migration assay. (A) Quantification of adherence capacity (number of attached cells) for HT29 cell line after 48 h treatment with 5-FU and/or Olaparib (n=3). (B) Quantification of adherence capacity (number of attached cells) for HCT116 cell line after 48h treatment with 5-FU and/or Olaparib (n=3). (C) Representative images of migration capacity assay for HT29 and HCT116 cell lines after 48hs treatment with 5FU and/or Olaparib (n=3). (D) Quantification of migrated cells for HT29 and HCT116 cell lines after 48hs treatment with 5FU and/or Olaparib. Untreated cells were used as negative control (c) *p<0.05, **p<0.01 and *p<0.001 vs. untreated control; #p<0.05 vs. 5-FU in monotherapy in the same concentration.**

Cancer cells can also undergo epithelial to mesenchymal transition (EMT), incorporating an invasive cell phenotype that can drive metastasis and enter a drug refractory state due to epigenetic reprogramming. One of the mechanisms related to EMT facilitation is polyploidy, as giant polyploid tumor cells gain a mesenchymal phenotype (72). In accordance to this concept, we observed the reduction of adhesion and migration capacities of HT29 cells at the same time it prevents the accumulation of the polyploid population following Olaparib treatment. Contrariwise, polyploidy HCT116 population was remarkably enriched after combination treatment with 5-FU and Olaparib, but without changes in metastatic potential. Thus, if a possible MMR-associated ploidy in response to treatment exists, it remains to be clarified in further investigations.

These observations are particularly relevant regarding a potential new role to Olaparib monotherapy in MMR proficient colorectal tumors. Despite we observed a reduction in cell viability and clonogenic survival following Olaparib treatment irrespective to MSI status (Figures 1 and 3), it may be a consequence of the impairment of cell adhesion rather than toxicity induction. Hence, if Olaparib and 5-FU combination has cytotoxic and anti-migratory effects specifically to MSI CRC, Olaparib monotherapy may emerge as a maintenance therapy for unresectable and metastatic MSS CRC.

Conclusions

Here, we provide a rational for the inclusion of the PARP inhibitor Olaparib in two new therapeutic approaches for CRC: (1) in combination with 5-FU for MSI CRC and (2) as monotherapy for MSS CRC. Our results showed that 5-FU cytotoxicity enhancement by Olaparib in colorectal cancer cells is dependent on MMR proficiency. We showed that HCT116 cells, which are MMR deficient due to loss of *hMLH1* and *hMSH3*, are more sensitive to 5-FU and Olaparib combination than MMR proficient CRC cells. This is particularly relevant since MMR-deficient cells are more resistant to 5-FU, and Olaparib addition resulted in 5-FU dose reduction. We identified synergistic effects of 5-FU and Olaparib in MMR deficient CRC as it impairs several tumor features of aggressiveness, such as adhesion and migration capacities and ability to form colonies. Additionally, our results suggest that these effects are mediated by induction of DNA strand breaks and apoptosis induction over G2/M cell cycle arrest. For the first time, we observed DNA damage induction, impairment of adhesion and migration capacities and cell cycle disturbances following Olaparib treatment only in MMR proficient cells. Therefore, the combined Olaparib and 5-FU treatment could benefit patients with non-metastatic MSI colorectal tumors, while Olaparib monotherapy may have a role as a maintenance therapy for advanced MSS CRC.

Funding

This research was supported by FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil– Grant N°. 17/2551-0001 459-6), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brazil – Grant N°. 423039/2016-4), and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brazil). HC Gloria received a fellowship from CAPES.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
2. Hari DM, Leung AM, Lee JH, Sim MS, Vuong B, Chiu CG, et al. AJCC cancer staging manual 7th edition criteria for colon cancer: Do the complex modifications improve prognostic assessment? *J Am Coll Surg.* 2013;217(2):181–90.
3. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1386–422.
4. Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer: A review. *Ther Adv Med Oncol.* 2016;8(1):57–84.
5. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350–6.
6. Punt CJA, Koopman M, Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(4):235–46.
7. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6(1):479–507.
8. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3219–26.
9. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(11):863–75.
10. André T, De Gramont A, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, 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. *J Clin Oncol*. 2015;33(35):4176–87.
11. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, Tanaka N, Remillard MY, Yothers G, et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: An assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res*. 2012;18(23):6531–41.
 12. Le DT, URAM JNJ, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509–20.
 13. Iwaizumi M, Tseng-rogenski S, Carethers JM. DNA mismatch repair proficiency executing 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells. 2011;12(8):756–64.
 14. Wyatt MD, Wilson III DM. Participation of DNA repair in response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(5):788–99.
 15. Kunz C, Focke F, Saito Y, Schuermann D, Lettieri T, Selfridge J, et al. Base Excision by Thymine DNA Glycosylase Mediates DNA-Directed Cytotoxicity of 5-Fluorouracil. 2009;7(4).
 16. Sengupta T, Torgersen ML, Kassahun H, Vellai T, Simonsen A, Nilsen H. Base excision repair AP endonucleases and mismatch repair act together to induce checkpoint-mediated autophagy. *Nat Commun*. 2013;4(May).
 17. Sjolund A, Nemeč AA, Paquet N, Prakash A, Sung P, Doublé S, et al. A Germline Polymorphism of Thymine DNA Glycosylase Induces Genomic Instability and Cellular Transformation. *PLoS Genet*. 2014;10(11).
 18. Srinivas US, Dyczkowski J, Beißbarth T, Gaedcke J. 5-Fluorouracil sensitizes colorectal tumor cells towards double stranded DNA breaks by interfering with homologous recombination repair. *Oncotarget*. 2015;6(14).
 19. Polo LM, Xu Y, Hornyak P, Garces F, Zeng Z, Hailstone R, et al. Efficient Single-Strand Break Repair Requires Binding to Both Poly(ADP-Ribose) and DNA by the Central BRCT Domain of XRCC1. *Cell Rep*. 2019;26(3):573-581.e5.
 20. Patel AG, Sarkaria JN, Kaufmann SH. Nonhomologous end joining

- drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(8):3406–11.
21. Sugimura K, Takebayashi SI, Taguchi H, Takeda S, Okumura K. PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J Cell Biol*. 2008;183(7):1203–12.
 22. Maya-Mendoza A, Moudry P, Merchut-Maya JM, Lee M, Strauss R, Bartek J. High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability. *Nature*. 2018;559(7713):279–84.
 23. Szigyarto CA, Johansson F, Uhle M, Stro CE, Erixon K, Helleday T. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. 2011;39(8):3166–75.
 24. Venkitaraman AR. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science* (80-). 2014;343(6178):1470–5.
 25. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(6):523–33.
 26. Franzese E, Centonze S, Diana A, Carlino F, Guerrera LP, Di Napoli M, et al. PARP inhibitors in ovarian cancer. *Cancer Treat Rev*. 2019;73(October 2018):1–9.
 27. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(15):1382–92.
 28. Chaudhuri AR, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Publ Gr*. 2017;
 29. Lord CJ, Ashworth A. PARP Inhibitors: The First Synthetic Lethal Targeted Therapy. *Science*. 2017;355(6330):1152.
 30. Murai J, Pommier Y. PARP Trapping Beyond Homologous Recombination and Platinum Sensitivity in Cancers. *Annu Rev Cancer Biol*. 2019;3(1):131–50.
 31. Leichman L, Groshen S, ONeil BH, Messersmith W, Berlin J, Chan E,

