UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEPATOLOGIA

Carlos Daniel Hernández Antonello

AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE REPARO DE QUEBRAS DUPLAS DO DNA EM PACIENTES COM METÁSTASE HEPÁTICA DE CÂNCER COLORRETAL SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA

Porto Alegre

2021

Carlos Daniel Hernández Antonello

AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE REPARO DE QUEBRAS DUPLAS DO DNA EM PACIENTES COM METÁSTASE HEPÁTICA DE CÂNCER COLORRETAL SUBMETIDOS À HEPATECTOMIA

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

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

Porto Alegre
2021

Antonello, Carlos Daniel Hérnandez
Avaliação do sistema de reparo de quebras duplas do DNA em pacientes com metástase hepática de câncer colorretal submetidos à hepatectomia / Carlos Daniel Hérnandez Antonello. -- 2021.
115 f. : graf., tab. ; 30 cm.

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

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

1. Metástases hepáticas de câncer colorretal. 2. reparo de quebras duplas. 3. prognóstico. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico a conclusão desse mestrado à minha família, que sempre me motivou e acreditou em mim, a todos os pacientes, foco maior para o aprendizado e aprimoramento, visando realizar a melhor medicina possível.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e ao corpo docente do programa de pós-graduação em Hepatologia, pelo conhecimento transmitido.

Aos meus colegas de pós-graduação, com quem compartilhei momentos de aprendizagem.

Ao Prof. Dr. Antônio Nocchi Kalil, meu orientador, por me receber em seu grupo de pesquisa e me orientar ao longo deste período, sendo um exemplo profissional a ser seguido.

À Dra. Angélica Maria Lucchese e à Dra. Natália Leguisamo Meirelles, minhas co-orientadoras, por incentivarem minha formação acadêmica, me auxiliarem na pesquisa desenvolvida, e por terem acreditado no meu trabalho.

Aos meus pais, minha esposa Mariuze e filha Valentina, por estarem sempre ao meu lado acreditando que seria possível a realização deste sonho.

Aos pacientes que tornaram possível esta pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, o meu profundo agradecimento.

RESUMO

Introdução: A identificação de grupos de risco específicos para a recorrências após a cirurgia em metástases hepáticas de câncer colorretal (MHCCR) continua sendo um desafio devido a heterogeneidade da doença. Parâmetros clinicopatológicos clássicos possuem limitado valor prognóstico.

Material e métodos: Incluímos 50 pacientes de maneira prospectiva. Amostras de MHCCR e tecido hepático normal adjacente de pacientes que foram submetidos a hepatectomia com intenção curativa foram avaliadas para expressão gênica de genes chave das vias de reparo de quebras duplas (*RAD51*, *BRCA1* e *XRCC5*), por RT-qPCR (n=32), e para expressão proteica por imunoistoquímica (Ku80 (n=32), MLH1 e MSH6 (n=50). O papel prognóstico dos dados moleculares e clinicopatológicos foi investigado por regressão de Cox para progressão livre de doença (PFS) e sobrevida global (OS).

Resultados: Níveis aumentados de mRNA de *RAD51* e *XRCC5* em tecido tumoral foram associados a tratamento neoadjuvante para MHCCR com deficiência no reparo de malpareamento (dMMR). Baixa expressão de *XRCC5* foi associada a pior OS e PFS. Entretanto, análise multivariada não confirmou baixo XRCC5 como fator prognóstico independente (PFS HR IC95% = 6.727 (0.471 - 9.058), p = 0.016; OS HR IC95% = 9.120 (0.918 - 9.612); P= 0.059). O tratamento neoadjuvante para MHCCR e margens cirúrgicas positivas após a hepatectomia foram confirmados como fatores prognósticos independentes para PFS. Baixos níveis de *XRCC5* em tumores prediz pior PFS em pacientes com margens cirúrgicas positivas (R1-R2) que receberam tratamento neoadjuvante para MHCCR quando comparados àqueles que não receberam este tratamento.

Conclusão: Nossos resultados sugerem o papel de *XRCC5* como fator prognóstico em MHCCR ressecáveis. Baixos níveis de mRNA de *XRCC5* podem predizer maior risco de recorrência e sobrevida, particularmente em pacientes com margens cirúrgicas positivas que não receberam quimioterapia neoadjuvante para MHCCR.

Palavras-Chave: Metástases hepáticas de câncer colorretal, reparo de quebras duplas, prognóstico**.**

ABSTRACT

Background: Identification of specific risk groups for recurrence after surgery for isolated colorectal liver metastases (CRLM) remains challenging due to the heterogeneity of the disease. Classical clinicopathologic parameters have limited prognostic value.

Methods: We included 50 patients prospectively. CRLM and matched adjacent normal liver specimens of patients who underwent hepatectomy with curative intent were assessed for gene expression of key DSBR genes (*RAD51*, *BRCA1* and *XRCC5*) by reverse transcription-quantitative PCR (n=32) and protein expression by immunohistochemistry (Ku80 (n=32), MLH1 and MSH6 (n= 50)). Prognostic role of molecular and clinicopathological data were investigated by Cox Regression for progression free survival (PFS) and overall survival (OS).

Results: Increased *RAD51* and *XRCC5* mRNA levels in neoplastic tissues were associated with neoadjuvant treatment for CRLM mismatch repair deficiency (dMMR). Low *XRCC5* expression was associated with shorter OS and PFS. However, multivariate analysis did not confirm low *XRCC5* as independent prognosticator (PFS HR IC95% = 6.727 (0.471 - 9.058), p = 0.016; OS HR IC95% = 9.120 (0.918 - 9.612); P= 0.059). Neoadjuvant treatment for CRLM and surgical margins after hepatectomy were confirmed as independent prognosticators of PFS. Decreased *XRCC5* levels in tumor tissues predicted poor PFS in patients with positive surgical margins (R1-R2) who received neoadjuvant treatment for CRLM compared to those who did not receive it.

Conclusions: Our results suggest a prognosticator role for *XRCC5* in resectable CRLM. Low *XRCC5* mRNA levels may predict higher recurrence risk and survival, particularly in patients with positive surgical margins who did not receive neoadjuvant chemotherapy for CRLM.

Key-words: Colorectal cancer liver metastases; DNA double strand break repair; disease recurrence; prognosis.

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1 - Mapa global que apresenta o ranking nacional de câncer como causa de morte em idades abaixo de 70 anos em 2015. O número de países representados em cada grupo de ranking está incluído na legenda. 14
Figura 2: Tendências nas taxas de incidência de câncer colorretal (1995 a 2016) e mortalidade (1970 a 2017) por idade e sexo, Estados Unidos. 15
Figura 3: Etiologia molecular do CCR. 18
Figura 4: Fluxo de tratamento para MHCCR. 26
Figura 5: Tipos de lesões ao DNA e as vias de reparo do DNA responsáveis por elas..... 28
Figura 6: Esquema do sistema de reparo de malpareamento (MMR). 31
Figura 7: Mecanismos de reparo de quebras duplas do DNA. 36

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1. Gene expression of representative double strand break repair genes in colorectal liver metastases and matched normal liver……...74
Figure 2. Survival of patients with colorectal liver metastases who underwent hepatectomy (n=50)……...81
Figure 3. Overall survival of CRLM patients and survival patterns……83
Figure 4. Progression-free survival of CRLM patients and survival patterns…….86

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

Tabela 1: Estadiamento do Câncer Colorretal 19

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1. Clinicopathological features of CRCLM patients……71
Table 2: Perioperative prognostic factors of CRCLM patients……72
Table 3. Associations between expression of DSBR genes of and clinicopathological features of CRCLM patients……..77
Table 4. Associations between Ku80 protein expression and MMR status in CRLM and prognostic clinicopathological features……79
Table 5. Univariate and multivariate analyses of overall survival of CRLM patients……82
Table 6. Univariate and multivariate analyses of progression free survival of CRLM patients……85

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

5-FU: 5-fluorouracil

AJCC : American Joint Committee on Cancer

APC: *adenomatous poliposis coli*

ASCO: *American Association of Clinical Oncology*

BER: *Base Excision Repair*

BRAF: B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase

CCR: Câncer colorretal

CEA: antígeno carcinoembrionário

CIMP: *CpG island methylator phenotype*

CIN: *chromosomal instability*

DDR: *DNA Damage Response*

dMMR: *Mismatch repair deficiente*

DSBR: *Double Strand Break Repair*

EGFR: *epidermal growth fator receptor*

FOLFIRI: 5-fluorouracil, leucovorina e irinotecano

FOLFOX: 5-fluorouracil, leucovorina e oxaliplatina

HRR: *Homologous Recombination Repair*),

MHCCR: metástase hepática do câncer colorretal

MMEJ: *Microhomology end joining*

MMR: *Mismatch Repair*

MSI: *microsatellite instability*

MSI-H: *Microsatellite instability high*

MSI-low: Microsatellite instability low

NER: *Nucleotide Excision Repair*

NHEJ: *Non-Homologous End Joining*

pMMR: Mismatch repair proficient

RAS: *reticular activating system*

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TLS: *Translesion Synthesis*

TNM: *Tumor-node-metastasis*

TS: timidilato sintase

VEGF: *vascular endotelial growth fator*

XELOX: Capecitabina, leucovorina e oxaliplatina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

1.1 Câncer Colorretal 13

1.1.1 Epidemiologia 13

1.1.2 Aspectos clínicos 15

1.1.3 Etiologia Molecular 16

1.1.4 Estadiamento e tratamento 19

1.2 Metástases hepáticas de câncer colorretal (MHCCR) 21

1.2.1 Aspectos celulares e moleculares 22

1.2.2 Fatores prognósticos 23

1.2.3 Tratamento das MHCCR 24

1.3 Sistemas de reparo do DNA 26

1.3.1 Reparo de malpareamento 29

1.3.2 Reparo de quebras duplas do DNA 34

2 JUSTIFICATIVA 40

3 OBJETIVOS 42

3.1 Geral 42

3.2 Específicos 42

4 REFERÊNCIAS 43

5 ARTIGO CIENTÍFICO 61

6. CONCLUSÕES 100

7. PERSPECTIVAS FUTURAS 101

6 ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 102

7 ANEXO II – FICHA DE COLETA DE DADOS 104

8 ANEXO III - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA 109

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal

1.1.1 Epidemiologia

O câncer permanece como uma das principais causas de morte, em todos os países do mundo. De acordo, com dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, 18.1 milhões de novos casos de câncer e 9.6 milhões de mortes por câncer foram previstos para 2018 (1). No Brasil, o câncer configura-se, como um problema de saúde pública de dimensões nacionais. Em virtude do aumento da expectativa de vida as neoplasias ganharam importância crescente no perfil de mortalidade do país, o somatório de todas as neoplasias já estima-se ocupar o primeiro lugar como causa de óbito. De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) (2), estima-se que para cada ano, do triênio 2020-2022, que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer, sendo desses, cerca de 40.990 novos casos de câncer colorretal (CCR), com um ligeiro predomínio em indivíduos do sexo masculino (20.520) em relação ao feminino (20.470). Esta neoplasia é a terceira mais incidente e a segunda maior responsável pela mortalidade associada ao câncer. A incidência do CCR varia em termos geográficos, sendo maior em países desenvolvidos, conforme mostra a figura 1, mas apresenta-se similar entre os gêneros (3).

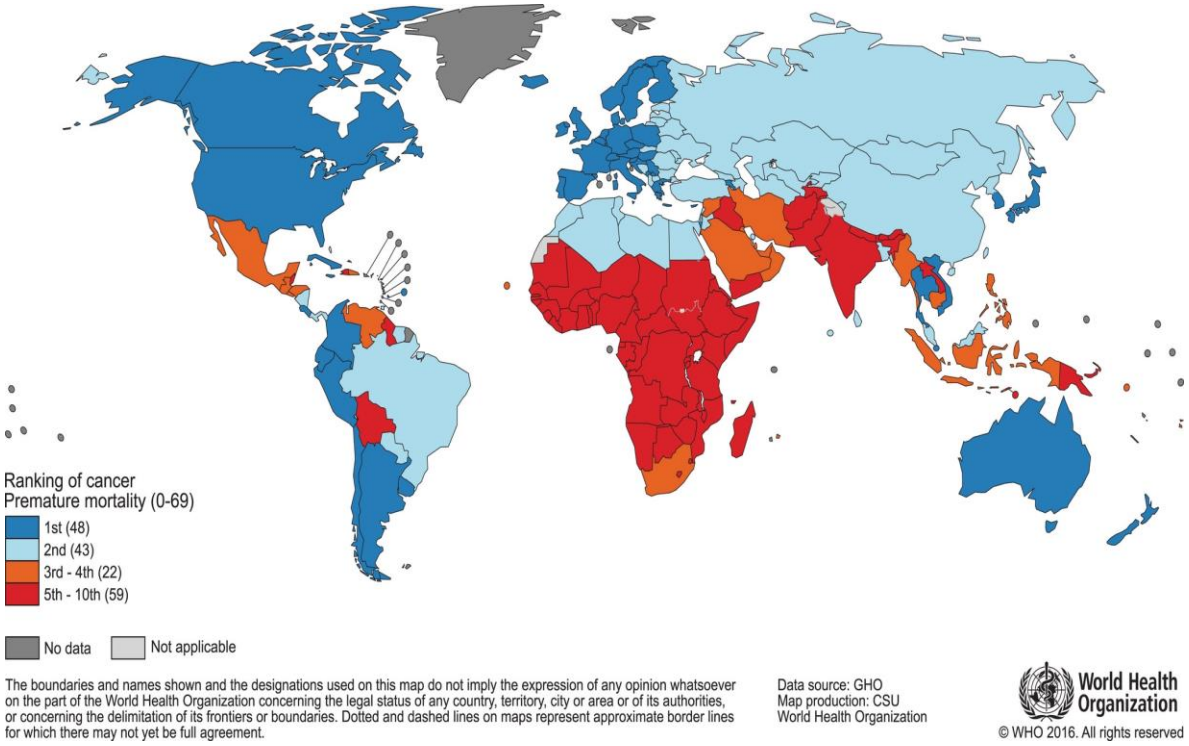


Figura 1 - Mapa global que apresenta o ranking nacional de câncer como causa de morte em idades abaixo de 70 anos em 2015. O número de países representados em cada grupo de ranking está incluído na legenda.

Nos Estados Unidos, a incidência de CCR tem declinado entre 2,5 - 4 % por ano nos últimos 15 anos, principalmente em pacientes acima de 65 anos. No entanto, as taxas de incidência continuam ascendentes na população abaixo dos 50 anos, figura 2 (4).