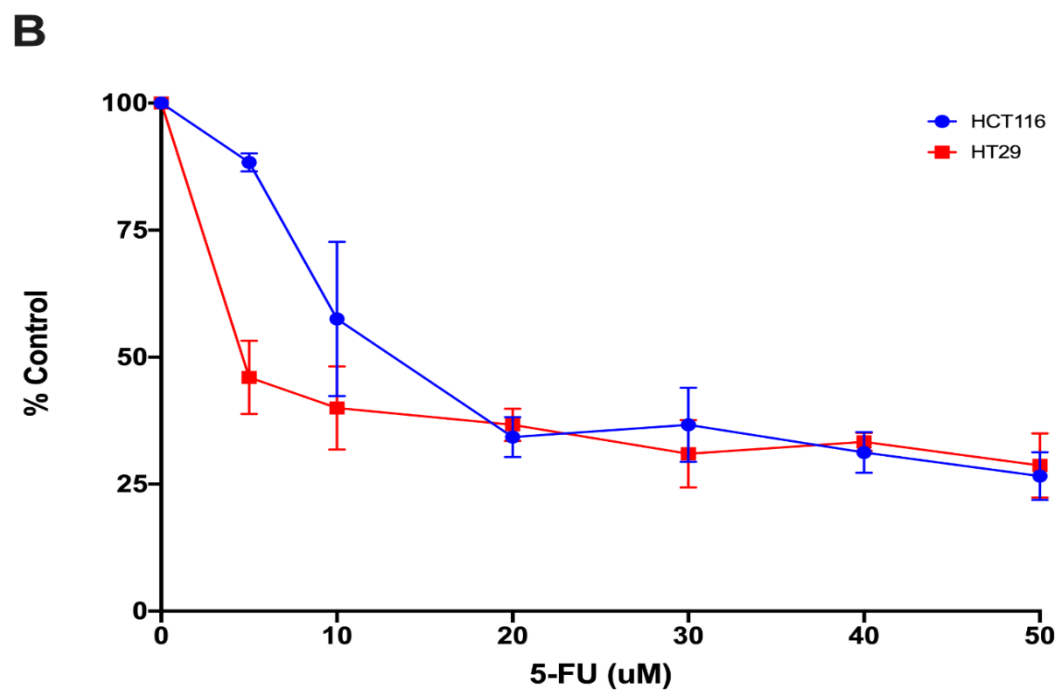
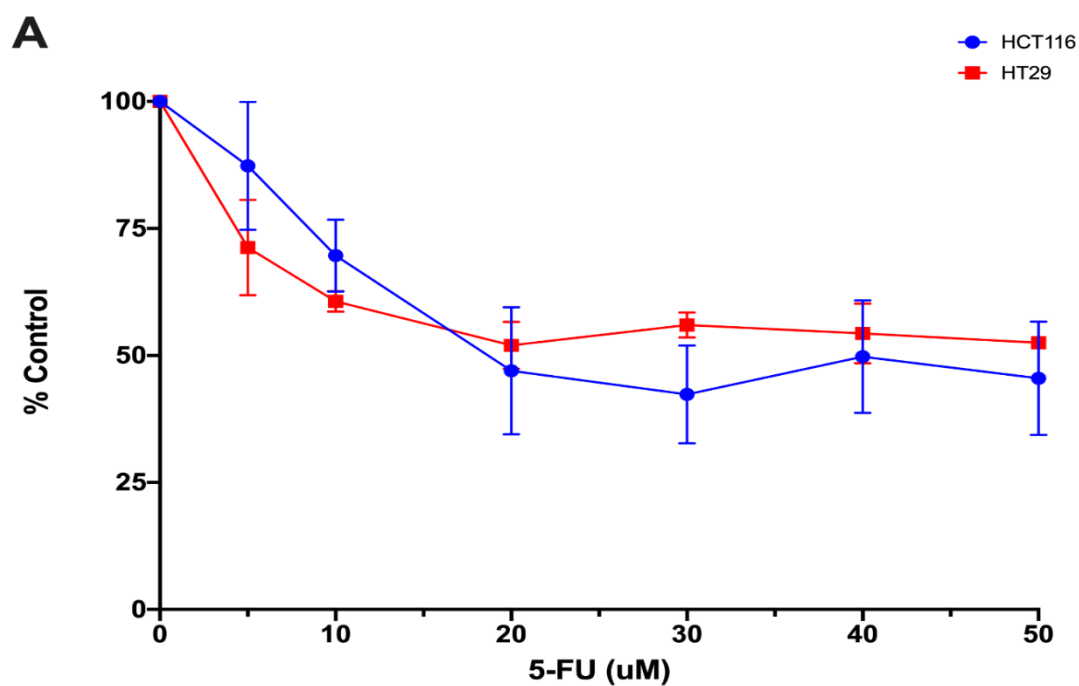
- et al. Phase II Study of Olaparib (AZD-2281) After Standard Systemic Therapies for Disseminated Colorectal Cancer. *Oncologist*. 2016;21(2):172–7.
32. Gaymes TJ, Mohamedali AM, Patterson M, Matto N, Smith A, Kulasekararaj A, et al. Microsatellite instability induced mutations in DNA repair genes CtIP and MRE11 confer hypersensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in myeloid malignancies. *Haematologica*. 2013;98(9):1397–406.
 33. Takahashi M, Koi M, Balaguer F, Boland CR, Goel A. MSH3 mediates sensitization of colorectal cancer cells to cisplatin, oxaliplatin, and a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *J Biol Chem*. 2011;286(14):12157–65.
 34. McPherson LA, Shen Y, Ford JM. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor LT-626: Sensitivity correlates with MRE11 mutations and synergizes with platinum and irinotecan in colorectal cancer cells. *Cancer Lett*. 2014;343(2):217–23.
 35. Wang C, Jette N, Moussienko D, Bebb DG, Lees-Miller SP. ATM-Deficient Colorectal Cancer Cells Are Sensitive to the PARP Inhibitor Olaparib. *Transl Oncol*. 2017;10(2):190–6.
 36. Abu-Sanad A, Wang Y, Hasheminasab F, Panasci J, Noë A, Rosca L, et al. Simultaneous inhibition of ATR and PARP sensitizes colon cancer cell lines to irinotecan. *Front Pharmacol*. 2015;6(JUL).
 37. Li LS, Morales JC, Veigl M, Sedwick D, Greer S, Meyers M, et al. REVIEW DNA mismatch repair (MMR) -dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new Abbreviations : 2009;679–92.
 38. Shelton JW, Waxweiler T V., Landry J, Gao H, Xu Y, Wang L, et al. In vitro and in vivo enhancement of chemoradiation using the oral parp inhibitor ABT-888 in colorectal cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013;86(3):469–76.
 39. Geng L, Huehls AM, Wagner JM, Huntoon CJ, Karnitz LM. Checkpoint signaling, base excision repair, and PARP promote survival of colon cancer cells treated with 5-fluorodeoxyuridine but not 5-fluorouracil. *PLoS One*. 2011;6(12).
 40. Mini E, Landini I, Lucarini L, Lapucci A, Napoli C, Perrone G, et al.

- The Inhibitory Effects of HYDAMTIQ, a Novel PARP Inhibitor, on Growth in Human Tumor Cell Lines With Defective DNA Damage Response Pathways. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther.* 2017;25(9):1441–51.
41. Haugen AC, Oshimura M, Shibuya K, Zhong X, Yamada K, Koi M, et al. Genetic Instability Caused by Loss of MutS Homologue 3 in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 2008;68(20):8465–72.
 42. Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, Johannessen B, Bruun J, Danielsen SA, et al. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. 2017;1–16.
 43. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.* 2010;70(2):440–6.
 44. Fouquier J, Guedj M. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect.* 2015;3(3).
 45. Münz F, Lopez Perez R, Trinh T, Sisombath S, Weber KJ, Wuchter P, et al. Human mesenchymal stem cells lose their functional properties after paclitaxel treatment. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–11.
 46. Kalyan A, Kircher S, Shah H, Mulcahy M, Benson A. Updates on immunotherapy for colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2018;9(1):160–9.
 47. Matulonis UA, Monk BJ. PARP inhibitor and chemotherapy combination trials for the treatment of advanced malignancies: does a development pathway forward exist? *Ann Oncol.* 2017;28(3):443–7.
 48. Gupta D, Heinen CD. The mismatch repair-dependent DNA damage response: Mechanisms and implications. *DNA Repair (Amst).* 2019;78(March):60–9.
 49. Slade D. Mitotic functions of poly(ADP-ribose) polymerases. *Biochem Pharmacol.* 2019;167(February):33–43.
 50. Wang Y, Qin J. MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(26):15387–92.
 51. De Zio D, Cianfanelli V, Cecconi F. New insights into the link between DNA damage and apoptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(6):559–71.

52. Fischer F, Baerenfaller K, Jiricny J. 5-Fluorouracil Is Efficiently Removed From DNA by the Base Excision and Mismatch Repair Systems. *Gastroenterology*. 2007;133(6):1858–68.
53. Meyers M, Wagner MW, Mazurek A, Schmutte C, Fishel R, Boothman DA. DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage. *J Biol Chem*. 2005;280(7):5516–26.
54. Hassen S, Ali AA, Kilaparty SP, Al-Anbaky QA, Majeed W, Boman BM, et al. Interdependence of DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 in apoptosis in human colorectal carcinoma cell lines. *Mol Cell Biochem*. 2016;412(1–2):297–305.
55. Carethers JM. Microsatellite Instability Pathway and EMAST in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2017;13(1):73–80.
56. Park JM, Huang S, Tougeron D, Sinicrope FA. MSH3 Mismatch Repair Protein Regulates Sensitivity to Cytotoxic Drugs and a Histone Deacetylase Inhibitor in Human Colon Carcinoma Cells. *PLoS One*. 2013;8(5).
57. Murai J, Huang SYN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res*. 2012;72(21):5588–99.
58. Liao H, Ji F, Helleday T, Ying S. Mechanisms for stalled replication fork stabilization: new targets for synthetic lethality strategies in cancer treatments. *EMBO Rep*. 2018;19(9):1–18.
59. Liu C, Vyas A, Kassab MA, Singh AK, Yu X. The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(14):8129–41.
60. Kubota E, Williamson CT, Ye R, Elegbede A, Peterson L, Lees-Miller SP, et al. Low ATM protein expression and depletion of p53 correlates with olaparib sensitivity in gastric cancer cell lines. *Cell Cycle*. 2014;13(13):2129–37.
61. D'Andrea AD. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance. *DNA Repair (Amst)*. 2018;71(xxxx):172–6.
62. Fisher AEO, Hochegger H, Takeda S, Caldecott KW. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Accelerates Single-Strand Break Repair in Concert with Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. *Mol Cell Biol*.

- 2007;27(15):5597–605.
63. Campregher C, Schmid G, Ferik F, Knasmüller S, Khare V, Kortüm B, et al. MSH3-Deficiency Initiates EMT without Oncogenic Transformation of Human Colon Epithelial Cells. *PLoS One*. 2012;7(11).
 64. Williams SMG, Kuznicki AM, Andrade P, Dolinski BM, Elbi C, Hagan RCO, et al. Treatment with the PARP inhibitor , niraparib , sensitizes colorectal cancer cell lines to irinotecan regardless of MSI / MSS status. 2015;1–11.
 65. Marshall CH, Sokolova AO, McNatty AL, Cheng HH, Eisenberger MA, Bryce AH, et al. Differential Response to Olaparib Treatment Among Men with Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer Harboring BRCA1 or BRCA2 Versus ATM Mutations. *Eur Urol*. 2019;76(4):452–8.
 66. Francipane MG, Lagasse E. A study of cancer heterogeneity: from genetic instability to epigenetic diversity in colorectal cancer. *Cancer Target Drug Deliv An Elus Dream*. 2013;363–88.
 67. Coward J, Harding A. Size does matter: Why polyploid tumor cells are critical drug targets in the war on cancer. *Front Oncol*. 2014;4 MAY(May):1–16.
 68. Passaro C, Volpe M, Botta G, Scamardella E, Perruolo G, Gillespie D, et al. PARP inhibitor olaparib increases the oncolytic activity of dl922-947 in invitro and invivo model of anaplastic thyroid carcinoma. *Mol Oncol*. 2015;9(1):78–92.
 69. Polyzos KA, Karadima ML, Kosma AC, Lazaris A, Kavantzias N, Tsavaris N. Clinical influence of ploidy and cancer stem cells and other parameters in stage IV colorectal cancer. *In Vivo (Brooklyn)*. 2019;33(1):245–9.
 70. Kukulj E, Kaufmann T, Dick AE, Zeillinger R, Gerlich DW, Slade D. PARP inhibition causes premature loss of cohesion in cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(61):103931–51.
 71. Tentori L, Muzi A, Susanna A, Susanna D, Graziani G. MSH3 expression does not influence the sensitivity of colon cancer HCT116 cell line to oxaliplatin and poly (ADP-ribose) polymerase (

- PARP) inhibitor as monotherapy or in combination. 2013;117–25.**
- 72. Zhang S, Mercado-Uribe I, Hanash S, Liu J. ITRAQ-based proteomic analysis of polyploid giant cancer cells and budding progeny cells reveals several distinct pathways for ovarian cancer development. PLoS One. 2013;8(11):1–16.**



Supplementary figure 1: Viability curves for HCT116 and HT29 cell lines treated with 5-FU for 48 h and 72 h, respectively.