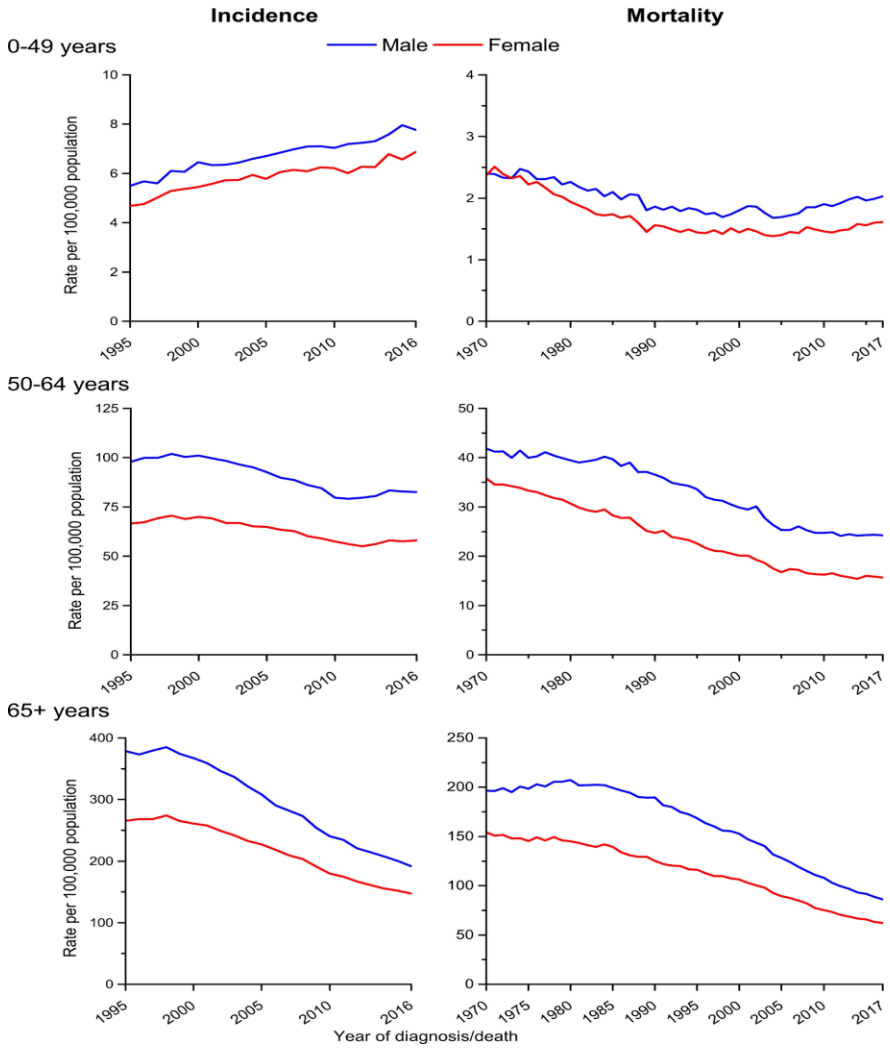


Figura 2: Tendências nas taxas de incidência de câncer colorretal (1995 a 2016) e mortalidade (1970 a 2017) por idade e sexo, Estados Unidos (4).

1.1.2 Aspectos clínicos

Dentre os fatores de risco associados ao desenvolvimento do CCR esporádico estão a idade avançada, a dieta, a obesidade, o tabagismo, o etilismo, o sedentarismo e a doença inflamatória intestinal (5). Uma dieta rica em gorduras, especialmente, gorduras de origem animal, carnes vermelhas e com baixa ingestão de fibras, é um dos principais fatores de risco associado ao desenvolvimento da doença, podendo afetar a microbiota

intestinal e a absorção de nutrientes, bem como ocasionando a geração de metabólitos carcinogênicos (6). Além destes, o etilismo também é outro fator de risco para o desenvolvimento da doença, principalmente, quando associado a pacientes mais jovens (7), em virtude da formação de metabólitos reativos do álcool como o acetaldeído, virtualmente carcinogênico, o qual tem o efeito potencializado quando associado ao tabagismo (8). A prática regular de atividade física e o controle do peso corporal são fatores protetores para a doença (9).

A inflamação intestinal crônica, clinicamente manifestada como retocolite ulcerativa e doença de Crohn, é um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do CCR (10). Ambas as doenças geralmente ocorrem em adultos jovens entre 20 e 30 anos de idade (11). Diversos aspectos do processo inflamatório crônico, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, metabólitos do ácido araquidônico e disfunção do sistema imunológico, podem contribuir para o aumento do risco de câncer. O processo inflamatório crônico e a consequente geração de espécies reativas do oxigênio provenientes do infiltrado inflamatório, bem como a superestimulação da mucosa intestinal, contribuem para um incremento no dano às bases nitrogenadas do DNA e desenvolvimento de lesões préneoplásicas (11).

1.1.3 Etiologia Molecular

O CCR é causado pelo acúmulo sequencial de mutações em oncogenes, genes supressores de tumores e genes relacionados à resposta a danos ao DNA. Dependendo da origem da mutação, os tumores colorretais podem ser classificados como esporádicos (70%), familiares (25%) e hereditários (5%) (12). Os casos familiares compreendem pacientes com um ou mais casos de CCR na família, entretanto sem um padrão esclarecido de herança genética. Os casos hereditários (cerca de 5-10%), por sua vez, são fruto da presença de mutações genéticas em células germinativas (13).

O desenvolvimento do CCR esporádico está associado a uma série de alterações genéticas e epigenéticas, as quais afetam genes envolvidos na regulação do ciclo celular, proliferação e apoptose (14). A maioria dos pacientes com CCR apresenta instabilidade genômica nas células epiteliais que compõem as criptas intestinais, mesmo antes do estabelecimento do tumor (15). A existência deste fenótipo molecular compreende a presença de alterações cromossômicas (deleções, duplicações, aneuploidias, etc.) identificadas em células epiteliais na ausência de qualquer processo patológico, particularmente em indivíduos com idade mais avançada. O acúmulo de mutações no nível das células-tronco intestinais que ocorrem com o envelhecimento é um mecanismo chave para promover o desenvolvimento do CCR (15).

Didaticamente é possível atribuir a três vias a etiologia molecular do CCR: (1) instabilidade cromossômica (CIN, do inglês: *chromosomal instability*), (2) instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês: *microsatellite instability*) e (3) fenótipo metilador da ilha CpG (CIMP, do inglês: *CpG island methylator phenotype*), como demonstrado na figura 3 (12,16,17).

A via clássica associada ao desenvolvimento do CCR refere-se à sequência adenoma-carcinoma responsável por 70-90 % dos casos de CCR (18). Tumores colorretais que decorrem desta via apresentam CIN após uma série de eventos que iniciam com a mutação no gene *APC* (do inglês: *adenomatous poliposis coli*). Esta mutação ocorre em cerca de 60-80% dos casos esporádicos de CCR (19). Adicionalmente, mutações também ocorrem nos genes *TP53* e *PIK3CA* (14).

A inativação dos genes envolvidos no mecanismo de reparo de malpareamento (MMR, do inglês: *Mismatch Repair*), ocasiona o acúmulo de mutações que gera a neoplasia celular (20), a inativação desta via resulta em MSI. Microssatélites são sequências de DNA de dois ou três nucleotídeos que se repetem em *tandem* e são passadas de uma geração para outra. Mutações genéticas e epigenéticas em genes da via de reparo de malpareamento ocorrem no número de repetições dos microssatélites tornando-os instáveis (21). Os tumores colorretais podem ser classificados como possuindo instabilidade de microssatélites ou sendo estáveis (MSS, do inglês: *microsatellite stable*). Tumores com altos níveis de MSI (MSI-H, do inglês: *MSI-high*) são mais comumente localizados no cólon direito e tipificados histologicamente por baixa

diferenciação celular, características mucinosas e invasão linfocítica. Comparados aos tumores com estabilidade de microssatélites (MSS, do inglês: *microsatellite stable*), os tumores MSI-H apresentam pior prognóstico (22).

No entanto, até 35% dos carcinomas surgem ao longo da via serrilhada, desenvolvendo-se a partir da lesão precursora conhecida como adenoma serrilhado séssil (também conhecido como pólipo serrilhado séssil). Os adenomas/pólipos serrilhados sésseis levam a carcinomas com fenótipo metilador da ilha CpG , que podem ser microssatélites instáveis altos ou microssatélites (23).

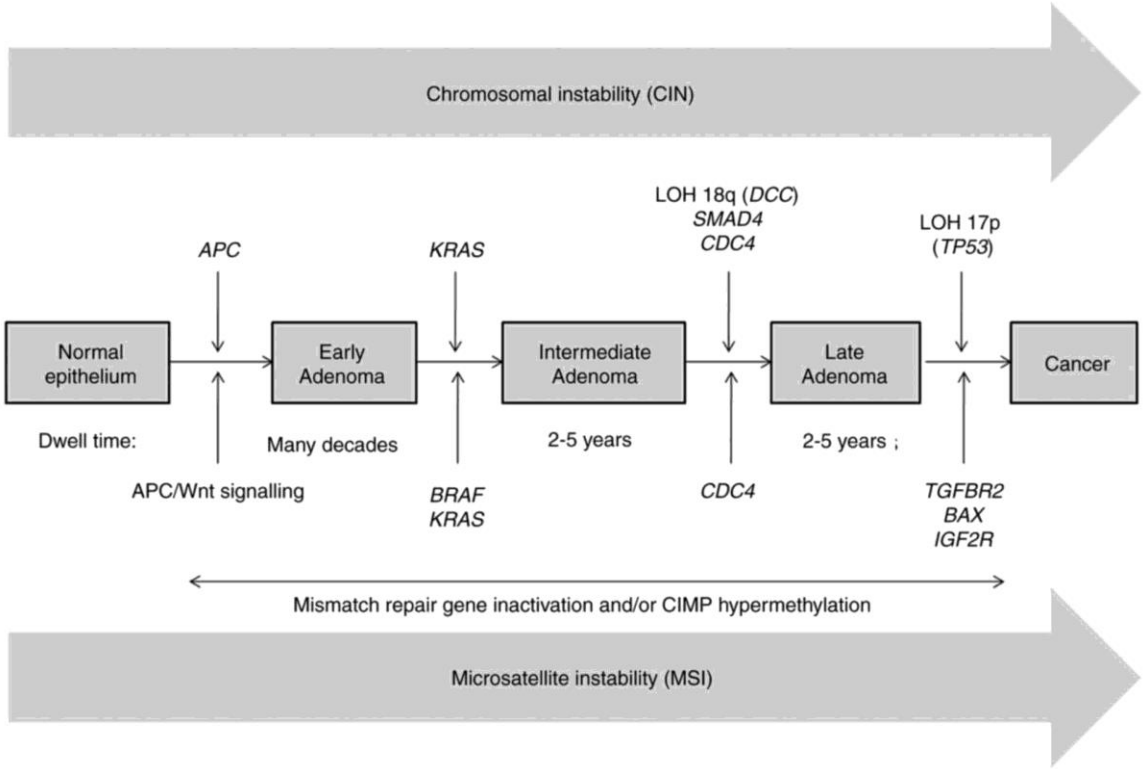


Figura 3: Etiologia molecular do CCR. Fonte: Nguyen, et al. 2018.

1.1.4 Estadiamento e tratamento

Apesar do reconhecimento da complexa heterogeneidade do CCR, o estadiamento é realizado através da classificação TNM (do inglês: Tumor-node-metastasis) da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (24), a principal ferramenta para esta finalidade, também sendo o principal balizador do prognóstico e do manejo da doença. A classificação TNM, conforme a tabela 1, utiliza três critérios de avaliação: tamanho do tumor (T), envolvimento dos linfonodos (N) e presença de metástases (M). Estes três parâmetros, são avaliados por exames de diagnóstico por imagem, endoscopia e/ou exploração cirúrgica. Cada um dos critérios apresenta diferentes classificações conforme sua evolução e estes, quando avaliados em conjunto, indicam o estágio de desenvolvimento da doença (25). A sobrevida em cinco anos pode variar de 90% a 10%, conforme o estádio I-IV (26).

Tabela 1: Estadiamento do Câncer Colorretal

Estágio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
IVA	T 1-4	N 0-2	M1a
IVB	T 1-4	N 0-2	M1b
IVC	T 1-4	N 0-2	M1c

Adaptado do AJCC 2018: Manual do estadiamento do câncer 8ª edição.

De acordo com as diretrizes do *National Comprehensive Cancer Network*, a terapia adjuvante não é recomendada para pacientes com CCR em estágios I ou II de baixo risco após cirurgia radical, pois há o entendimento que esses pacientes podem ser completamente curados com tratamento cirúrgico exclusivo. No entanto, aproximadamente 10% dos pacientes em estágio I e 20% dos pacientes em estágio II, apresentam recorrência ou metástase. Além disso, heterogeneidade acentuada no resultado da sobrevida é observada entre os pacientes com CCR em estágio II, responsável por aproximadamente 40% de todos os casos de CCR. Para esses pacientes, o estágio TNM, pode não servir como um marcador de alerta precoce para metástase ou recorrência no pós-operatório. Portanto, marcadores preditivos de prognósticos precisos adicionais devem ser identificados como um complemento ao sistema TNM, para terapia adjuvante pós-operatória (27).

A definição do tratamento de pacientes com CCR é feita por equipe multidisciplinar de acordo com o estadiamento clínico e patológico da doença, estado geral e preferências do paciente. Na maioria dos casos, a cirurgia para retirada do tumor primário é o principal componente curativo do tratamento para CCR, Entretanto, a localização da lesão primária irá ditar a abordagem terapêutica. Na maioria dos casos o tratamento consistirá na ressecção cirúrgica do tumor primário e dos linfonodos regionais afetados, quimioterapia e radioterapia, em esquemas adjuvantes (administrada após o tratamento cirúrgico ou radioterápico) e neoadjuvante (administrada anteriormente ao tratamento cirúrgico ou radioterápico). Em casos de câncer de reto, a radioterapia ou quimioterapia neoadjuvante são utilizadas para a redução do risco de recorrência local da doença (25). De maneira geral, tumores em estadio I e II de baixo risco receberão exclusivamente tratamento cirúrgico. Pacientes em estadio II de alto risco (maior invasividade ou T4, perfurados ou obstruídos, com baixo grau de diferenciação celular, com invasão linfovascular e histologia mucinosa), estadio III e IV têm indicação de quimioterapia adjuvante com esquemas combinados de 5-fluorouracil (5-FU), capecitabina, leucovorina, oxaliplatina, irinotecano, bevacizumab, cetuximab, panitumumab e regorafenib (25).

Os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de CCR induzem diferentes tipos de danos, tanto ao DNA quanto ao metabolismo celular. O 5-FU é considerado, desde os anos 60, o pilar de todos os esquemas quimioterápicos 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% (28,29). Oxaliplatina é um agente platinado que é utilizado junto ao 5-FU e a leucovorina no esquema denominado FOLFOX, ou junto a Capecitabina (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 (30). Outra combinação utilizada para o tratamento de CCR é o FOLFIRI, composto por 5-FU, leucovorina e irinotecano. O irinotecano é um análogo sintético da camptotecina, um inibidor de topoisomerase I (31).

Mais recentemente, especialmente em se tratando da abordagem do 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) inibidores de VEGF (do inglês: vascular endotelial growth fator): bevacizumabe e aflibercept; (2) anticorpos monoclonais, que inibem EGF (do inglês: epidermal growth fator), utilizados em pacientes que não possuem tumores com mutações no gene de RAS (do inglês: reticular Activating system): cetuximabe e panitumumabe; (3) inibidores de quinases (regorafenibe). (4) anticorpos monoclonais, que inibem a PD-1 e PD-L1.

1.2 Metástases hepáticas de câncer colorretal (MHCCR)

A metástase hepática do câncer colorretal (MHCCR) é o local mais comum de disseminação à distância, sendo que 15-25% dos indivíduos com CCR, já apresentam metástases no momento do diagnóstico e 40-50% irão desenvolvê-las ao longo do tempo (26). Os pacientes que desenvolvem metástases hepáticas têm o seu prognóstico bastante afetado, já que ao menos 2/3 dos óbitos são relacionados à presença destas lesões (32). Contudo, nas duas últimas décadas, a sobrevida global desse grupo de pacientes em 5 anos aumentou para 35-40%, havendo estudos que demonstram taxas

de sobrevida global em 5 anos de 47 a 60% após hepatectomia para metástases CCR (33).

Os seguintes fatores caracterizam o fígado como o sítio mais comum da metástase do CCR: (1) a drenagem venosa, pois toda a drenagem intestinal mesentérica passa pelo sistema venoso portal hepático; (2) a arquitetura específica, conceito conhecido como 'nichos pré-metastáticos' (34). Tal conceito defende a formação de um microambiente anormal no órgão à distância, antecedendo a disseminação metastática. Esse pré-condicionamento de um órgão específico é induzido por fatores secretados pelo tumor primário, tornando o ambiente receptivo para implantes secundários. No caso das metástases de tumor colorretal, o sítio favorecido seria o fígado (35).