Table 1: Combination index and dose reduction index for 5-FU and Olaparib combinations in CRC cell lines.

| HCT116 | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------------------------------|--|---------------------|-------------------------|--------------|-----------------|--------------------------------------|--|----------------------|-------------------------|--------------|
| 48 hours | | | | | | 72 hours | | | | | |
| Fa | 5-FU (μM) | Olaparib (μM) | DRI 5-FU | DRI Olaparib | CI | Fa | 5-FU (μM) | Olaparib (μM) | DRI 5- FU | DRI Olaparib | CI |
| 0.27 | 16.63 | 12.27 | 3.32 | 2.45 | 0.707 | 0.48 | 17.17 | 30.54 | 3.43 | 6.10 | 0.486 |
| 0.31 | 19.42 | 16.41 | 3.88 | 1.64 | 0.866 | 0.47 | 16.82 | 29.51 | 3.36 | 2.95 | 0.803 |
| 0.55 | 58.57 | 129.73 | 2.92 | 25.94 | 0.380 | 0.74 | 30.47 | 79.96 | 1.52 | 1.59 | 0.490 |
| 0.43 | 35.23 | 50.08 | 1.76 | 5.00 | 0.760 | 0.71 | 28.22 | 70.31 | 1.41 | 7.03 | 0.967 |
| HT29 | | | | | | | | | | | |
| 48 hours | | | | | | 72 hours | | | | | |
| Fa | 5-FU (μM) | Olaparib (μM) | DRI 5-FU | DRI Olaparib | CI | Fa | 5-FU (μM) | Olaparib (μM) | DRI 5- FU | DRI Olaparib | CI |
| 0.48 | 33.92 | 14.74 | 6.78 | 2.94 | 0.454 | 0.65 | 24.50 | 19.75 | 4.90 | 3.95 | 0.457 |
| 0.49 | 36.67 | 14.99 | 7.33 | 1.49 | 0.636 | 0.66 | 26.25 | 20.13 | 5.25 | 2.01 | 0.687 |
| 0.61 | 91.88 | 18.35 | 4.59 | 3.67 | 0.718 | 0.69 | 32.49 | 21.34 | 1.62 | 4.26 | 0.849 |
| 0.55 | 56.82 | 16.51 | 2.84 | 1.65 | 0.854 | 0.71 | 37.70 | 22.23 | 1.88 | 2.22 | 0.989 |

Fa: Fraction affected; DRI: Dose Reduction Index; CI: Combination Index.

4 CONCLUSÕES

Aqui propusemos um racional para a inclusão do inibidor de PARP Olaparib em duas novas abordagens terapêuticas para o CCR: (1) em combinação com 5-FU para pacientes com MSI e (2) em monoterapia para pacientes de CCR com MSS. Nossos resultados demonstram um aumento da citotoxicidade de 5-FU em combinação com Olaparib em células de CCR de maneira dependente de MMR proficiente. Demonstramos que células HCT116, que são deficientes em MMR devido a perda de MLH1 e MSH3, são mais sensíveis a combinação 5-FU e Olaparib do que as células HT29, que são proficientes em MMR. Este resultado é particularmente relevante uma vez que células com deficiente em MMR são mais resistentes ao 5-FU, e a adição de Olaparib resultou em redução da dose necessária de 5-FU. Identificamos efeito sinérgico entre 5-FU e Olaparib em células de CCR deficientes em MMR, além da diminuição de fatores de agressividade tumoral como capacidades de adesão e migração e habilidade de formação de colônias. Além disso, nossos resultados sugerem que estes efeitos são mediados pela indução de quebras simples no DNA e apoptose através da parada de ciclo celular em G2/M. Pela primeira vez, observamos a indução de danos no DNA e a diminuição das capacidades de adesão e migração, além das alterações no ciclo celular após o tratamento com Olaparib apenas em células proficientes em MMR. Portanto, o tratamento combinado de Olaparib e 5FU poderia beneficiar pacientes com CCR não-metastático e MSI, enquanto a monoterapia de Olaparib pode ter um papel na terapia de manutenção de casos de CCR avançados com MSS.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMASOVA, E. E.; LAVRIK, O. I. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic acids research*, v. 47, n. 8, p. 3811–3827, 2019.

ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*, v. 9, p. 1–20, 2015.

ASHWORTH, A.; LORD, C. J. Synthetic lethal therapies for cancer : what ' s next after PARP inhibitors ? *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 15, n. September, 2018.

BEARD, W. A. et al. Eukaryotic Base Excision Repair: New Approaches Shine Light on Mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, v. 88, n. 1, p. 137–162, 2019.

BELOV, L.; ZHOU, J.; CHRISTOPHERSON, R. I. Cell surface markers in colorectal cancer prognosis. [s.l: s.n.]. v. 12

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde, Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), 2019

BRIERLEY, D. J.; MARTIN, S. A. Oxidative stress and the DNA mismatch repair pathway. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 18, n. 18, p. 2420–2428, 2013.

CARETHERS, J. M. Microsatellite Instability Pathway and EMAST in Colorectal Cancer. *Current Colorectal Cancer Reports*, v. 13, n. 1, p. 73–80, 2017.

CASSIDY, J. et al. Efficacy of capecitabine versus 5-fluorouracil in colorectal and gastric cancers: A meta-analysis of individual data from 6171 patients. *Annals of Oncology*, v. 22, n. 12, p. 2604–2609, 2011.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 58, n. 5, p. 235–263, 2017.

COLEMAN, R. L. et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, v.

390, n. 10106, p. 1949–1961, 2017.

COMELLA, P.; SANDOMENICO, C. Role of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. p. 229–238, 2009.

CULY, C. R. et al. A Review of its Pharmacological Properties and Clinical Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer and its Potential in Other Malignancies. v. 60, n. 4, p. 895–924, 2000.

DA SILVA, F. C. et al. Update on hereditary colorectal cancer. *Anticancer Research*, v. 36, n. 9, p. 4399–4406, 2016.

DAS, B. B. et al. PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. 7, p. 4435–4449, 2014.

DAVIDSON, D. et al. The PARP inhibitor ABT-888 synergizes irinotecan treatment of colon cancer cell lines. *Investigational New Drugs*, v. 31, n. 2, p. 461–468, 2013.

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

DUDLEY, J. C. et al. Microsatellite instability as a biomarker for PD-1 blockade. *Clinical Cancer Research*, v. 22, n. 4, p. 813–820, 2016.

FEARON, E. F.; VOGELSTEIN, B. for Colorectal Tumorigenesis. v. 61, p. 759–767, 1989.

FUCHS, C.; MITCHELL, E. P.; HOFF, P. M. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews*, v. 32, n. 7, p. 491–503, 2006.

GENG, L. et al. Checkpoint signaling, base excision repair, and PARP promote survival of colon cancer cells treated with 5-fluorodeoxyuridine but not 5-fluorouracil. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, 2011.

GILL, S. et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: Who benefits and by how much? *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 10, p. 1797–1806, 2004.

HANSEN, R. D. et al. Effects of smoking and antioxidant micronutrients on risk of colorectal cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 11, n. 4, p. 406- 415.e3, 2013.

HEWISH, M. et al. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nature reviews. Clinical oncology*, v. 7, n. 4, p.

197–208, 2010.

HOPIRTEAN, C.; NAGY, V. OPTIMIZING THE USE OF ANTI VEGF TARGETED THERAPIES IN PATIENTS WITH METASTATIC COLORECTAL CANCER : REVIEW OF LITERATURE. v. 91, n. 1, p. 12–17, 2018.

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

IWAIZUMI, M.; TSENG-ROGENSKI, S.; CARETHERS, J. M. DNA mismatch repair proficiency executing 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells. v. 12, n. 8, p. 756–764, 2011.

KANG, S. et al. The significance of microsatellite instability in colorectal cancer after controlling for clinicopathological factors. *Medicine (United States)*, v. 97, n. 9, p. 1–6, 2018.

KEUM, N.; GIOVANNUCCI, E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2019.

KLOOR, M.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. The immune biology of microsatellite-unstable cancer. *Trends in Cancer*, v. 2, n. 3, p. 121–133, 2016.

KNIJNENBURG, T. A. et al. Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. *Cell Reports*, v. 23, n. 1, p. 239- 254.e6, 2018.

KONSTANTINOPOULOS, P. A. et al. Homologous recombination deficiency: Exploiting the fundamental vulnerability of ovarian cancer. *Cancer Discovery*, v. 5, n. 11, p. 1137–1154, 2015.

KUIPERS, E. J. et al. Colorectal cancer. *Nature Publishing Group*, v. 1, p. 1–25, 2015.

LE, D. T. et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 26, p. 2509–2520, 2015.

LE, D. T. et al. A Blueprint to Advance Colorectal Cancer Immunotherapies. v. 5, n. November, p. 942–950, 2017.

LEUNG, A. K. L. PARPs. *Current Biology*, v. 27, n. 23, p. R1256–R1258, 2017.

LIU, D.; KEIJZERS, G.; RASMUSSEN, L. J. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutation Research-Reviews in Mutation*

Research, 2017.

LONGLEY, D.; HARKIN, D.; JOHNSTON, P. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature reviews. Cancer*, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.

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

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. PARP Inhibitors: The First Synthetic Lethal Targeted Therapy. *Science (New York, N.Y.)*, v. 355, n. 6330, p. 1152, 2017.

LYNCH, H. T.; DE LA CHAPELLE, A. Hereditary Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 10, p. 919–932, 2003.

MATEO, J. et al. A decade of clinical development of PARP inhibitors in perspective. *Annals of Oncology*, v. 30, n. 9, p. 1437–1447, 2019.

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

MÜLLER, M. F.; IBRAHIM, A. E. K. K.; ARENDS, M. J. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, v. 469, n. 2, p. 125–134, 2016.

MURAI, J. Targeting DNA repair and replication stress in the treatment of ovarian cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 4, p. 619–628, 2017.

MURAI, J.; POMMIER, Y. PARP Trapping Beyond Homologous Recombination and Platinum Sensitivity in Cancers. *Annual Review of Cancer Biology*, v. 3, n. 1, p. 131–150, 2019.

NCCN - Colon Cancer. Colon Cancer. NCCN Guidel [Internet]. 2018;1–832. Available from: www.nccn.org

NGUYEN, H. T.; DUONG, H. Q. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (review). *Oncology Letters*, v. 16, n. 1, p. 9–18, 2018.

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

O'NEIL, N. J.; BAILEY, M. L.; HIETER, P. Synthetic lethality and cancer. *Nature Reviews Genetics*, v. 18, n. 10, p. 613–623, 2017.

PATHAK, S. et al. Review on comparative efficacy of bevacizumab , panitumumab and cetuximab antibody therapy with combination of FOLFOX-4 in KRAS -mutated colorectal cancer patients. v. 9, n. 7, p. 7739–7748, 2018.

PISHVAIAN, M. J. et al. A Phase 2 Study of the PARP Inhibitor Veliparib Plus Temozolomide in Patients With Heavily Pretreated Metastatic Colorectal Cancer. p. 1–10, 2018.

POMMIER, Y.; CONNOR, M. J. O.; BONO, J. DE. Laying a trap to kill cancer cells_PARP inhibitors and their mechanisms of action Mark OConnor De J Bono 2016.pdf. Science Translational Medicine, v. 8, n. 362, p. 1–8, 2016.

POPAT, S.; HUBNER, R.; HOULSTON, R. S. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. Journal of Clinical Oncology, v. 23, n. 3, p. 609–618, 2005.

PUNT, C. J. A.; KOOPMAN, M.; VERMEULEN, L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. Nature Reviews Clinical Oncology, v. 14, n. 4, p. 235–246, 2017.

RAGULAN, C. et al. Analytical Validation of Multiplex Biomarker Assay to Stratify Colorectal Cancer into Molecular Subtypes. Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

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, v. 349, n. 3, p. 247–257, 2003.

ROULEAU, M. et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond. Nature Publishing Group, v. 10, n. 4, p. 293–301, 2010.

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, v. 28, n. 20, p. 3219–3226, 2010.

SENGUPTA, T. et al. Base excision repair AP endonucleases and mismatch repair act together to induce checkpoint-mediated autophagy. Nature Communications, v. 4, n. May, 2013.

SHELTON, J. W. et al. In vitro and in vivo enhancement of chemoradiation using the oral parp inhibitor ABT-888 in colorectal cancer cells. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, v. 86, n. 3, p. 469–476, 2013.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018: Cancer Statistics, 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians, v. 68, n. 1, p. 7–30, 2018.

SVEEN, A. Biomarker-guided therapy for colorectal cancer: strength in complexity. Nature Reviews Clinical Oncology, [s.d.].

TAJIMA, A. et al. Both hMutS α and hMutS β DNA mismatch repair complexes participate in 5-fluorouracil cytotoxicity. PLoS ONE, v. 6, n. 12, p. 1–7, 2011.

TOURNIGAND, C. et al. FOLFIRI Followed by FOLFOX6 or the Reverse Sequence in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized GERCOR Study. v. 22, n. 2, p. 229–237, 2014.

TWELVES, C. et al. adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results from the X-ACT trial with analysis by age and preliminary evidence of a pharmacodynamic marker of efficacy. 2011.