1.2.1 Aspectos celulares e moleculares

O processo pelo qual as células tumorais deixam seu local primário e formam novas colônias em tecidos distantes é descrito como cascata invasão-metástase. Este processo consiste em cinco etapas: invasão local de células tumorais na matriz circundante (etapa 1), penetração de células tumorais no sistema circulatório (etapa 2), transporte sistêmico de células tumorais (etapa 3), extravasamento de células tumorais no parênquima, nos tecidos distantes (etapa 4), colonização de órgãos distantes e estabelecimento de tumores macroscópicos (etapa 5) (36). Esse processo foi inicialmente descrito por Paget, em sua hipótese de 'semente e do solo' (37). Conforme a teoria, a 'semente' metastática cresce, preferencialmente, em um ambiente, órgão, que de alguma forma, fornece um 'solo' adequado.

As células metastáticas que chegam ao fígado pela corrente sanguínea, encontram o microambiente no sinusoide hepático. As interações das células tumorais com células sinusoidais e extra-sinusoidais hepáticas (células endoteliais, Kupffer, estreladas e inflamatórias) determinam seu destino. As células sinusoidais podem ter um papel duplo, às vezes fatais para as células tumorais, mas também facilitadoras para sua sobrevivência e crescimento. As moléculas de adesão participam dessas interações e

podem afetar seus resultados. As células e quimiocinas, derivadas da medula óssea, também participam da batalha inicial pela sobrevivência das metástases. Depois que as células tumorais prendem e sobrevivem ao ataque inicial, os tumores podem crescer dentro do fígado em padrões distintos, refletindo respostas diferentes do hospedeiro, mecanismos de vascularização e atividade proteolítica (38).

1.2.2 Fatores prognósticos

Os fatores prognósticos do paciente com MHCCR são os fatores que determinam a expectativa evolutiva da doença. Leva-se em consideração a biologia do tumor (em particular a progressão/remissão da doença durante a quimioterapia), o status da mutação de genes alvo, a carga intra-hepática do tumor e a extensão de doença extra-hepática. Os principais fatores clínicos envolvidos com a determinação do prognóstico das MHCCR são estágio T, status linfonodal, localização do tumor primário (cólon/reto; cólon direito/cólon esquerdo), dimensão, número de lesões, grau de diferenciação e status da margem da lesão hepática. Além disto a presença de doença extra-hepática, o nível sérico de antígeno carcinoembrionário (CEA) e o intervalo livre de doença entre o CCR primário e a MHCCR são considerados fatores prognósticos (39).

A maioria dos estudos indica que o prognóstico é fortemente relacionado à extensão da doença metastática hepática. Em geral, a MHCCR metacrônica, está associado a um melhor resultado em comparação à MHCCR sincrônica (40). Estudos que investigaram as mutações genéticas demonstraram: que a maioria das alterações no tumor primário permaneceu na MHCCR. No entanto, a MHCCR, nos grupos sincrônico e metacrônico, pode apresentar diferenças genéticas, sugerindo um subtipo de tumor mais agressivo no grupo sincrônico (41).

No entanto, a utilidade dos modelos prognósticos na população geral é inconsistente, como ficou demonstrado em uma revisão recente de Gregoire e colegas, onde foram avaliados seis sistemas de pontuação e quatorze fatores prognósticos. Os

autores observaram que nenhum dos escores de risco atualmente disponíveis poderiam, de maneira confiável, interferir na proposta cirúrgica em um paciente com metástases hepáticas ressecáveis (42,43). Estes dados corroboram a necessidade da identificação de marcadores moleculares, que sirvam tanto para a estratificação de prognóstico, como indicativo de escolha terapêutica.

A sobrevivência após a ressecção da MHCCR, depende de vários fatores clínicos, patológicos e moleculares. Além dos fatores relacionados às características do tumor, tanto no tumor primário quanto na lesão metastática há a necessidade de considerar os fatores relacionados ao sistema imunológico do paciente e os fatores moleculares do tumor, identificados clinicamente pelas diferentes respostas ao tratamento quimioterápico (44).

1.2.3 Tratamento das MHCCR

A ressecção hepática da MHCCR, combinada com quimio-imunoterapia sistêmica tem potencial para ser curativo, e tem sido associada a taxas de sobrevida em 5 e 10 anos de até 50% e 35%, respectivamente (45). O objetivo do tratamento da metástase de CCR deve ser a remoção de todas as metástases com margens microscopicamente negativas. Entretanto, um alto número de recidivas pós ressecção é relatado chegando a 70% de recorrência, sendo que 50% dessas ocorrem no fígado (46), mesmo quando a ressecção é combinada com os mais modernos regimes adjuvantes sistêmicos (47).

O impacto da biologia tumoral no prognóstico em pacientes com MHCCR, tem sido tema de intensa pesquisa. Algumas revisões sistemáticas da literatura mostram que as mutações em *KRAS* e $BRAF^{V600E}$, estão negativamente associadas à sobrevida global e tempo livre de doença em pacientes submetidos à ressecção completa do fígado (48). O $BRAF^{V600E}$ pode ser considerado um biomarcador para a seleção do regime quimioterápico apropriado. O regime quimioterápico acrescentando a droga bevacizumabe, um anticorpo monoclonal recombinante humanizado, que bloqueia a

atividade do VEGF, tem se mostrado eficaz para o tratamento multimodal em pacientes com mutação *BRAF*^{V600E}(49). Portanto, a análise da mutação em *BRAF*^{V600E} tem sido incorporada na prática clínica para melhor adequação da decisão terapêutica do paciente com MHCCR.

O gene KRAS tem sido extensivamente estudado. Mutações neste gene são capazes de prever má resposta às terapias com receptor de fator de crescimento anti-epidérmico (EGFR), especificamente a terapia com cetuximabe, um anticorpo monoclonal anti-EGFR. Além disso, mutações em KRAS foram associadas a taxas mais altas de metástases extra hepáticas, resposta adversa à quimioterapia, margem de ressecção positiva, pior sobrevida global e tempo livre de doença após a cirurgia, independentemente do regime de quimioterapia e menor sobrevida após ressecção para recidiva (50).

A presença de células tumorais circulantes reflete em pior sobrevida na MHCCR, também podendo ser uma fonte para a detecção de mutações em KRAS e BRAF, para orientar a escolha da terapia direcionada (51). O nível plasmático de DNA livre de células circulantes (cfDNA), tem sido comprovado, como um preditor de sobrevida no CCR metastático (52).

Atualmente, a decisão da terapêutica sistêmica das MHCCR é influenciada pela pesquisa de mutações. A Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO, do inglês: *American Association Of Clinical Oncology*), recomenda que em todos os pacientes com CCR estágio IV teste-se mutações em KRAS, sendo preferível a realização do teste na lesão metastática devido a diferença que pode haver entre a lesão primária e a metástase (53).

A MHCCR inicialmente ressecável, quando não operada, pode progredir apesar do uso dos melhores quimioterápicos disponíveis e tornar-se irressecável, ou exigir uma abordagem cirúrgica mais extensa. Os casos ressecáveis devem ser submetidos à ressecção primeiro, mas a quimioterapia deve ser administrada após a ressecção. Os casos ressecáveis, mas não adequados, e os casos não ressecáveis devem receber

quimioterapia, mas a escolha da quimioterapia, depende da localização do tumor e do status da mutação no RAS e BRAF conforme a Figura 4.

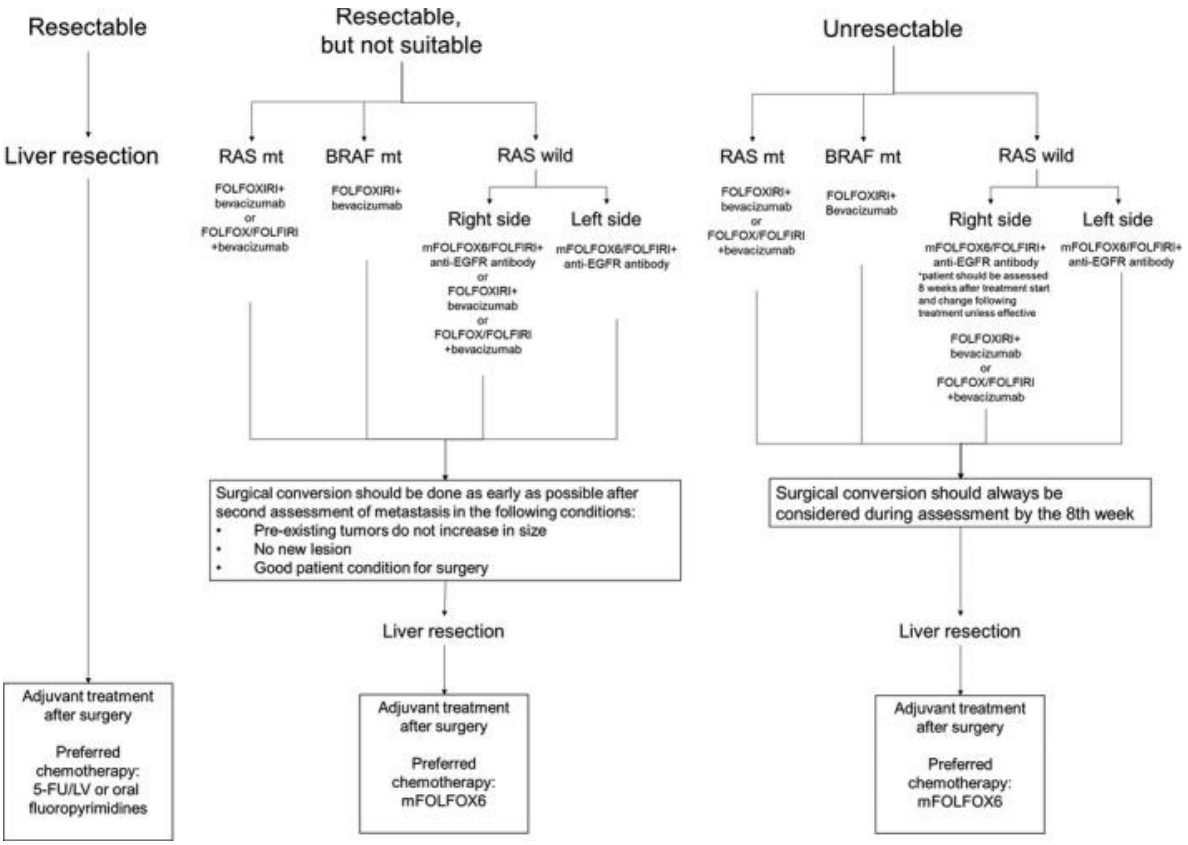


Figura 4: Fluxo de tratamento para MHCCR. Adaptado de Oki, et al, 2018.

1.3 Sistemas de reparo do DNA

Os sistemas de reparo de DNA são um complexo mecanismo, que evoluiu para garantir a conservação da integridade do DNA dos organismos, ou seja, a manutenção da informação genômica. As vias que compões os sistemas de reparo do DNA atuam para detectar lesões, sinalizar sua presença e promover seu reparo da forma mais

fidedigna possível. Células deficientes nesses mecanismos exibem maiores sensibilidade a agentes prejudiciais ao DNA e taxas de mutação (54). Embora as respostas sejam diversas para as diferentes classes de lesões de DNA, elas geralmente ocorrem através de uma programação semelhante.

A grande diversidade de lesões que podem ser causadas ao DNA requer mecanismos de reparo de DNA amplamente distintos. De acordo com a natureza da lesão, uma ou mais vias são requisitadas. Didaticamente, as vias que compõe o sistema de reparo do DNA são apresentadas individualmente. Contudo, sabe-se que elas possuem intersecções e compartilham de alguns componentes (55). São vias de reparo de lesões ao DNA: reparo direto, que realiza o reparo do DNA através de uma única enzima; reparo por excisão de bases (BER, do inglês: *Base Excision Repair*), reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês: *Nucleotide Excision Repair*), que são responsáveis pelo reparo de danos a bases e nucleotídeos, respectivamente; reparo de malpareamento, que corrige pequenos erros de pareamento, *loops* de inserções e deleções durante a replicação do DNA; reparo de quebras duplas do DNA (DSBR, do inglês: *Double Strand Break Repair*), composto por três vias - reparo por recombinação homóloga (HRR, do inglês: *Homologous Recombination Repair*), reparo por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ, do inglês: *Non-Homologous End Joining*) e reparo por microhomologia (MMEJ, do inglês: *Microhomology end joining*). Finalmente, há a via conhecida por sua capacidade de tolerar danos induzidos ao DNA e garantir a continuidade da replicação desta molécula e do ciclo celular, a síntese translesão (TLS, do inglês: *Translesion Synthesis*) (56,57) (Figura 5).

Os sistemas de reparo do DNA possuem uma maquinaria proteica/enzimática, que realiza monitoramento contínuo da presença de lesões no DNA. Em linhas gerais, o BER remove bases que passaram por processo de desaminação, metilação, oxidação ou perda espontânea de uma base de DNA, em suma, trata-se de danos não volumosos; o NER reconhece e corrige danos ao DNA causados por luz ultravioleta e agentes indutores de ligações volumosas ou adutos, como os agentes platinados; o MMR corrige erros pós-replicação, removendo bases malpareadas decorrentes de erros de inserção e deleção; o DSBR, mecanismo essencial para homeostase dos cromossomos, evita perdas de grandes informações e rearranjos causadas pela radiação ionizante, os quais

além de severamente tóxicos para a célula, induzem um grau elevado de instabilidade cromossômica (56).

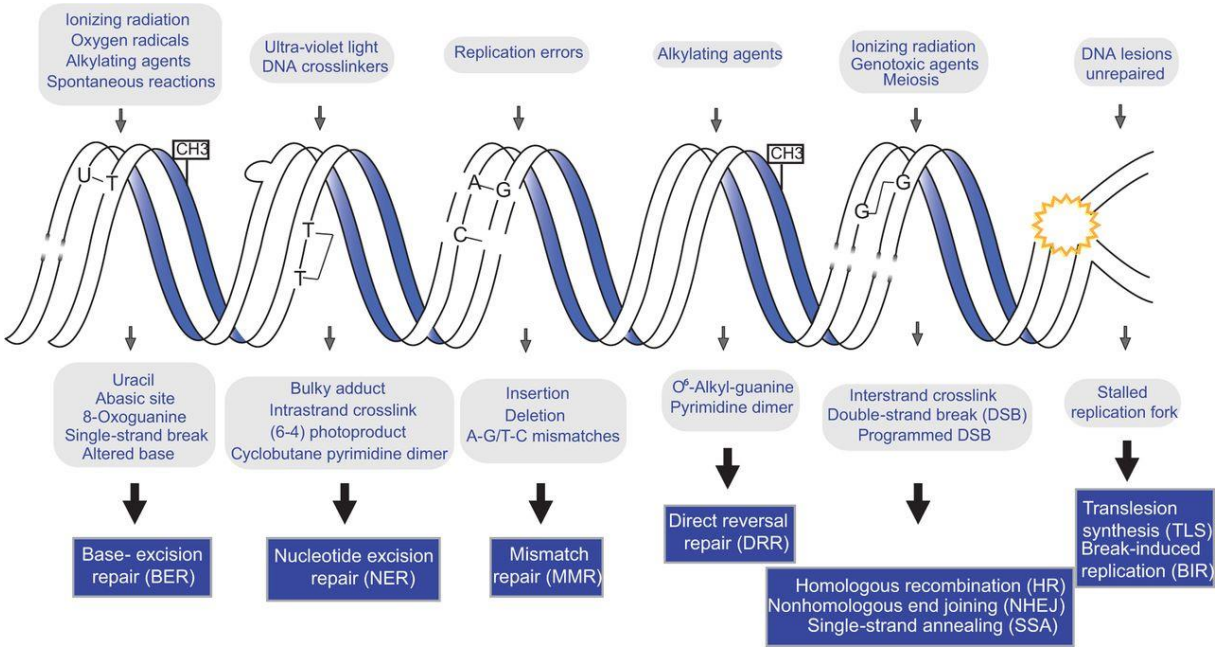


Figura 5: Tipos de lesões ao DNA e as vias de reparo do DNA responsáveis por elas (58).