VASQUES, A. L. R.; PERES, M. A. Tendência temporal da mortalidade por câncer de cólon e reto em Santa Catarina no período entre 1980 a 2006. Epidemiologia e Serviço de Saúde, v. 19, n. 2, p. 155–164, 2010.

WANG, J. et al. Role of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Therapy Compared with Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy for Metastatic Colorectal Cancer: an Update Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. 2018.

WYATT, M. D.; WILSON III, D. M. Participation of DNA repair in response to 5-fluorouracil. Cell Molecular Life Sciences, v. 66, n. 5, p. 788–799, 2009.

YAP, T. A. et al. The DNA Damaging Revolution: PARP Inhibitors and Beyond. American Society of Clinical Oncology Educational Book, n. 39, p. 185–195, 2019.

ZIMMER, A. S. et al. Update on PARP Inhibitors in Breast Cancer. Current Treatment Options in Oncology, v. 19, n. 5, 2018.

6 ANEXOS

6.1 ANEXO LATTES

06/11/2019

Currículo Lattes



Imprimir currículo



Helena De Castro e Gloria

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0982623443193600>

Última atualização do currículo em 06/11/2019

Resumo informado pelo autor

Formada em Biomedicina pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, com habilitações em Análises Clínicas, Biologia Molecular e Circulação Extracorpórea. Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Biociências na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Atua nas seguintes linhas de pesquisa: sistemas de reparo do DNA, aspectos celulares e moleculares do câncer, biomarcadores preditivos e prognósticos do câncer.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Helena De Castro e Gloria

Dados pessoais

Nome em citações bibliográficas GLORIA, H. C.; GLORIA, Helena C.; GLORIA, HELENA DE CASTRO E GLÓRIA, H.; CASTRO E GLÓRIA, H.

Sexo Feminino

Cor ou Raça Branca

Filiação João Alberto Rabelo Gloria e Claudia Severo de Castro e Gloria

Nascimento 28/02/1990 - Porto Alegre/ - Brasil

Carteira de Identidade 4108274211 SJS - RS - 08/11/2006

CPF 019.293.740-54

Endereço residencial Rua Olavo Bilac - Porto Alegre 90040310, RS - Brasil
Telefone: 51 30226945
Celular: 51 99983383Endereço eletrônico E-mail para contato : helenadecastroegloria@gmail.com
E-mail alternativo nena_hcg@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2017 Mestrado em BIOCIÊNCIAS.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, BrasilOrientador: Jenifer Saft
Co-orientador: Natalia Motta Leguisamo Meirelles
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior2012 - 2017 Graduação em Biomedicina.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
Título: Avaliação da Expressão das polimerases translesão sobre o prognóstico de pacientes portadores de câncer colorretal esporádico
Orientador: Jenifer Saft2005 - 2007 Ensino Médio (2o grau)
Colégio Santa Rosa de Lima, SRL, Brasil, Ano de obtenção: 2007

Formação complementar

2015 - 2015 Curso de Medicina Legal. (Carga horária: 20h).
Instituto Politécnico de Ensino a Distância, IPED, Sao Paulo, Brasil2013 - 2013 Extensão universitária em Feiras de Saúde da UFCSPA. (Carga horária: 8h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil2012 - 2012 Extensão universitária em Aplicações Clínicas de Bioquímica - 4ª Edição. (Carga horária: 16h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional

1. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo institucional

2017 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestranda em Biociências, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

2017 - 2017 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva

2015 - 2016 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva

2014 - 2015 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva

2013 - 2014 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva

06/11/2019


Currículo Lattes

| | |
|---|--|
| | Outras informações: Pesquisa sobre Determinação do Perfil de Reparo do DNA em Pacientes portadores de câncer colorretal. |
| 2013 - 2013 | Vínculo: outro ; Enquadramento funcional: Aluna de Iniciação Científica Voluntária ; Carga horária: 20; Regime: Dedicção exclusiva Outras informações: Pesquisa sobre a Determinação do Perfil de Reparo do DNA em Pacientes portadores de câncer colorretal. |
| Projetos | |
| Projetos de pesquisa | |
| 2013 - Atual | Determinação do Perfil de Reparo do DNA em pacientes portadores de câncer colorretal |
| | Descrição: O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor em frequência e o segundo em mortalidade nos países desenvolvidos. No Brasil, o CCR está entre as seis neoplasias malignas mais encontradas e é a terceira em mortalidade. Dentre todos os casos de CCR, cerca de 85% são esporádicos. A avaliação prognóstica majoritariamente baseia-se em parâmetros clínico-patológicos e morfológicos, uma vez que o valor de marcadores moleculares para o prognóstico ainda precisa de melhor esclarecimento. Mutações em genes de reparo de malpareamento de DNA (MMR) estão associadas principalmente com CCR hereditário, em especial na Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipomatoso (HNPCC), porém, uma vez também presentes em alguns casos de CCR esporádico denota o envolvimento do sistema de reparo do DNA no desenvolvimento desta patologia. O sistema de reparo do DNA garante a estabilidade genômica, permitindo à célula a manutenção da sua informação genética. Alterações nestas vias estão classicamente envolvidas com a progressão do câncer. No entanto, como o sistema de reparo do DNA se comporta neste caso especial de tumorigênese, a se apresentam papel prognóstico, ainda não está esclarecido, o objetivo deste projeto é avaliar o perfil de expressão de genes e proteínas envolvidos nos processos de resposta a danos no DNA em amostras tumorais de carcinomas colorretais e explorar o seu valor preditivo e prognóstico no câncer colorretal. Situação: Em andamento; Natureza: Projetos de pesquisa Integrantes: Helena De Castro e Glória; Natalia Leguisamo Meirelles; Jenifer Saffi (Responsável); Gustavo Andrezza Laporte; Daniel de Barcellos Azambuja; KALIL, ANTONIO N. Número de produções: C.T & A: 6/ |
| Idiomas | |
| Inglês | Compreende Bem ; Fala Razoavelmente ; Escreve Razoavelmente ; Lê Bem |
| Espanhol | Compreende Razoavelmente ; Fala Razoavelmente ; Escreve Razoavelmente ; Lê Razoavelmente |
| Prêmios e títulos | |
| 2017 | Destaque da Sessão de Biologia Molecular na III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre |
| 2017 | Medalha de Bronze - 3º Lugar, 66º Congresso Brasileiro de Coloproctologia - Sociedade Brasileira de Coloproctologia |
| 2017 | Prêmio Angelita Gama, 66º Congresso Brasileiro de Coloproctologia - Sociedade Brasileira de Coloproctologia |
| 2016 | Destaque de Sessão de Biologia Molecular da II Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre |
| 2015 | Destaque da Sessão de Biologia Molecular da I Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre |
| 2014 | Destaque da Sessão de Biologia Molecular da III Semana Acadêmica da UFCSPA com o trabalho Determinação do Perfil de Reparo do DNA em pacientes portadores de câncer colorretal, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre |
| Produção | |
| Produção bibliográfica | |
| Artigos completos publicados em periódicos | |
| 1. |  LAPORTE, G.; LEGUISAMO, N.; KALIL, A.; CASTRO E GLÓRIA, H.; LUCHESE, A.; CADORE, E.; MONTENEGRO, G.; LAU, V.; SAFFI, J. Changes in DNA repair protein levels in colorectal cancer liver metastasis are associated with features of tumor aggressiveness. <i>EJSO</i> , 45 , v.45, p.e71 - , 2019. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.ejso.2018.10.260] |
| 2. |  LAPORTE, G.; LEGUISAMO, N.; CASTRO E GLÓRIA, H.; MONTENEGRO, G.; AZAMBUJA, D.; ESCOVAR, C. E.; KALIL, A.; SAFFI, J. Translesion synthesis and clinical characteristics of tumor aggression in sporadic colorectal cancer. <i>EJSO</i> , 45 , v.45, p.e117 - , 2019. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.ejso.2018.10.403] |
| 3. |  LEGUISAMO, N.; LAPORTE, G.; GLÓRIA, H.; LUCHESE, A.; CADORE, E.; MONTENEGRO, G.; LAU, V.; NOCCHI, KALIL, A. Association of DNA repair modulation and aggressiveness in colorectal cancer liver metastasis. <i>HPB</i> , 20 , p.S362 - S363, 2018. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.hpb.2018.06.2612] |
| 4. |  AZAMBUJA, DANIEL B.; LEGUISAMO, NATALIA M.; GLORIA, Helena C.; KALIL, ANTONIO NOCCHI; RHODEN, ERNANI; SAFFI, JENIFER. Prognostic impact of changes in base excision repair machinery in sporadic colorectal cancer. <i>PATHOLOGY RESEARCH AND PRACTICE</i> , 116 , v.214, p.64 - 71, 2018. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.prr.2017.11.012] |
| 5. |  LEGUISAMO, NATALIA M.; GLORIA, Helena C.; KALIL, ANTONIO N.; MARTINS, TALITA V.; AZAMBUJA, DANIEL B.; MEIRA, LISIANE B. ; SAFFI, JENIFER. Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy. <i>Oncotarget</i> , 8 , v.8, p.1949-2553 - , 2017. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital |
| 6. |  IUTZ, BRUNA S.; LEGUISAMO, NATALIA M.; CABRAL, NICOLE K.; GLORIA, Helena C.; REITER, KELI C.; AGNES, GRASIELA; ZANELLA, VIRGILIO; MEYER, ERIKA L.S.; SAFFI, JENIFER. Imbalance in DNA repair machinery is associated with BRAF V600E mutation and tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. <i>MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY</i> , 353 , v.472, p.140 - 149, 2017. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.mce.2017.12.004] |
| 7. |  LEGUISAMO, NATALIA; GLORIA, HELENA DE CASTRO E; AZAMBUJA, DANIEL DE BARCELLOS; KALIL, ANTONIO NOCCHI; SAFFI, JENIFER. IMPACTO PRONÓSTICO DAS ALTERAÇÕES NA MAQUINARIA DE REPARO POR EXCIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS EM TUMORES COLORRETAIS ESPORÁDICOS. <i>JOURNAL OF COLOPROCTOLOGY</i> (RIO DE JANEIRO, IMPRESSO) . v.37, p.4 - , 2017. |