A deficiência de reparo do DNA é um evento frequente na tumorigênese, que resulta em taxas de mutação aumentadas e instabilidade genética, proporcionando assim uma vantagem de crescimento seletivo, uma força motriz para a evolução do tumor. Além disso, estas deficiências são consideradas alvos terapêuticos clássicos, particularmente no que tange ao racional biológico que respalda a ação de agentes que causam danos ao DNA, como a radiação e os agentes quimioterápicos. Apesar da introdução das terapias-alvo e da imunoterapia, os agentes indutores de danos ao DNA (agentes à base de platina, alquilantes e intercalantes de DNA) ainda são amplamente utilizados no tratamento do câncer, sendo a única opção em alguns cenários clínicos (59,60).

Mais recentemente, os componentes dos sistemas de reparo do DNA conquistaram uma nova relevância na prática clínica oncológica, desta vez como biomarcadores de resposta terapêutica (61). Por exemplo, a associação entre a metilação do promotor do

gene *MGMT*, que faz parte da via de reparo direto, e a resposta à temozolomida no glioblastoma multiforme; a resposta aos inibidores de PARP baseados no princípio da letalidade sintética em tumores de mama, ovário e próstata com mutações em *BRCA1/2*, os quais são deficientes em HRR; e a deficiência da via MMR em tumores colorretais e a resposta ao 5-FU e inibidores de *checkpoint* imune (62–65).

Ainda que os fundamentos da sensibilização das células tumorais aos danos provocados ao DNA continuem a ser esclarecidos, a janela terapêutica para os agentes indutores de danos DNA é mediada por uma relativa deficiência na função de reparo do DNA nas células tumorais em relação às células normais (66). Neste contexto, defeitos nas vias de reparo do DNA podem fornecer novas estratégias terapêuticas, ainda não exploradas no CRC (67). Além disso, o uso de inibidores de reparo de DNA específicos, visando às vias essenciais de reparo de danos ao DNA, nos permite provocar falhas no sistema de resposta a danos no DNA (DDR, do inglês: *DNA Damage Response*) das células tumorais.

Atualmente, são muitas as evidências obtidas de grandes bancos de dados de análises genômicas de tumores colorretais e suas metástases, as quais vêm sugerindo muitas assinaturas moleculares que incluem as alterações nos sistemas de reparo do DNA. Embora a deficiência de MMR seja a única assinatura relevante baseada na DDR com aplicabilidade clínica no contexto do CCR, a identificação de alterações outras vias pode revelar assinaturas mutacionais e fornecer *insights* sobre novos alvos. Nas próximas seções, serão abordadas as vias MMR e DSBR no contexto do CCR e das MHCCR, as quais são temas centrais de estudo nesta dissertação.

1.3.1 Reparo de malpareamento

O MMR consiste em um grupo de proteínas que interagem entre si para identificar e reparar bases malpareadas e pequenos *loops* resultantes de inserções ou deleções que ocorreram durante a replicação do DNA. Este sistema possui três homólogos MutS

(MSH2, MSH3 e MSH6) e quatro homólogos MutL (MLH1, MLH3, PMS1 e PMS2), os quais funcionam em pares ou heterodímeros. Designadamente, MSH2 forma heterodímeros com MSH3 (MutSβ) e MSH6 (MutSα), enquanto MLH1 forma heterodímeros com PMS2, PMS1 e MLH3, formando MutLα, MutLβ e MutLγ, respectivamente (68).

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 MSH2 e MSH3) que irá coordenar o reparo da lesão (69). O reparo mediado por MMR pode ser dividido em quatro etapas: (1) reconhecimento do malpareamento pelo heterodímero MutS, MutSα é responsável pelo reconhecimento de inserções e deleções pequenas (até 3 nucleotídeos), MutSβ 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 MutSα ou MutSβ recruta MutLα 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 (68,70). A Figura 6 apresenta esquematicamente os eventos e os agentes atuantes nesta via.

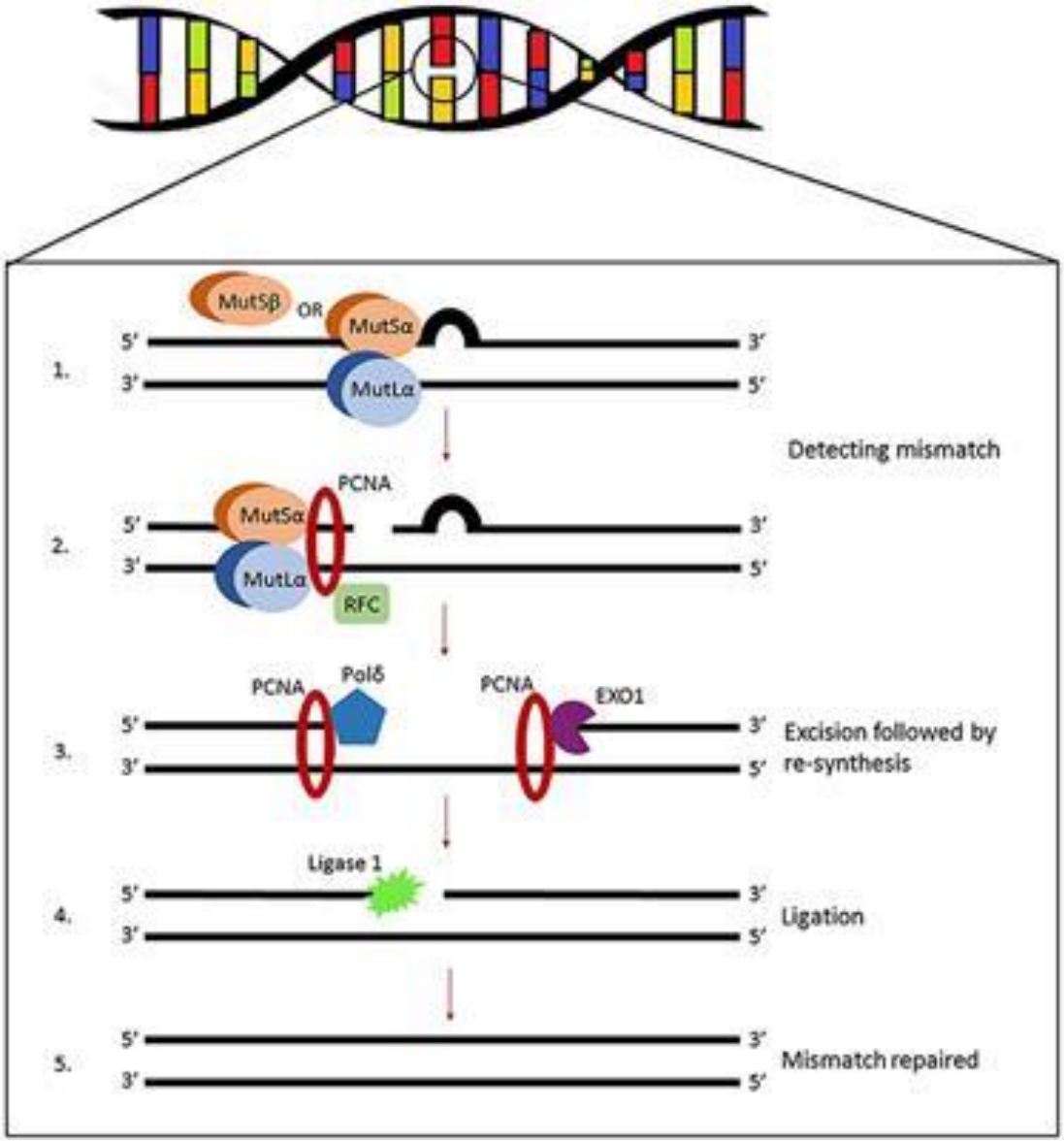


Figura 6: Esquema do sistema de reparo de malpareamento (MMR) (68).

A disfunção do MMR em humanos foi identificada em 1993, em tumores de cólon, endométrio e outros órgãos em pacientes com Síndrome de Lynch. Desde então, identificou-se como fenótipo molecular destes tumores a presença de instabilidade de microssatélites. A deficiência de MMR (dMMR) é clinicamente equivalente à instabilidade alta de microssatélites (MSI-H, do inglês: *MSI-high*), enquanto MMR proficiente (pMMR) é o mesmo que instabilidade de microssatélites baixa (MSI-L, do inglês: *MSI-low*) ou microssatélites estáveis (MSS, do inglês: *Microsatellite Stable*). Enquanto a ocorrência

de CCR devido a mutações germinativas nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e/ou *PMS2* ou *EpCAM* representa 2% a 4% de todos os casos de CRC (71), cerca de 15-20% de tumores colorretais esporádicos também apresentam dMMR/MSI em decorrência, principalmente, do silenciamento epigenético do promotor de *hMLH1* (72).

É possível identificar a deficiência em MMR (dMMR) através da técnica de imunoistoquímica, a qual revela a presença ou ausência de expressão do produto proteico de uma ou mais proteínas do MMR no tecido tumoral (73). Ao avaliar a expressão das proteínas MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6, pode-se concluir em relação à funcionalidade dos heterodímeros e, então, da via como um todo. A ausência de expressão de MLH1 reflete a incapacidade da atuação de PMS2 na via, uma vez que juntas devem formar o heterodímero MutLα. Igualmente, ausência de expressão de PMS2 mesmo com expressão positiva de MLH1 ou a perda de expressão de MSH2 ou MSH6 (que formam o heterodímero MutSα) também resultam em inativação da via (74).

Tumores colorretais dMMR são caracterizados por apresentar taxa mutacional elevada e mutação *BRAF*^{V600E}, mas infrequentes alterações no número de cópias dos genes. Recentemente, identificou-se que a dMMR é responsável pela geração de um microambiente tumoral imunogênico, caracterizado pela produção demasiada de neoantígenos, ativação do receptor de morte programada- 1 (PD-1, do inglês: *Programmed Death 1*) e infiltração intratumoral de células *Natural Killers* (NK), células T *helper* tipo 1, células T citotóxicas e linfócitos T citotóxicos CD8+ no tumor (75). Clinicamente, tumores colorretais dMMR são localização no cólon direito, histologia mucinosa, baixo grau de diferenciação celular, presença de infiltração angiolinfática, desenvolvimento tardio e melhor prognóstico (76,77).

A dMMR é mais frequente na doença em estágio II (22%) do que na doença em estágio III (12%), enquanto que no estágio IV ocorre em apenas 4% dos casos, sugerindo uma tendência reduzida para metástases à distância (71). Considerando, que o MMR é uma via encarregada na remoção de inserções errôneas e que um dos mecanismos clássicos de citotoxicidade do 5-FU é a inserção de uracila no DNA, diversos estudos investigaram se este fenótipo molecular pode ser um marcador preditivo em relação a um menor benefício de regimes adjuvantes à base de fluoropirimidina.

A citotoxicidade mediada por 5-FU depende da inibição da enzima timidilato sintase (TS) e da incorporação incorreta de fluorouracila e uracila no DNA durante a replicação. Esta incorporação errônea de bases no DNA configura erros que requerem a atuação das vias de reparo do DNA. As células de CCR proficientes em MMR apresentam maior sensibilidade o 5-FU em relação às células dMMR em virtude um ciclo fútil de reparo na tentativa de remover as bases incorporadas incorretamente. Alternativamente, nas células dMMR, o BER pode ser iniciado, criando lesões como sítios abásicos, quebras simples e duplas no DNA em resposta ao 5-FU (78).

Dois grandes estudos retrospectivos demonstraram que a dMMR prediz a resposta ao 5-FU ou capecitabina adjuvante nesses pacientes, mas estudos mais recentes não conseguiram provar dMMR como um biomarcador da eficácia das fluoropirimidinas para a doença em estágio II (79,80). Portanto, tanto a observação quanto a quimioterapia adjuvante à base de fluoropirimidina são recomendadas para doença em estágio II com ou sem deficiências de MMR. No entanto, apenas para pacientes considerados com alto risco de recorrência ou com tumores colorretais dMMR, o tratamento adjuvante pode incluir 5-FU ou capecitabina em combinação com oxaliplatina (FOLFOX ou CAPOX, respectivamente) (81).

Em relação à doença metastática, a investigação de dMMR/MSI define a elegibilidade do paciente à imunoterapia (82). Todavia, a dMMR neste cenário é de somente 4% (71,83). Diferentemente da doença inicial, a dMMR na doença avançada é um fator independente de pior prognóstico, uma vez que este fenótipo molecular é também frequentemente acompanhado da mutação $BRAF^{V600E}$ em até 35% dos pacientes (84). O tempo médio de sobrevida para paciente com este subtipo de CCR é de cerca de 10 meses *versus* 18 meses dos pacientes com MMR proficiente (71). Mesmo assim, para uma parcela dos pacientes com MMR proficiente, mas sem mutações oncogênicas com alvo terapêutico estabelecido, a terapia sistêmica na doença avançada resume-se aos regimes quimioterápicos (25).

1.3.2 Reparo de quebras duplas do DNA

A quimioterapia e a radioterapia são duas estratégias terapêuticas baseadas na indução de morte das células tumorais através da indução de níveis de danos ao DNA tão elevados que resultem na perturbação irreversível da integridade celular. Os agentes que danificam o DNA e, particularmente os que causam quebras duplas (DSB, do inglês: *Double Strand Breaks*) são frequentemente explorados no tratamento do câncer, estas lesões são consideradas as mais tóxicas para a célula. A presença de DSB não reparadas está associada à geração de uma elevada instabilidade genômica com consequente morte celular na ausência de mecanismos de reparo funcional. Estas lesões são reparadas especialmente por duas vias, HRR e NHEJ (85).

Estas duas vias são coordenadas de maneira ciclo celular dependente. NHEJ opera na maioria das fases do ciclo celular exibindo maior taxa de atividades em G1. NHEJ une diretamente as pontas do DNA sem necessidade de homologia. Já HR necessita do modelo de homologia para realizar o reparo e, portanto, só está ativo em S e G2 quando a cromátide-irmã está disponível (86). Ao contrário de NHEJ, HRR é uma via conservativa que utiliza a cromátide-irmã intacta como modelo e, portanto, reconstitui a sequência de DNA sem perda de material genético. HRR se inicia, em S e G2, quando o complexo MRN reconhece a DSB e se liga a ela protegendo-a, este complexo é formado pelas proteínas MRE11-RAD50-NBS1 (86). A ressecção das pontas de DNA por MRE11 é dependente de CtIP e é catalisada por BRCA1, que promove a remoção de 53BP1, uma proteína que bloqueia a ressecção de DSBs e, assim, facilita NHEJ. Imediatamente após a ressecção as pontas de DNA em fita simples são protegidas por RPA que irá recrutar BRCA2 que irá substituir RPA pela recombinase RAD51. Esta substituição é promovida por mediadores como XRCC2, XRCC3 e RAD52 (87). Em seguida, RAD51 irá formar um filamento de nucleoproteína que invade a cromátide-irmã e encontra a sequência de homologia do DNA que serve de modelo para a síntese de novo DNA. Neste local se formará um D-loop transiente que funciona como uma forquilha de replicação transiente, permitindo a maquinaria de replicação substituir o DNA danificado/ressecado e maneira livre de erros (61,87).

Em NHEJ, o complexo Ku70/80 protege as pontas do DNA de processamento por nucleases e age recrutando as demais proteínas necessárias para o reparo. O primeiro passo de NHEJ é a ligação do dímero ku70/80 nas pontas quebradas do DNA protegendo-as de maior ressecção. A prevenção da ressecção é crucial para NHEJ e para a proteína sensora de dano ao DNA 53BP1 e seus efetores que agem junto a Ku70/80 (61). O heterodímero Ku age como uma plataforma de recrutamento para as demais proteínas de NHEJ, DNA-PKs e a nuclease Artemis se ligam a ele. Uma vez ligada ao complexo Ku-DNA, DNA-PKs ativa através de autofosforilação e ativa, através de fosforilação a nuclease Artemis que irá processar as pontas do DNA. Após este processamento, iniciasse o passo de síntese de DNA para emparelhar as fitas. Este passo é realizado por uma DNA polimerase da família X (DNA polimerase λ/μ). Em seguida, a ligação do DNA é realizada pelo complexo ligase IV-XRCC4-XLF. A ligase IV é a única ligase envolvida em NHEJ, ela é capaz de realizar a ligação das pontas de DNA sozinha se as pontas forem compatíveis, com a presença de XRCC4 ela consegue realizar a ligação de pontas com 2 nucleotídeos de microhomologia (88).

A resposta celular à formação das DSB envolve três etapas principais para permitir o reparo do DNA: o reconhecimento da lesão por proteínas sensoras (complexo MRN e Ku); a amplificação do sinal de lesão de DNA por proteínas transdutoras (ATM, ATR, DNA-PKcs) e a ativação do checkpoint do ciclo celular por proteínas quinase efetoras (CHK1, CHK2) (89). A estratégia utilizada em resposta às DSB é dependente do momento do ciclo celular, e são esperadas respostas celulares distintas em relação à sinalização do dano e à ativação das vias de reparo de DNA. A escolha da via é regulada pela fosforilação de 53BP1, a qual, por sua vez, é regulada pelo ciclo celular. Na fase G1, 53BP1 é fosforilada por ATM e leva a célula ao reparo por NHEJ. Nas fases S e G2, os níveis de BRCA1 aumentam e previnem a fosforilação 53BP1, tornando o HRR a via principal (90).

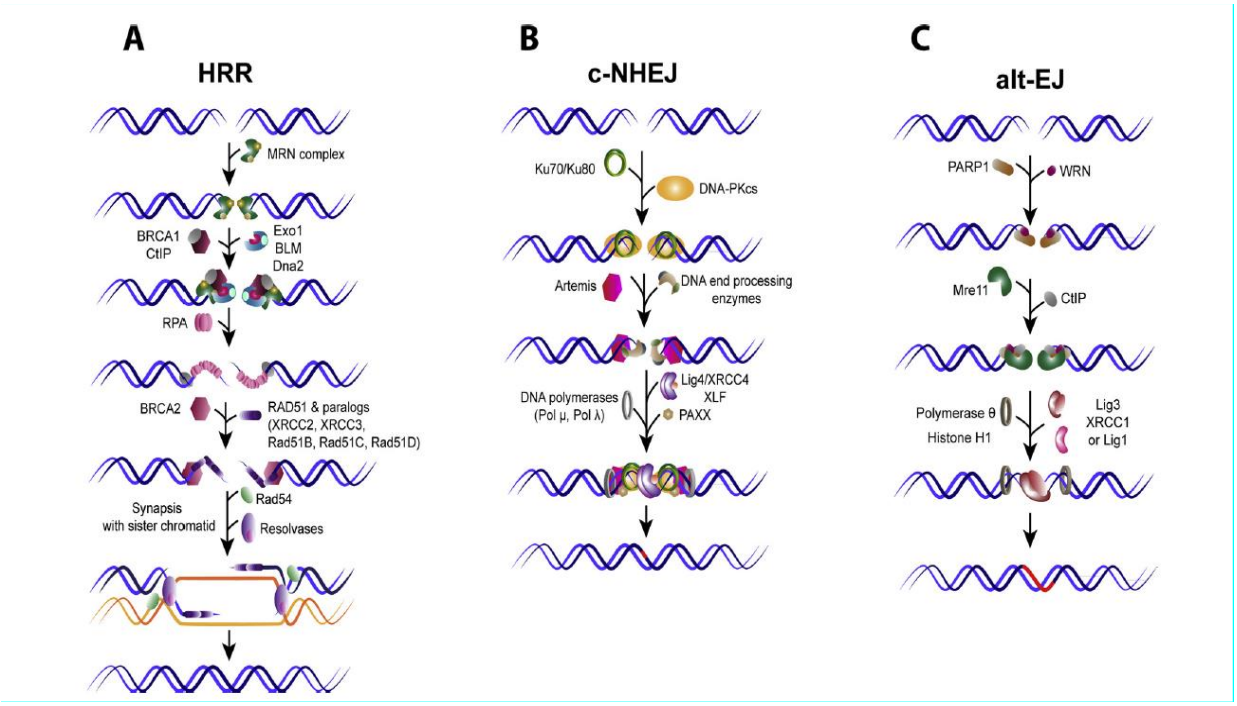


Figura 7: Mecanismos de reparo de quebras duplas do DNA. A. Reparo por recombinação homóloga, HRR. B. Reparo por junção de extremidades não-homólogas, cNHEJ. C. Reparo por junção alternativa de extremidades, alt-EJ, também conhecido como reparo por microhomologia, MMEJ (91).

Diversos tumores, sejam de origem hereditária ou somática, apresentam deficiências na via de HRR, que é a principal via de reparo livre de erros envolvida no reparo de DSB nas fases S e G2 do ciclo celular e na reativação das forquilhas de replicação bloqueadas (92). A deficiência de reparo do DNA por recombinação homóloga (HRD, do inglês: *Homologous Repair Deficiency*) é classicamente descrita em tumores com mutações germinativa em BRCA1/2, como mama e ovário (93). Nesses tumores, a HRD confere maior sensibilidade aos agentes alquilantes ou à base de platina como resultado da geração de DSB não processadas e altamente tóxicas. Além disso, os tumores sem BRCA1/2 funcional são sensíveis aos inibidores da poli ADP-ribose polimerase 1 (PARPi) (94). Embora estes agentes sejam seletivamente ativos em um subconjunto de tumores que possuem mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* devido à letalidade sintética da inibição de PARP, tem-se descrito que esta abordagem pode ser eficaz também em tumores com BRCA1/2 selvagem (95,96). O racional biológico sugerido para esse efeito é que o fenótipo de HRD também pode ocorrer após a

inativação genética e epigenética de outros componentes da via HRR em tumores esporádicos, configurando a chamada assinatura *BRCAness*, ou seja, HRD sem mutações sem perda de função de BRCA1/2 (97).

Recentemente, sugeriu-se que um subconjunto de pacientes com CCR (6-15%) possui mutações nos genes desta via, incluindo *ATM*, *BRCA1/2*, *MRE11A*, *FANCC*, *NBN*, *PALB2* (96,98,99). Dados recuperados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e de outros bancos públicos de dados mostraram que genes críticos para HRR, como *ATM*, *BRCA1* e *BRCA2*, são somaticamente mutados em mais de 20% do CRC (96). Além disso, viu-se que 8,7% dos tumores colorretais apresentam mutações não silenciosas em regiões codificadoras de genes concomitantemente nas vias HRR e BER ou HRR e MMR (100). Mais recentemente, foi descrito que pacientes com metástases cerebrais de tumores colorretais primários exibem assinaturas mutacionais de HRD devido a mutações em *BRCA1, BRCA2*, *RAD51B* e *PAXIP1* (101). Dados de um estudo recente envolvendo pacientes com CRC em estágio III tratados com regimes à base de oxaliplatina descreveram presença de aquisição de mutações somáticas em *ATM* ou *BRCA2* em 13,8% e 22,2%, respectivamente (102). A presença destas mutações foi associada à melhor sobrevida livre de recorrência. Em outro estudo, também foi sugerida uma dependência de CRC no reparo de HR, uma vez que foi encontrado um aumento nos níveis de expressão das proteínas RAD51 e BRCA2 na biópsia de CRC em comparação com biópsias de mucosa normal (103).

Já RAD51 é frequentemente superexpresso em tumores e tem sido associado a pior prognóstico em pacientes com tumores sólidos, podendo, assim, agir como um importante ativador das alterações em HR (104). Novas evidências tem indicado que RAD51 não apenas está envolvida na progressão da carcinogênese, mas também faz parte da resistência a tratamentos anticâncer (105,106). O tratamento de leucemia, câncer de próstata, câncer pancreático, câncer de pulmão e gliomas com imatinib pode diminuir a expressão de RAD51 e sensibilizá-los a quimioterapia e radioterapia experimental in vitro e in vivo (106,107). Estudos recentes identificaram que a replicação prejudicada e a sinalização de CHK1 em fase S mediada por RAD51 levam a maior instabilidade genômica e assim promovem a tumorigênese (104).

A superexpressão da proteína RAD51 já foi observada em pacientes com cânceres de próstata, pâncreas, mama e pulmão (108–112). Em um estudo recente, 100 de 340 pacientes estudados (29,4%) com câncer de pulmão não-pequenas células apresentaram uma alta expressão de RAD51, o que foi associado a um tempo médio de sobrevida significativamente menor, de 19 versus 68 meses (111). A expressão de RAD51 foi um fator prognostico independente nesse estudo de acordo com análise multivariada. Em outro estudo, observou-se correlação entre a expressão proteica de RAD51 e a sobrevida global em pacientes com CCR. Sobrevida global de 11 meses para pacientes com alta expressão de RAD51, 46 meses para expressão moderada, 76 meses para expressão fraca e 68 meses para RAD51 indetectável. Análise multivariada revelou que a expressão proteica de RAD51 foi um fator prognóstico independente junto ao estadiamento do tumor e ao status linfonodal (113). Por outro lado, um estudo observou que baixa expressão nuclear de RAD51 foi associada a um aumento de risco local de recorrência em pacientes com câncer de mama em estágios iniciais, enquanto a baixa expressão do complexo BRCA1/BRCA2/RAD51 foi associada a uma melhora na reposta a radioterapia local (114).

O dímero Ku70/80 faz parte do primeiro passo de NHEJ, foi observado que a expressão de ambos os genes está diminuída em estádio pT em pacientes com tumores colorretais. Diferenças significativas na expressão de Ku70 e Ku80 foram encontradas entre tumores pT3 e pT4, assim como entre tumores pT2 e pT3. Além disso, perda de Ku70/80 foi observada com maior frequência em tumores hereditários do que em tumores esporádicos (115). Já em carcinomas da cavidade oral, a expressão de Ku70 foi encontrada em 87,5% dos tumores de estadio 1 e 3, e em 82,9% em estadio 2. A presença de Ku80 foi encontrada em 87,5% de tumores de estádio 1, 82,9% em estádio 2 e em todos os tumores em estadio 3 (116). Em carcinomas de bexiga, observou-se que tumores com alo estadiamento e alta diferenciação expressão Ku70 e Ku80 em níveis mais baixos do que tumores em estadiamento inicial, sugerindo que a baixa regulação do dímero de Ku está associada a progressão do câncer de bexiga de baixo para alto potencial de malignidade (117). Além disso, um estudo recente observou que XRCC5 foi eficiente em aumentar a citotoxicidade de temozolomida em glioblastoma. As análises revelaram que os níveis de expressão de XRCC5/Ku80 foram associados a

deterioração clínica e pior sobrevida global. Adicionalmente, um modelo com knockdown em XRCC5/Ku80 aumentou significativamente a sensibilidade a temozolomida em células de glioblastoma, enquanto a superexpressão de XRCC5/Ku80 levou as células a resistência a esta droga (118).

2 JUSTIFICATIVA

A principal causa de morte por CCR é a doença metastática. Apesar do tratamento cirúrgico e sistêmico ideal, entre 30 e 50% dos pacientes com CCR nos estágios II e III desenvolverão doença metastática no fígado. Apesar de ser o padrão-ouro no tratamento de metástases hepáticas, a ressecção cirúrgica de MHCCR é curativa em apenas 20-30% dos pacientes.

Graças aos avanços nas técnicas cirúrgicas e na terapia sistêmica pré-operatória, o número de pacientes elegíveis à hepatectomia para tratamento das MHCCR aumentou. Embora os efeitos desta evolução terapêutica resultem em maiores tempos de sobrevida livre de progressão da doença, possuem benefício limitado em relação à sobrevida global destes pacientes. Um dos principais motivos é que cerca de 70% apresentarão recidiva, sendo a maioria em até 2 anos após a cirurgia. A identificação de pacientes com maior risco de recorrência após a hepatectomia é uma necessidade clínica não atendida. Desde o fim dos anos 90, muitos estudos buscam desenvolver escores de risco e nomogramas que auxiliem na predição deste risco. Contudo, como estes escores são majoritariamente baseados em fatores clinicopatológicos, a heterogeneidade nos desfechos entre os estudos dificulta a validação e a incorporação destas ferramentas. Esta dificuldade é, possivelmente, associada ao comportamento biológico heterogêneo destes tumores e da ausência de biomarcadores incorporados nestes escores.

Alterações na resposta a danos e no de reparo de lesões no DNA estão diretamente envolvidas com a carcinogênese e a resposta ao tratamento. Características comuns aos tumores, como altos níveis de estresse oxidativo, estresse replicativo e atuação insuficiente dos *checkpoints* de ciclo celular induzidos por danos no DNA, contribuem para um ambiente rico para desenvolvimento da instabilidade genômica. Além disto, a perda funcional de uma ou mais vias de reparo do DNA é comum em tumores. Embora apenas uma minoria destas alterações possa ser responsável pela condução do fenótipo do tumor, o panorama geral das alterações do DNA fornece informações importantes sobre a exposição ao dano no DNA do tumor e capacidade de reparo, e pode conferir ao tumor e ao microambiente propriedades únicas que têm o

potencial para ser explorado terapeuticamente. Agentes que danificam o DNA e, mais recentemente, inibidores de PARP e a imunoterapia são exemplos práticos da importância dos sistemas de reparo do DNA na oncologia. Outros exemplos são os marcadores preditivos baseados nestes sistemas com aplicabilidade clínica, como mutações em BRCA1/2, mutação em *MGMT* e deficiências no reparo de malpareamento.

Embora tenham sido realizadas extensas investigações sobre os subtipos moleculares de cânceres humanos primários, pouco se sabe sobre os subtipos moleculares de metástase e sua relação com os resultados clínicos. A análise genômica integrativa através de bancos de dados públicos tem revelado que o câncer colorretal geralmente começa a partir de lesões benignas, e o acúmulo de danos no DNA leva à progressão do câncer para formas mais metastáticas e invasivas. No entanto, a identificação das vias envolvidas, os seus fenótipos moleculares e as suas implicações clínicas em relação à da sensibilidade à quimioterapia pré-operatória e ao prognóstico pós-operatório de pacientes com MHCCR ainda não foram sistematicamente exploradas. Portanto, através deste estudo, objetivamos investigar a existência de alterações na via de reparo de quebras duplas do DNA em pacientes com MHCCR submetidos à ressecção hepática e suas associações com o prognóstico.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a influência da expressão de componentes das vias de reparo do DNA por reparo de quebra duplas, em amostras normais e tumorais em pacientes com metástase hepática de câncer colorretal relacionando com aspectos clínicos.

3.2 Específicos

- Avaliar a expressão gênica de *BRCA1*, *RAD51* e *XRCC5* em metástases hepáticas de câncer colorretal e tecido hepático saudável pareado;
- Avaliar o status da via MMR através da expressão proteica de MLH1 e MSH6 em metástases hepáticas secundárias ao câncer colorretal;
- Avaliar a expressão proteica de XRCC5 (Ku80) em metástases hepáticas de câncer colorretal;
- Associar as variáveis moleculares às características clínicas dos pacientes;
- Investigar o valor prognóstico das alterações moleculares em relação à sobrevida global e sobrevida livre de progressão dos pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal.