06/11/2019

Currículo Lattes

Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.jcol.2017.09.307]

8.  ANDREAZZA, GUSTAVO; LEGUISAMO, NATÁLIA; GLORIA, HELENA DE CASTRO E; AZAMBUJA, DANIEL B.; BARCELLOS, KALIL, ANTONIO NOCCHI; SAFFI, JENIFER. VALOR PROGNÓSTICO DAS POLIMERASES TRANSLEÇÃO NO CÂNCER COLORRETAL ESPORÁDICO. JOURNAL OF COLOPROCTOLOGY (RIO DE JANEIRO, IMPRESSO), v.37, p.3- , 2017.
Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.jcol.2017.09.304]



Artigos aceitos para publicação

1.  LAPORTE, GUSTAVO A.; LEGUISAMO, NATÁLIA M.; GLORIA, HELENA DE CASTRO E; AZAMBUJA, DANIEL B.; KALIL, ANTONIO N.; SAFFI, JENIFER. The role of double strand break repair, translesion synthesis, and interstrand crosslinks in colorectal cancer progression: clinicopathological data and survival. JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY  2019.
Referências adicionais: Português.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. GLORIA, H. C.; MEIRELLES, N. L.; LAPORTE, G. A.; AZAMBUJA, D. B.; MARTINS, T. V.; KALIL, A. N.; SAFFI, J. Prognostic impact changes in nucleotide excision repair and translesion polymerases expression in sporadic colorectal cancer. In: VI Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, 2018, São Paulo, VI Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, 2018.
Palavras-chave: colorectal cancer, nucleotide excision repair, translesion synthesis, mismatch repair, prognosis
Áreas do conhecimento: Cancerologia, Biologia Molecular
Referências adicionais: Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