4 REFERÊNCIAS

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. INCA. Ministério da Saúde. Estimativa 2020 Incidência de câncer no Brasil. 2020.
3. Yang J, Du XL, Li S, Wu Y, Lv M, Dong D, et al. The risk and survival outcome of subsequent primary colorectal cancer after the first primary colorectal cancer : cases from 1973 to 2012. BMC Cancer. 2017;1–9.
4. Siegel RL, Miller KD. Cancer Statistics, 2020. CA Cancer J Clin. 2020;70(1):7-30.
5. Ijspeert JEG, Rana SAQ, Atkinson NSS, Van Herwaarden YJ, Bastiaansen BAJ, Van Leerdam ME, et al. Clinical risk factors of colorectal cancer in patients with serrated polyposis syndrome: A multicentre cohort analysis. Gut. 2017;66(2):278–84.
6. Jahani-Sherafat S, Alebouyeh M, Moghim S, Amoli HA, Ghasemian-Safaei H. Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench. Role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer; a review article. Hepatol Bed Bench. 2018;11(2):101–9.
7. Rossi M, Anwar MJ, Bishehsari F. Colorectal Cancer and Alcohol Consumption — Populations to Molecules. Cancer (Basel) 2018; 10 (2): 38.
8. Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. Clin Colon Rectal Surg. 2009;22(4):191–7.
9. Shaw E, Farris MS, Stone CR, Derksen JWG, Johnson R, Hilsden RJ, et al. Effects of physical activity on colorectal cancer risk among family history and body mass index subgroups : a systematic review and meta-analysis. BMC Cancer. 2018;1–15.
10. Caini S, Bagnoli S, Palli D, Saieva C, Ceroti M, Bendinelli B, et al. Total and cancer

mortality in a cohort of ulcerative colitis and Crohn's disease patients: The Florence inflammatory bowel disease study, 1978–2010. Dig Liver Dis. 2016;48(10):1162–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2016.07.008

11. Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. Cancer Lett . 2013; 345 (2):235-41. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.032
12. Mármol I, Sánchez-de-diego C, Dieste AP, Cerrada E, Jesús M, Yoldi R. Colorectal Carcinoma : A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2017; 18(1):197.
13. Al-Sukhni W, Aronson M, Gallinger S. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes: Familial Adenomatous Polyposis and Lynch Syndrome. Surg Clin North Am. 2008;88(4):819–44.
14. Falzone L, Scola L, Zanghì A, Biondi A, Di Cataldo A, Libra M, et al. Integrated analysis of colorectal cancer microRNA datasets: Identification of microRNAs associated with tumor development. Aging (Albany NY). 2018;10(5):1000–14.
15. Testa U, Pelosi E, Casteli G. Colorectal Cancer:Genetic Abnormalities , Tumor Progression , Tumor Heterogeneity , Clonal Evolution. Med Sci. 2018;6(31).
16. Nguyen HT, Duong HQ. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (review). Oncol Lett. 2018;16(1):9–18.
17. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. Int J Mol Sci. 2013;14(8):16365–85.
18. Markowitz S, Bertagnolli M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. N Engl J Med. 2009;361(25):2449–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2843693/pdf/nihms-177087.pdf
19. Nieuwenhuis MH, Vasen HFA. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature. Crit Rev Oncol Hematol. 2007;61:153–61.
20. Nordholm-carstensen A, Krarup P, Morton D. Mismatch repair status and synchronous metastases in colorectal cancer : A nationwide cohort study. Int J Cancer. 2015;2148:2139–48.
21. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk

factors and prevention strategies. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2019; Dec;16(12):713-732. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8

22. Fujiyoshi K, Yamamoto G, Takenoya T, Takahashi A, Arai Y, Yamada M, et al. Metastatic Pattern of Stage IV Colorectal Cancer with High-Frequency Microsatellite Instability as a Prognostic Factor. Anticancer Res. 2017;37(1):239–47.
23. Snover DC. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. Hum Pathol. 2011;42(1):1–10. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2010.06.002
24. Weiser MR. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. Ann Surg Oncol. 2018;25(6):1454–5. Available from: https://doi.org/10.1245/s10434-018-6462-1
25. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist L, Chen YJ, Ciombor KK, et al. NCCN Guidelines ® Insights Colon Cancer, Version 2.2018 Featured Updates to the NCCN Guidelines. JNCCN J Natl Compr Cancer Netw. 2018;16(4):359–69.
26. Zarour LR, Anand S, Billingsley KG, Bisson WH, Cercek A, Clarke MF, et al. Colorectal Cancer Liver Metastasis: Evolving Paradigms and Future Directions. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2017;3(2):163–73. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.01.006
27. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer : systematic review and meta-analysis. Br J Cancer. 2014;(February):1595–605.
28. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, Thomé SD, Alberts SR, Haller DG, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: Who benefits and by how much? J Clin Oncol. 2004;22(10):1797–806.
29. Cassidy J, Saltz L, Twelves C, Van cutsem E, Hoff P, Kang Y, et al. Efficacy of capecitabine versus 5-fluorouracil in colorectal and gastric cancers: A meta-analysis of individual data from 6171 patients. Ann Oncol. 2011;22(12):2604–9.
30. Twelves C, Scheithauer W, Mckendrick J, Seitz J, Hazel G Van, Wong A, 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. Ann Oncol. 2011; 23(5):1190-1197.
31. Fuchs C, Mitchell EP, Hoff PM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer.

Cancer Treat Rev. 2006;32(7):491–503.

32. Legolvan MP, Resnick M. Pathobiology of colorectal cancer hepatic metastases with an emphasis on prognostic factors. J Surg Oncol. 2010;102(8):898–908.
33. Zhang R, Ma W, Gu Y, Zhang T, Huang Z, Lu Z. Primary tumor location as a predictor of the benefit of palliative resection for colorectal cancer with unresectable metastasis. Worls J Surg Oncol. 2017;15(1):138.
34. Brodt P. Role of the microenvironment in liver metastasis: From pre- to prometastatic niches. Clin Cancer Res. 2016;22(24):5971–82.
35. Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-silva B, Hoshino A, Rodrigues G, et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. Nat Publ Gr. 2017; 17(5):302-317. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.6
36. Pretzsch E, Neumann J, Ganschow P, Bazhin A, Guba M, Werner J, et al. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism : Hematogenous versus Peritoneal Spread. J Oncol. 2019;7407190.
37. Paget S. The Distribuition of Secondary growths in cancer of the breast. Lancet. 1888;571–3.
38. Eynden GG Van Den, Majeed AW, Illemann M, Vermeulen PB, Bird NC, Høyer-hansen G, et al. The Multifaceted Role of the Microenvironment in Liver Metastasis : Biology and Clinical Implications. Cancer Res. 2013;2031–44.
39. Sasaki K, Margonis GA, Wilson A, Kim Y, Buettner S, Andreatos N, et al. Prognostic Implication of KRAS Status after Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases Varies According to Primary Colorectal Tumor Location. Ann Surg Oncol. 2016;23(11):3736–43.
40. Dhir M, Lyden ER, Wang A, Smith LM, Ullrich F, Are C. Influence of margins on overall survival after hepatic resection for colorectal metastasis: A meta-analysis. Ann Surg. 2011;254(2):234–42.
41. Slesser AAP, Georgiou P, Brown G, Mudan S, Goldin R, Tekkis P. The tumour biology of synchronous and metachronous colorectal liver metastases : a systematic review. Clin Exp Metastasis. 2013;457–70.
42. Gregoire E, Hoti E, Gorden DL, de la Serna S, Pascal G, Azoulay D. Utility or futility of prognostic scoring systems for colorectal liver metastases in an era of advanced

multimodal therapy. Eur J Surg Oncol. 2010;36(6):568–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2010.03.009

43. Zakaria S, Donohue JH, Que FG, Farnell MB. Hepatic Resection for Colorectal Metastases Value for Risk Scoring Systems? Ann Surg. 2007;246(2):183–91.
44. Spolverato G, Ejaz A, Azad N, Pawlik TM. Surgery for colorectal liver metastases : The evolution of determining prognosis. World J Gastrointest Oncol. 2013;5(12):207–21.
45. Cucchetti A, Ferrero A, Cescon M, Donadon M, Russolillo N, Ercolani G, et al. Cure Model Survival Analysis After Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastases. Ann Surg Oncol. 2015;22(6):1908–14.
46. Yamashita S, Venkatesan AM, Mizuno T, Aloia TA, Chun YS, Lee JE, et al. Remnant liver ischemia as a prognostic factor for cancer-specific Survival after resection of colorectal liver metastases. JAMA Surg. 2017;152(10):1–12.
47. Valderrama-treviño AI, Valderrama-treviño AI, Barrera-mera B, Ceballos-villalva JC, Montalvo-javé EE. Hepatic Metastasis from Colorectal Cancer. Euroasian J Heparogastroenterol. 2013;166–75.
48. Mcauliffe JC, Qadan M, Angelica MID. Hepatic resection , hepatic arterial infusion pump therapy , and genetic biomarkers in the management of hepatic metastases from colorectal cancer. J Gastrointest Oncol. 2015;6(6):699–708.
49. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: Updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. Lancet Oncol. 2015;16(13):1306–15. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00122-9
50. Brudvik KW, Kopetz SE, Li L, Conrad C, Aloia TA, Vauthey JN. Meta-analysis of KRAS mutations and survival after resection of colorectal liver metastases. Br J Surg. 2015;102(10):1175–83.
51. Seeberg LT, Brunborg C, Renolen A, Brudvik KW, Wiedswang G. Circulating Tumor Cells in Patients With Colorectal Liver. Ann Surg. 2014;261(1):164-71.
52. El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M,

et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. Clin Cancer Res. 2016;22(12):3067–77.

53. Wong NACS, Gonzalez D, Salto-tellez M, Butler R, Diaz-cano SJ, Ilyas M, et al. RAS testing of colorectal carcinoma — a guidance document from the Association of Clinical Pathologists Molecular Pathology and Diagnostics Group. J Clin Pathol. 2014; 67(9):751-7.
54. Wang Z, Zhao J, Wang G, Zhang F, Zhang Z, Zhang F, et al. Comutations in DNA damage response pathways serve as potential biomarkers for immune checkpoint blockade. Cancer Res. 2018;78(22):6486–96.
55. Lord C. The DNA damage response and cancer therapy. Nature. 2012;481(7381):287–94.
56. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. Environ Mol Mutagen. 2017;58(5):235–63.
57. Knijnenburg TA, Wang L, Zimmermann MT, Chambwe N, Gao GF, Cherniack AD, et al. Genomic and Molecular Landscape of DNA Damage Repair Deficiency across The Cancer Genome Atlas. Cell Rep. 2018;23(1):239-254.e6.
58. Genois M, Paquet ER, Laffitte MN, Maity R, Ouellette M, Masson J. DNA Repair Pathways in Trypanosomatids : from DNA Repair to drug resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2014;78(1):40–73.
59. Jiang M, Jia K, Wang L, Li W, Chen B, Liu Y, et al. Alterations of DNA damage repair in cancer : from mechanisms to applications. Ann Transl Med. 2020;8(24).
60. Costa L, Almeida D, Antunes F, Machado-neto JA, Costa-lotufo LV. DNA damaging agents and DNA repair : From carcinogenesis to cancer therapy. Cancer Genet. 2021;252–253:6–24. Available from: https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2020.12.002
61. Cleary JM, Aguirre AJ, Shapiro GI, Andrea ADD. Biomarker-Guided Development of DNA Repair Inhibitors. Mol Cell. 2020;1–16. Available from: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.035
62. Farmer H, McCabe H, Lord CJ, Tutt AHJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.

Nature. 2005;434(7035):917–21.

63. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, De Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):997–1003.
64. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. Science. 2003;302(5645):643–6.
65. Scott CL, Swisher EM, Kaufmann SH. Poly (ADP-Ribose) polymerase inhibitors: Recent advances and future development. J Clin Oncol. 2015;33(12):1397–406.
66. Mouw KW, Goldberg MS, Konstantinopoulos PA, D'Andrea AD. DNA damage and repair biomarkers of immunotherapy response. Cancer Discov. 2017;7(7):675–93.
67. Reilly NM, Novara L, Di Nicolantonio F, Bardelli A. Exploiting DNA repair defects in colorectal cancer. Mol Oncol. 2019;13(4):681–700.
68. Pećina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. Front Mol Biosci. 2020;7(June):1–12.
69. Hewish M, Lord CJ, Martin S a, Cunningham D, Ashworth A. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. Nat Rev Clin Oncol. 2010;7(4):197–208. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.18
70. Liu D, Keijzers G, Rasmussen LJ. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. Mutat Res Mutat Res. 2017; Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.07.001
71. Koopman M, Kortman GAM, Mekenkamp L, Ligtenberg MJL, Hoogerbrugge N, Antonini NF, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. Br J Cancer. 2009;100(2):266–73.
72. 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.
73. Lindor BNM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Testing in Phenotyping Colorectal Tumors. J Clin Oncol. 2002;20(4):1043–8.
74. Evrard C, Tachon G, Randrian V, Karayan-Tapon L, Tougeron D. Microsatellite

instability: Diagnosis, heterogeneity, discordance, and clinical impact in colorectal cancer. Cancers (Basel). 2019;11(10):1–25.

75. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Maby P, Angelova M, Tougeron D, et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. Immunity. 2016;44(3):698–711.
76. Hou JT, Zhao LN, Zhang DJ, Lv DY, He WL, Chen B, et al. Prognostic value of mismatch repair genes for patients with colorectal cancer: Meta-analysis. Technol Cancer Res Treat. 2018;17:1–11.
77. Jin Z, Sinicrope FA. Prognostic and predictive values of mismatch repair deficiency in non-metastatic colorectal cancer. Cancers (Basel). 2021;13(2):1–16.
78. Wyatt MD, Wilson IIIi DM. Participation of DNA repair in response to 5-fluorouracil. Cell Mol Life Sci. 2009;66(5):788–99.
79. Kim JE, Hong YS, Kim HJ, Kim K pyo, Lee JL, Park SJ, et al. Defective Mismatch Repair Status was not Associated with DFS and OS in Stage II Colon Cancer Treated with Adjuvant Chemotherapy. Ann Surg Oncol. 2015;22:630–7.
80. Hutchins G, Southward K, Handley K, Magill L, Beaumont C, Stahlschmidt J, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2011;29(10):1261–70.
81. 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. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.171
82. Lee V, Murphy A, Le DT, Diaz LA. Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade. Oncologist. 2016;21(10):1200–11.
83. Alvarado-Bachmann R, Smith A, Gundara JS, Kuo SCL, Gill AJ, Samra JS, et al. The incidence of mismatch repair gene defects in colorectal liver metastases. Mol Med Rep. 2014;10(2):1003–6.
84. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: A pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies.

Clin Cancer Res. 2014;20(20):5322–30.

85. Fong YW, Cattoglio C, Tjian R. The Intertwined Roles of Transcription and Repair Proteins. Mol Cell. 2013;52(3):291–302. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.018
86. Li J, Sun H, Huang Y, Wang Y, Liu Y, Chen X. Pathways and assays for DNA double-strand break repair by homologous recombination. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2019;6;51(9): 879-889.
87. Ali RMM, McIntosh SA, Savage KI. Homologous Recombinaion Deficiency in breast cancer: implications for risk, cancer development and therapy. Genes Chromosom Cancer. 2020;60:358–72.
88. Ghosh D, Raghavan SC. Nonhomologous end joining : new accessory factors fi ne tune the machinery. Trends Genet. 2021;37(6):582–99. Available from: https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.03.001
89. Kantidze OL, Velichko AK, Luzhin A V, Petrova N V, Razin S V. Synthetically Lethal Interactions of ATM ,. TRENDS in CANCER. 2018;xx:1–14. Available from: https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.09.007
90. Feng L, Li N, Li Y, Wang J, Gao M, Wang W, et al. Cell cycle-dependent inhibition of 53BP1 signaling by BRCA1. Nat Publ Gr. 2015;1–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/celldisc.2015.19
91. Iliakis G, Murmann T, Soni A. Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen. 2015;1–10. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.07.001
92. Bianco JN, Bergoglio V, Lin Y, Pillaire M, Schmitz A, Gilhodes J, et al. Overexpression of Claspin and Timeless protects independent manner. Nat Commun. 2019; 10 (1):910. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08886-8
93. Chartron E, Theillet C, Guiu S, Jacot W. Targeting homologous repair deficiency in breast and ovarian cancers: biological pathways, preclinical and clinical data. Crit Rev Oncol / Hematol. 2019; 133:58-73. Available from:

https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.10.012

94. Faraoni I, Graziani G. Role of BRCA Mutations in Cancer Treatment with. Cancers (Basel). 2018;10(487).
95. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. Nature. 2005;434(7035):913–7.
96. Muzny DM., Bainbridge MN., Chang, K.; Dinh, H.H.; Drummond JA., Fowler G., Kovar, C.L.; Lewis, L.R.; Morgan MB., Newsham I. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2012;487(7407):330–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature11252
97. Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. Nat Publ Gr. 2016;1–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2015.21
98. Randon G, Fucà G, Rossini D, Raimondi A, Pagani F, Perrone F, et al. Prognostic impact of ATM mutations in patients with metastatic colorectal cancer. Sci Rep. 2019;(October 2018):1–7.
99. Heeke AL, Pishvaian MJ, Brody JR, Chen W, Marshall JL. Prevalence of Homologous Recombination – Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types abstract. Am Soc Clin Oncol Educ B. 2018;1–13.
100. Wang Z, Zhao J, Wang G, Zhang F, Zhang Z, Zhang F, et al. Comutations in DNA damage response pathways serve as potential biomarkers for immune checkpoint blockade. Cancer Res. 2018;78(22):6486–96.
101. Sun J, Wang C, Zhang Y, Xu L, Fang W, Zhu Y, et al. Genomic signatures reveal DNA damage response de fi ciency in colorectal cancer brain metastases. Nat Commun. 2019;18–20. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10987-3
102. Lin P, Yeh Y, Chan R, Lin B, Chen P, Pan C. Sequential and co-occurring DNA damage response genetic mutations impact survival in stage III colorectal cancer patients receiving adjuvant oxaliplatin-based chemotherapy. BMC Cancer. 2021;1–11.
103. 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).

104. Gachechiladze M. RAD51 as a potential surrogate marker for DNA repair capacity in solid malignancies. Int J Cancer. 2017;1294(M):1286–94.
105. Hong K, Hsu M, Hung W. RECK impedes DNA repair by inhibiting the erbB / JAB1 / Rad51 signaling axis and enhances chemosensitivity of breast cancer cells. Am J Cancer Res. 2015;5(8):2422–30.
106. Choudhury A, Zhao H, Jalali F, Rashid SAL, Ran J, Supiot S, et al. Targeting homologous recombination using imatinib results in enhanced tumor cell chemosensitivity and radiosensitivity. Mol Cancer Ther. 2009;8(January):203–14.
107. Kubler HR, Randenborgh H Van, Treiber U, Wutzler S, Battistel C, Lehmer A, et al. InVitro Cytotoxic Effects of Imatinib in Combination With Anticancer Drugs in Human Prostate Cancer Cell Lines. Prostate. 2005;394(April 2004).
108. 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. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.02.015
109. Mitra A, Jameson C, Barbachano Y, Sanchez L, Kote- Z, Peock S, et al. Over-expression of RAD51 occurs in aggressive prostate cancer. Histopathology. 2010;55(6):696–704.
110. Maacke H, Jost K, Opitz S, Miska S, Yuan Y, Hasselbach L, et al. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. Oncogene. 2000;2791–5.
111. Qiao G, Wu Y, Yang X, Zhong W, Xie D, Guan X, et al. High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. Br journal cancer. 2005;(June):137–43.
112. Maacke H, Opitz S, Jost K, Hamdorf W, Henning W, Kruger S. Overexpression of wild-type RAD51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. Int J Cancer. 2000;913:907–13.
113. Tennstedt P, Fresow R, Simon R, Marx A, Terracciano L, Petersen C, et al. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. Int J cancer. 2013;2126:2118–26.

114. Söderlund K, Skoog L, Fornander T, Askmalm MS. The BRCA1 / BRCA2 / Rad51 complex is a prognostic and predictive factor in early breast cancer Karin So. Radiother Oncol. 2007;84:242–51.
115. Korabiowska M, Cordon-cardo C. Loss of Ku70 / Ku80 expression occurs more frequently in hereditary than in sporadic colorectal tumors . Tissue microarray study. Hum Pathol. 2006;448–52.
116. Korabiowska M, Voltmann J, Hönig JF, Bortkiewicz P, König F, Cordon-cardo C, et al. Altered Expression of DNA Double-strand Repair Genes Ku70 and Ku80 in Carcinomas of the Oral Cavity. Anticancer Res. 2006;2106:2101–5.
117. Korabiowska M, Quentin ÆT. Down-regulation of Ku 70 and Ku 80 mRNA expression in transitional cell carcinomas of the urinary bladder related to tumor progression. World J Urol. 2004;431–40.
118. Lee IN, Yang JENT, Huang C, Huang HC, Wu YUP, Chen JUIC. Elevated XRCC5 expression level can promote temozolomide resistance and predict poor prognosis in glioblastoma. Oncol Lett. 2021;1–11.
119. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. Ann Surg. 2006;244(2):254–9.
120. Platell CFE. Changing patterns of recurrence after treatment for colorectal cancer. Int J Color Dis. 2007;22:1223–31.
121. Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, Langeberg WJ, Kelsh MA, Mowat FS, et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: Review and meta-analysis of prognostic factors. Clin Epidemiol. 2012;4(1):283–301.
122. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical Score for Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer. Ann Surg. 1999;230(3):309.
123. De Jong MC, Pulitano C, Ribero D, Strub J, Mentha G, Schulick RD, et al. Rates and patterns of recurrence following curative intent surgery for colorectal liver metastasis: An international multi-institutional analysis of 1669 patients. Ann Surg. 2009;250(3):440–7.
124. Spelt L, Andersson B, Nilsson J, Andersson R. Prognostic models for outcome

following liver resection for colorectal cancer metastases : A systematic review. Eur J Surg Oncol. 2012;38(1):16–24. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2011.10.013

125. Bronte G, Rolfo C, Peeters M, Russo A. How to find the Ariadne ' s thread in the labyrinth of salvage treatment options for metastatic colorectal cancer ? Expert Opin Biol Ther. 2014;743–8.
126. Barbon C, Margonis GA, Andreatos N, Rezaee N, Sasaki K, Buettner S, et al. Colorectal Liver Metastases : Does the Future of Precision Medicine Lie in Genetic Testing ? J Gatrointest Surg. 2018; 22(7):1286-1296.
127. Patel JN, Fong MK, Jagosky M. Colorectal Cancer Biomarkers in the Era of Personalized Medicine. J Pers Med. 2019;1:1–20.
128. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. Ann Oncol. 2019;30(8):1232–43.
129. Cremolini C, Benelli M, Fontana E, Pagani F, Rossini D, Fucà G, et al. Benefit from anti-EGFRs in RAS and BRAF wild-type metastatic transverse colon cancer: A clinical and molecular proof of concept study. ESMO Open. 2019;4(2):1–7.
130. Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, Hantel A, et al. Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti – Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy : American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. J Clin Oncol. 2015;1–9.
131. Roock W De, Claes B, Bernasconi D, Schutter J De, Biesmans B, Fountzilas G, et al. On the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer : a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010;11(August):753–62.
132. Schirripa M, Bergamo F, Cremolini C, Casagrande M, Lonardi S, Aprile G, et al. BRAF and RAS mutations as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection. Br J Cancer. 2015;112(12):1921–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.142

133. Connor MJO. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. Mol Cell. 2015;60(4):547–60. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.040
134. Dietlein F, Thelen L, Reinhardt HC. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. Trends Genet. 2014;30(8):326–39. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2014.06.003
135. Trenner A, Sartori AA. Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment. Front Oncol. 2019;9(December):1–10.
136. Kitao H, Iimori M, Kataoka Y, Wakasa T, Tokunaga E, Saeki H, et al. DNA replication stress and cancer chemotherapy. Cancer Sci. 2018;109(2):264–71.
137. Takamatsu S, Brown JB, Yamaguchi K, Hamanishi J, Yamanoi K, Takaya H, et al. The utility of homologous recombination deficiency biomarkers across cancer types. preprint. 2021;1–36.
138. Arai H, Elliott A, Xiu J, Wang J, Battaglin F, Kawanishi N, et al. The Landscape of Alterations in DNA Damage Response Pathways in Colorectal Cancer. Clin Cancer Res. 2021; 27(11):3234-3242.
139. Wang K, Liu M, Wang H, Jin K, Yan X, Bao Q, et al. Mutated DNA Damage Repair Pathways Are Prognostic and Chemosensitivity Markers for Resected Colorectal Cancer Liver Metastases. Front Oncol. 2021;11(March):1–12.
140. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods. 2001;25(4):402–8.
141. Detre S, Saccani Jotti G, Dowsett M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: Validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. J Clin Pathol. 1995;48(9):876–8.
142. Sylman JL, Mitrugno A, Atallah M, Tormoen GW, Shatzel JJ, Yunga ST, et al. The predictive value of inflammation-related peripheral blood measurements in cancer staging and prognosis. Front Oncol. 2018;8(MAR):1–11.
143. Butte JM, Gönen M, Allen PJ, Kingham TP, Butte JM, Go M, et al. Recurrence After Partial Hepatectomy for Metastatic Colorectal Cancer : Potentially Curative Role of Salvage Repeat Resection. Ann Surg Oncol. 2015; 22(8):2761-71.
144. Tosi F, Magni E, Amatu A, Mauri G, Bencardino K, Truini M, et al. Effect of KRAS and BRAF Mutations on Survival of Metastatic Colorectal Cancer After Liver

Resection : A Systematic Review and Meta-Analysis. Clin Colorectal Cancer. 2017;16(3):e153–63. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2017.01.004

145. Brudvik KW, Jones ÃRP, Giuliante F, Shindoh J, Passot ÃG, Chung ÃMH, et al. RAS Mutation Clinical Risk Score to Predict Survival After Resection of Colorectal Liver Metastases. Ann Surg. 2019;269(1).
146. Gagnière J, Dupré A, Gholani SS, Pezet D, Boerner T, Gönen M, et al. Is Hepatectomy Justified for BRAF Mutant Colorectal Liver Metastases ? Ann Surg. 2018;XX(Xx):1–8.
147. Li L, Guan Y, Chen X, Yang J, Cheng Y. DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. Front Pharmacol. 2021;11(February):1–13.
148. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR, Angeles L. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;18(8):495–506.
149. Zhao W, Steinfeld JB, Liang F, Chen X, David G, Ma CJ, et al. Promotion of RAD51-mediated homologous DNA pairing by BRCA1-BARD1. Nature. 2018;550(7676):360–5.
150. Laurini E, Marson D, Fermeglia A, Aulic S, Fermeglia M, Pricl S. Pharmacology & Therapeutics Role of Rad51 and DNA repair in cancer : A molecular perspective. Pharmacol Ther. 2020;107492. Available from: https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107492
151. Quigley D, Alumkal JJ, Wyatt AW, Kothari V, Lloyd P, Aggarwal R, et al. Analysis of circulating cell-free DNA identifies multi-clonal heterogeneity of. Cancer Discov. 2017;1–17.
152. Zellweger R, Dalcher D, Mutreja K, Berti M, Schmid JA, Herrador R, et al. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. J Cell Biol. 2015;208(5):563–79.
153. Lee JH, Bae AN, Jung SJ. Clinicopathological and Prognostic Characteristics of RAD51 in Colorectal Cancer. Medicina (Kaunas). 2020; 56(2):48.
154. Badie S, Carlos AR, Folio C, Okamoto K, Bouwman P, Jonkers J, et al. BRCA1 and CtIP promote alternative non- homologous end-joining at uncapped telomeres.

EMBO J. 2015;34(3):410–24.

155. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K, Mooij TM, Jervis S, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. JAMA. 2017;317(23):2402–16.
156. Ruscito I, Gasparri ML, Marco MP De, Costanzi F, Besharat AR, Papadia A, et al. The Clinical and Pathological Profile of BRCA1 Gene Methylated Breast Cancer Women : A Meta-Analysis. Cancers (Basel) 2021;1–14.
157. Garcia JM, Rodriguez R, Dominguez G, Silva J, Provencio M, Silva J, et al. Prognostic significance of the allelic loss of the BRCA1 gene in colorectal cancer. Gut. 2003;1756–64.
158. Moutinho C, Martinez-cardús A, Santos C, Navarro-pérez V, Martínez-balibrea E, Musulen E, et al. Epigenetic Inactivation of the BRCA1 Interactor SRBC and Resistance to Oxaliplatin in Colorectal Cancer. J Natl Cancer Inst. 2013; 106(1):322.
159. Pucci S, Polidoro C, Joubert A, Mastrangeli F, Tolu B, Benassi M, et al. Ku70, Ku80, sClusterin: a “cluster” of predicting factors for neoadjuvant chemoradiotherapy treatment response in patients affected by locally advanced rectal cancer. Int J Radiat Oncol. 2016; 97(2):381-388. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.10.018
160. Beggs AD, Domingo E, McGregor M, Presz M, Johnstone E, Midgley R, et al. Loss of expression of the double strand break repair protein ATM is associated with worse prognosis in colorectal cancer and loss of Ku70 expression is associated with CIN. Oncotarget. 2012;3(11):1348–55. Available from: http://oncotarget.com/abstract/694
161. Arora M, Kumari S, Singh J, Chopra A, Chauhan SS. PAXX , Not NHEJ1 Is an Independent Prognosticator in Colon Cancer. Fron Mol Biosci. 2020;7(October):1–15.
162. He W, Hu W, Wang F, Rong Y, Yang L, Xie Q. Comparison of Mismatch Repair Status Between Primary and Matched Metastatic Sites in Patients With Colorectal Cancer. J Natl Compr Canc Netw. 2019;17(10).

163. Chen W, Frankel WL. A practical guide to biomarkers for the evaluation of colorectal cancer. Mod Pathol. 2019; 32(Suppl 1):1-15. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41379-018-0136-1

164. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. J Clin Oncol. 2005;23(3):609–18.

165. Kuan S, Ren B, Brand R, Dudley B, Reetesh K. Neoadjuvant therapy in microsatellite stable colorectal carcinoma induces concomitant loss of MSH6 and Ki67 expression. Hum Pathol. 2017; 63:33-39. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2017.02.003

166. Vilkin A, Halpern M, Morgenstern S, Brazovski E, Gingold-belfer R, Boltin D, et al. How reliable is immunohistochemical staining for DNA mismatch repair proteins performed after. Hum Pathol. 2014;45(10):2029–36. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2014.07.005

167. Song Y, Yang Y, Gao P, Chen X, Yu D, Xu Y, et al. The preoperative neutrophil to lymphocyte ratio is a superior indicator of prognosis compared with other inflammatory biomarkers in resectable colorectal cancer. BMC Cancer. 2017; 17(1):744.

168. Patel M, Mcsorley ST, Park JH, Roxburgh CSD, Edwards J, Horgan PG, et al. The relationship between right-sided tumour location , tumour microenvironment , systemic inflammation , adjuvant therapy and survival in patients undergoing surgery for colon and rectal cancer. Nat Publ Gr. 2018;118(5):705–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.441

169. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. J Natl Cancer Inst. 2014;106(6):1–11.

170. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wick EC, Elizabeth M, Taube JM, et al. The vigorous immune microenviroment of microssatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. Cancer Discov. 2015;5(1):43–51.