Apresentação de trabalho e palestra

1. GLORIA, Helena C.; LEGUISAMO, NATÁLIA M.; AGNES, G.; AZAMBUJA, DANIEL B.; LAPORTE, G. A.; KALIL, A. N.; SAFFI, J. Avaliação da Expressão das polimerases transleção sobre o prognóstico de pacientes portadores de câncer colorretal esporádico. 2017. (Outra Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: CANCER COLORRETAL, REPARO DE DNA
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Sarmento Leite, 245; Cidade: Porto Alegre; Evento: III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
2. GLORIA, Helena C.; MEIRELLES, N. L.; SAFFI, JENIFER. Estudo do crosstalk entre as vias de reparo de malpareamento (MMR) e por excisão de bases (BER) na sensibilidade a quimioterápicos no tratamento do câncer colorretal, 2017. (Outra Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: CANCER COLORRETAL, REPARO DE DNA
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Sarmento Leite, 245; Cidade: Porto Alegre; Evento: II ENCONTRO DO PPG BIOCÊNCIAS DA UFCSPA E ENCONTRO DE PESQUISA EM FISILOGIA DO RS; Inst.promotora/financiadora: PPG BIOCÊNCIAS da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
3. GLORIA, Helena C.; MEIRELLES, N. L.; AGNES, G.; AZAMBUJA, D. B.; LAPORTE, G. A.; KALIL, A. N.; SAFFI, J. Avaliação da modulação da Expressão das polimerases transleção sobre o prognóstico de pacientes com câncer colorretal esporádico. 2016. (Outra Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: UFCSPA; Cidade: Porto Alegre; Evento: II Mostra de trabalhos de ensino pesquisa e extensão da UFCSPA; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
4. MEIRELLES, N. L.; GLORIA, H. C.; KALIL, A. N.; MARTINS, T. V.; MEIRA, L.; SAFFI, J. DNA Repair imbalance is associated with tumor aggressiveness and modulates response to chemotherapy in sporadic colorectal cancer. 2016. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Espanha/Inglês; Local: PGA Catalunya Business and Convention Centre; Cidade: Girona; Evento: Gordon Research Conference on Mutagenesis; Inst.promotora/financiadora: Gordon Research Conferences
5. GLORIA, H. C.; SAFFI, J.; KALIL, A. N.; MEIRELLES, N. L.; MARTINS, T. V. Avaliação do perfil do reparo do DNA por Excisão sobre o prognóstico do câncer colorretal esporádico. 2015. (Outra Apresentação de Trabalho)
Áreas do conhecimento: Biologia Molecular, Cancerologia
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: UFCSPA; Cidade: Porto Alegre; Evento: I Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
6. GLORIA, H. C.; SAFFI, J. Avaliação do perfil do sistema de reparo de DNA por Excisão sobre o prognóstico do Câncer Colorretal Esporádico. 2015. (Outra Apresentação de Trabalho)
Áreas do conhecimento: Biologia Molecular, Cancerologia
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Cidade: Porto Alegre; Evento: XXVII Salão de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
7.  GLORIA, H. C.; SAFFI, J.; MEIRELLES, N. L.; KALIL, A. N. Determinação do Perfil de Reparo do DNA em Pacientes Portadores de Câncer Colorretal. 2014. (Outra Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: CANCER COLORRETAL, REPARO DE DNA
Áreas do conhecimento: Biologia Molecular
Referências adicionais: Brasil/Português; Cidade: Porto Alegre; Evento: XXVI Salão de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
8. GLORIA, H. C.; MEIRELLES, N. L.; MARTINS, T. V.; LAPORTE, G. A.; KALIL, A. N.; SAFFI, J. Determinação do Perfil de Reparo do DNA em pacientes portadores de câncer colorretal. 2014. (Outra Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais: Brasil/Português; Local: Sarmento Leite, 245; Cidade: Porto Alegre; Evento: III Semana Acadêmica da UFCSPA; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
9.  GLORIA, H. C.; SAFFI, J.; MEIRELLES, N. L.; KALIL, A. N. "Determinação do Perfil de Reparo do DNA em Pacientes portadores de câncer colorretal". 2013. (Outra Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: CANCER COLORRETAL, REPARO DE DNA
Áreas do conhecimento: Toxicologia Genética, Biologia Molecular
Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Rua Sarmento Leite 245; Cidade: Porto Alegre; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) IV Encontro do PPG BIOCÊNCIAS, 2019. (Congresso)
Estudo do crosstalk entre as vias de reparo de malpareamento (MMR) e por excisão de bases (BER) no

https://www.cnpq.br/cvlatteweb/pkg_impvcv.trata

3/4

06/11/2019

Currículo Lattes

prognóstico e na sensibilidade a quimioterápicos no tratamento do câncer colorretal.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) XIV Congresso da Associação Brasileira de mutagênese e genômica ambiental, 2019. (Congresso)
THE ROLE OF DOUBLE STRAND BREAK REPAIR, TRANSLESION SYNTHESIS AND INTERSTRAND CROSSLINKS IN COLORECTAL CANCER.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) Congresso do Hospital Santa Rita, 2018. (Congresso)
Avaliação do Valor Prognóstico da Expressão das Polimerases Translesão no Câncer Colorretal Esporádico.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) Congresso do Hospital Santa Rita, 2018. (Congresso)
Avaliação da associação entre alterações na Via de Reparo por Excisão de Nucleotídeos e aspectos clinicopatológicos câncer colorretal esporádico.
5. Destaques da ASCO 2018, 2018. (Outra)
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) III Encontro do PPG BIOCÊNCIAS, 2018. (Encontro)
Estudo do Crosstalk entre as vias de reparo de malpareamento (MMR) e por excisão de bases (BER) na sensibilidade a quimioterápicos no tratamento do câncer colorretal.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) VI Fundamental Aspects of DNA Repair and Mutagenesis, 2018. (Congresso)
Prognostic impact changes in nucleotide excision repair and translesion polymerases expression in sporadic colorectal cancer.
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) II ENCONTRO DO PPG BIOCÊNCIAS DA UFCSPA E ENCONTRO DE PESQUISA EM FISIOLÓGIA DO RS, 2017. (Encontro)
Estudo do crosstalk entre as vias de reparo de malpareamento (MMR) e por excisão de bases (BER) na sensibilidade a quimioterápicos no tratamento do câncer colorretal.
9. III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA, 2017. (Outra)
Avaliação da expressão das polimerases translesão no prognóstico de pacientes portadores de câncer colorretal esporádico.
10. II Mostra de Ensino Pesquisa e Extensão da UFCSPA, 2016. (Outra)
Avaliação da Modulação da expressão das polimerases translesão sobre o prognóstico de pacientes com câncer colorretal esporádico.
11. XII Congresso da Mutagen-Brasil, 2016. (Congresso)
12. I Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2015. (Outra)
Avaliação do perfil do reparo do DNA por excisão sobre o prognóstico do câncer colorretal esporádico.
13. XXVII Salão de Iniciação Científica, 2015. (Outra)
Avaliação do perfil do reparo do DNA por excisão sobre o prognóstico do câncer colorretal esporádico.
14. Apresentação Oral no(a) III Semana Acadêmica UFCSPA, 2014. (Outra)
Determinação do Perfil de Reparo do DNA em pacientes portadores de câncer colorretal.
15. XXVI Salão de Iniciação Científica UFRGS, 2014. (Outra)
Determinação do Perfil de Reparo do DNA em pacientes portadores de câncer colorretal.
16. II Semana Acadêmica UFCSPA, 2013. (Outra)
Determinação do Perfil de Reparo do DNA em Pacientes Portadores de Câncer Colorretal.

Organização de evento

1. ALEGRE, U. F. C. S. P.; GLORIA, Helena C.
III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA, 2017. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais: Brasil/Português.
2. GLORIA, H. C.
II Mostra de Trabalhos de Ensino Pesquisa e Extensão da UFCSPA, 2016. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais: Brasil/Português.
3. GLORIA, H. C.
I Mostra de Trabalhos de Ensino Pesquisa e Extensão da UFCSPA, 2015. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais: Brasil/Português.
4. GLORIA, H. C.
II Semana Acadêmica da UFCSPA, 2013. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais: Brasil/Português.

Totais de produção

Produção bibliográfica

| | |
|--|---|
| Artigos completos publicados em periódico | 8 |
| Artigos aceitos para publicação | 1 |
| Trabalhos publicados em anais de eventos | 1 |
| Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra) | 1 |
| Apresentações de trabalhos (Outra) | 8 |

Eventos

| | |
|--------------------------------------|---|
| Participações em eventos (congresso) | 6 |
| Participações em eventos (encontro) | 2 |
| Participações em eventos (outra) | 8 |
| Organização de evento (outra) | 4 |

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 06/11/2019 às 17:01:40.