171. Pine JK, Morris E, Hutchins GG, West NP, Jayne DG, Quirke P, et al. Systemic neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer : the relationship to patient

survival , tumour biology and local lymphocytic response to tumour. Br J Cancer. 2015;113(2):204–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.87

172. Park JH, Powell AG, Roxburgh CSD, Horgan PG, Mcmillan DC. Mismatch repair status in patients with primary operable colorectal cancer : associations with the local and systemic tumour environment. Br J Cancer. 2016;114(5):562–70. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.17

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Journal: Journal of Surgical Oncology

Impact factor: 3.244

Manuscript title: Prognostic role of DNA Double Strand Break Repair in resectable colorectal liver metastases

Authors: Carlos Daniel Hernández Antonello[1], Gabriel e Silva Montenegro[1], Victória Lau[1], Helena de Castro e Gloria MSc[1], Angélica Maria Lucchese, MD, PhD[2], Natalia Motta Leguisamo, PhD[2], Antonio Nocchi Kalil, PhD[1,2]

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

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

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

Submission guidelines:

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

Abbreviations

anti-EGFR - anti–epidermal growth factor receptor

BSA - Bovine serum albumin

CEA - carcinoembryonic antigen

c-NHEJ – classical nonhomologous end-joining

CRC - colorectal cancer

CRLM - colorectal liver metastases

DAB - Diaminobenzidine

DDR - DNA damage response

dMMR - MMR deficiency

DSB - DNA double-strand breaks

FFPE - formalin-fixed paraffin-embedded

HRR - homologous recombination

LMR - lymphocyte-to-monocyte ratio

MMR - mismatch repair

MSS - microsatellite stable

NHEJ - nonhomologous end-joining

NLR - neutrophil-to-lymphocyte ratio

OS - Overall survival

PFS - Progression-free survival

PLR - platelet-to-lymphocyte ratio (PLR)

pMMR - proficient MMR

Abstract

Background: Identification of specific risk groups for recurrence after surgery for isolated colorectal liver metastases (CRLM) remains challenging due to the heterogeneity of the disease. Classical clinicopathologic parameters have limited prognostic value.

Methods: We included 50 patients prospectively. CRLM and matched adjacent normal liver specimens of patients who underwent hepatectomy with curative intent were assessed for gene expression of key DSBR genes (*RAD51*, *BRCA1* and *XRCC5*) by reverse transcription-quantitative PCR (n=32) and protein expression by immunohistochemistry (Ku80 (n=32), MLH1 and MSH6 (n= 50)). Prognostic role of molecular and clinicopathological data were investigated by Cox Regression for progression free survival (PFS) and overall survival (OS).

Results: Increased *RAD51* and *XRCC5* mRNA levels in neoplastic tissues were associated with neoadjuvant treatment for CRLM mismatch repair deficiency (dMMR). Low *XRCC5* expression was associated with shorter OS and PFS. However, multivariate analysis did not confirm low *XRCC5* as independent prognosticator (PFS HR IC95% = 6.727 (0.471 - 9.058), p = 0.016; OS HR IC95% = 9.120 (0.918 - 9.612); P= 0.059). Neoadjuvant treatment for CRLM and surgical margins after hepatectomy were confirmed as independent prognosticators of PFS. Decreased *XRCC5* levels in tumor tissues predicted to poor PFS in patients with positive surgical margins (R1-R2) who received neoadjuvant treatment for CRLM compared to those who did not receive it.

Conclusions: Our results suggest a prognosticator role for *XRCC5* in resectable CRLM. Low *XRCC5* mRNA levels may predict worse recurrence risk and survival, particularly in patients with positive surgical margins who did not receive neoadjuvant chemotherapy for CRLM.

Key-words: Colorectal cancer liver metastases; DNA double strand break repair; disease recurrence; prognosis.

INTRODUCTION

Nearly 25% of patients diagnosed with colorectal cancer (CRC) present simultaneous liver metastasis and an additional 25-50% will develop metachronous metastases after the resection of the primary tumor (1,2). Surgical resection of colorectal liver metastases (CRCLM) is the only therapeutical strategy with potentially curative intention, with 5- and 10-year survival rates at 40% and 25% respectively (3). However, even if curative resection is performed, the postoperative recurrence rate if approximately of 75% and the 5-year survival rate does not exceed 61% (4).

In order to improve prognostication of resectable CRLM, research efforts have been devoted into the identification of scores and nomograms to predict the risk of recurrence following hepatectomy. The majority of these studies have been focusing on a sum of historically established prognostic clinicopathological factors within the primary CRC and the CRCLM, such as CRC laterality, synchronicity, resection margin status, disease free-interval from CRC to liver metastases, number and dimension of hepatic tumors, carcinoembryonic antigen (CEA) levels, etc.) (4–6). Although, these scoring systems have been proven useful by a number of studies, inconsistent clinical outcomes between patients with similar risk scores have been observed. There is a consensus that CRC is a heterogeneous disease, the inclusion of tumor biological and molecular features is crucial to improve patient stratification regarding recurrence risk after hepatectomy (7–9).

Besides single *RAS* and *BRAF* mutational status and mismatch repair (MMR) proficiency status, no acknowledged biomarkers of prognosis and response to systemic therapies has reached clinical practice in stage IV CRC (10,11). While *RAS* mutations are found in up to 60% of metastatic CRC, $BRAF^{V600E}$ mutation and MMR deficiency (dMMR) occurs in only up to 10% and 5% of patients with CRCLM, respectively (12–14). The clinical application of these biomarkers in metastatic CRC is limited the fact that tumors with *RAS* mutations and $BRAF^{V600E}$ mutation does not derive clinical benefit from the anti–epidermal growth factor receptor (anti-EGFR) cetuximab alone or in combination with panitumumab, and tumors with proficient MMR (pMMR)/microsatellite stable (MSS) metastatic CRC are not eligible for immunotherapy. Although median relapse free survival

for *BRAF* and RAS mutant patients who underwent resection for CRCLM is significantly shorter than for wild-type patients, prognostic value of and dMMR/MSI in patients with resectable CRLM has not been proven so far. Thus, the usefulness of these markers to optimize clinical decision making in patients potentially candidate to hepatic surgery remains to be elucidated (15).

Alterations in DNA Damage Response (DDR) pathways - such as MMR, homologous recombination (HRR) and nonhomologous end-joining (NHEJ) - are broadly explored features in tumor evolution, response to therapy and prognosis of several types of cancer (16,17). HRR and classical NHEJ (C-NHEJ) pathways answers to DNA double-strand breaks (DSB), which are considered the most lethal of all DNA lesions. These lesions elicit the majority of the cytotoxic effects induced by ionizing radiation and chemotherapy agents, such as such as 5-fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin, and thus, are a robust targetable susceptibility in cancer cells (18). Hence, DSB repair deficiencies are prognostic candidates of particular interest in stage IV CRC since cytotoxic chemotherapy remains the backbone of perioperative treatment for down-staging unresectable CRLM (19). Patients whose tumors harbor HRR deficiencies have particular sensitivity to cytotoxic agents which induce replicative stress and DSB, and thus better overall survival that those with proficient DSB repair (20). Yet, although a growing body of evidence has been supporting further investigation of the role of the impaired function of DDR pathways in CRC (21,22), it was only recently reported that mutations in base excision repair (BER), HRR and MMR pathways were associated with poor overall survival in CRLM patients who underwent hepatectomy with curative intent (23). Thus, we aimed to investigate the molecular patterns of expression of HRR and NHEJ representative components – *BRCA1*, *RAD51*, *XRCC5*/KU80 - and its impacts on prognosis of patients who underwent liver resection for CRLM.

PATIENTS AND METHODS

Patients and tissue collection

Fifty patients who had undergone hepatectomy with curative intent for colorectal cancer liver metastases in Hospital Santa Rita, Hospital Moinhos de Vento and Hospital Regina (Rio Grande do Sul, Brazil) were prospectively included between May 2018 and April 2020, with the last follow-up in May 2021. Only patients with histological confirmation of CRC and CRLM were included in this study. Patients with extra-hepatic disease and/or with incomplete macroscopic resection, with incomplete record and who did not have anatopathological samples for reassessment were excluded. Pathological and clinical data were collected in a retrospective manner regarding primary colorectal tumor and in a prospective manner regarding liver metastases.

Of the 50 patients initially enrolled only 32 were assessed for gene expression in fresh neoplastic and matched healthy liver specimens collected during surgical procedure and for protein expression in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples due to poor RNA quality. The fresh specimens were obtained from a single lesion to avoid the inter-lesion biological variability, and immediately embedded in RNAlater™ stabilization solution (Invitrogen) for 24 hours and then frozen for subsequent analysis.

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

Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

For the differential gene expression in the liver metastasis and healthy paired tissues RNA was extracted and purified from 30 mg of both fresh tumors and adjacent normal tissues samples using RNeasy mini kit (SABiosciences/Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Regions of high tumor cellularity (minimum of 80%) were selected for RNA extraction. cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using the RT2

PCR Array First Strand Kit (SABiosciences/Qiagen) according to supplier's recommendations. Reactions were prepared in duplicate using RT2 SYBR-Green/Rox PCR Master Mix (SABiosciences/Qiagen) for RT2 Profiler™ PCR Array (SABiosciences/Qiagen). The selected genes composing the arrays were: *BRCA1* and *RAD51*, components of HRR pathway, and *XRCC5*, a component of NHEJ pathway. The analyses were based on the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (24) with normalization of the raw data of each gene of interest in relation to the geometric mean of CT values of two housekeeping genes (*PPIA* and *GAPDH*).

Immunohistochemistry

Protein expression of XRCC5 gene product, Ku80, and of MMR components, MLH1 and MSH6, was examined from formalin-fixed paraffin-embedded samples. Tissues were sectioned at 4-μm and mounted on silanized slides, which were stored at 4ºC. After deparaffinization and rehydration, the sections were quenched with 3% H_2O_2 in methanol to block endogenous peroxidase. Bovine serum albumin at 5% (BSA) was then applied to prevent non-specific binding. The sections were incubated with Anti-Ku80 antibody (dilution 1:100, Abcam, rabbit, [EPR3467] ab79391), Anti-MLH1 antibody (dilution 1:100, Abcam, rabbit, [EPR3894] ab92312) and Anti- MSH6 antibody (dilution 1:250, Abcam, Rabbit, [EPR3945] ab 92471) and then incubated with appropriate secondary antibodies (DAKO). Diaminobenzidine (DAB) was used as a chromogen and the sections were counterstained with hematoxylin. Omission of the primary antibody was used as a negative control.

After immunostaining, two observers scored all samples independently. The few cases with discrepant scoring were re-evaluated jointly on a second occasion, and agreement was reached in all cases. Five hot spot fields containing at least 200 cells were captured and the positive cells were counted using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Ku80, MLH1 and MSH6 protein expression levels were estimated through a scoring system, which took into account the intensity of the color reaction and the percentage of positive cells within the five microscope fields at the

magnification of 100x. According to the number of positive staining nuclei, the staining density was expressed semi-quantitatively as follows: 0, less than 5%; 1, 5 to 25%; 2, 25 to 50%; 3, 50% to 75%; or 4, more than 75%. We also evaluated the staining intensity as follows: 0-negative staining; 1-weak staining; 2-moderate staining and 3- strong staining. Both values were multiplied together, and the staining score was stratified as weak (score range, 0–4) or strong (score range, 5–12) according to the proportion and intensity of positively stained cancer cells (25).

Regarding MLH1 and MSH6, protein expression was classified as absent if no staining in tumor was identified, and present with any staining density or intensity. Thus, MMR deficiency was characterized by complete loss of MLH1 or MSH6 staining.

Inflammation-Related Peripheral Blood Measurements

Absolute count of circulating neutrophils, lymphocytes and platelets are associated with inflammatory responses, which are key factors in recognition of pathways for tumorigenesis and growth (26). Thus, we calculated neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) from absolute counts of pretreatment peripheral blood tests. Subgroups were divided using the median expression value (expression ≤ median = low; expression > median = high).

Statistical Analyses

All analyses were performed using IBM SPSS statistics version 26 (IBM Corp., Armonk, NY), GraphPad Prism version 8.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA) and Excel version 2017 (Microsoft Corp., Redmond, WA). Gene expression and inflammatory blood index subgroups were categorized using the median expression value (expression ≤ median = low; expression > median = high). Proportions were compared with Chi-squared test followed by Fisher's Exact test, and continuous variables with Student's T test. Correlation between continuous variables was assessed with Spearman Rank Order.

Overall survival (OS) was calculated from the date of hepatectomy to date of death or last known follow-up. Progression-free survival (PFS) was calculated from date of

hepatectomy to date of local recurrence or metastasis or death, which ever came first, or last known follow-up. OS and DFS rates were estimated using the Kaplan-Meier method. The log-rank test was used to assess for significant differences between subgroups by univariate analysis. To investigate independent prognostic factors for OS and DFS, factors with a P-value of less than 0.2 in univariate analyses were entered into a multivariate analysis. The Cox proportional hazards regression model was used to identify factors that were independently associated with OS and PFS. Pearson's chi-squared test and Fisher's exact test were used to evaluate distributions of categorical variables. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Availability of data and Materials

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

RESULTS

Clinicopathological characteristics of CRCLM patients

The clinicopathological characteristics of the patients are shown in Table 1. A total of 50 patients were included in this study and 32 of those were assessed for gene expression of DSBR representative genes, and XRCC5, MLH1 and MSH6 protein expression. Median age at CRLM diagnosis was 64 years, and 31 (62%) were male. Colon was the location of the primary tumor in 12% of the patients, 52% it was in the left colon and 34% in the rectum. The majority of the included patients presented positive lymphnodes (40%), high grade tumors (58%) and perineural invasion (60%). Regarding systemic chemotherapy for CRC, 46% and 64% underwent neoadjuvant and adjuvant treatment, respectively.

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

Table 1. Clinicopathological features of CRCLM patients.

Included patients, N (%)	**50 (100)**
Age, median (min-max)	64 (42-89)
Female:Male	19:31 (38:62)
CRC location (sidedness)	
Colon (Right-sided)	6 (12)
Colon (Left-sided)	26 (52)
Rectum	17 (34)
Unknown	1 (2)
CRC TNM staging	
II	12 (24)
III	8 (16)
IV	23 (46)
Unknown	7 (14)
Nodal metastasis	
Yes	20 (40)
No	16 (32)
Unknown	14 (28)
CRC grade	
Low grade	5 (10)
High grade	29 (58)
Unknown	16 (32)
Lymphovascular invasion	
Yes	16 (32)
No	25 (50)
Unknown	9 (18)
Perineural Invasion	
Yes	30 (60)
No	12 (24)
Unknown	8 (16)
Neoadjuvant chemotherapy	
Yes	15 (30)
No	28 (56)
Unknown	7 (14)
Adjuvant chemotherapy	
Yes	11 (22)
No	32 (64)
Unknown	7 (14)

Table 2: Perioperative prognostic factors of CRCLM patients.

Included patients, n (%)	**50 (100)**
Synchronicity	
Synchronus	24 (48)
Metachronus	26 (52)
Time between CRC and liver metastasis	
≦12 months	15 (30)
>12 months	29 (58)
Number of liver metastases	
<3	41 (82)
≥ 3	8 (16)
Unknown	1 (2)
Size of the largest metastasis (cm)	
≦ 5	40 (80)
> 5	8 (16)
Unknown	2 (4)
CRCLM grade	
Low grade	31 (62)
High grade	7 (14)
Unknown	12 (24)
Margins*	
R0	45 (58)
R1	18 (23)
R2	9 (12)
Unknown	5 (6)
Neoadjuvant chemotherapy	
Yes	34 (68)
No	8 (16)
Unknown	8 (16)
NLR, median (min-max)	2.60 (0.43 - 28.76)
LMR, median (min-max)	2.93 (0.68 - 6.28)
PLR, median (min-max)	123.76 (38.58 - 505.68)

*R0: complete surgical resection with negative histological margins; R1: microscopic margins compromised according to the pathologist report; R2: macroscopic tumor remaining intraoperatively; LMR: Lymphocyte-to-monocyte ratio; NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio.

Changes in DSBR gene expression in colorectal liver metastases and matched healthy liver specimens

The mRNA levels for *RAD51, and XRCC5* were obtained by RT-PCR of 32 pairs of CRCLM and adjacent healthy liver tissues (Figure 1). Higher levels of *RAD51* ($p=0.0006$) mRNA were found in normal tissues in comparison to tumors tissues (Figure 1A). Conversely, BRCA1 ($p=0.0006$) and XRCC5 ($p=0.0221$) presented higher levels of mRNA in the tumors tissue in comparison to normal tissues. However, *BRCA1* and *XRCC5* presented higher levels of mRNA in tumor tissues in comparison with normal tissue. We observed fold-change induction in *RAD51* (2.76, $p=0.0015$), BRCA1 (-2.64, $p<0.0001$) and XRCC5 (-3.94, $p<0.0001$) (Figure 1D).

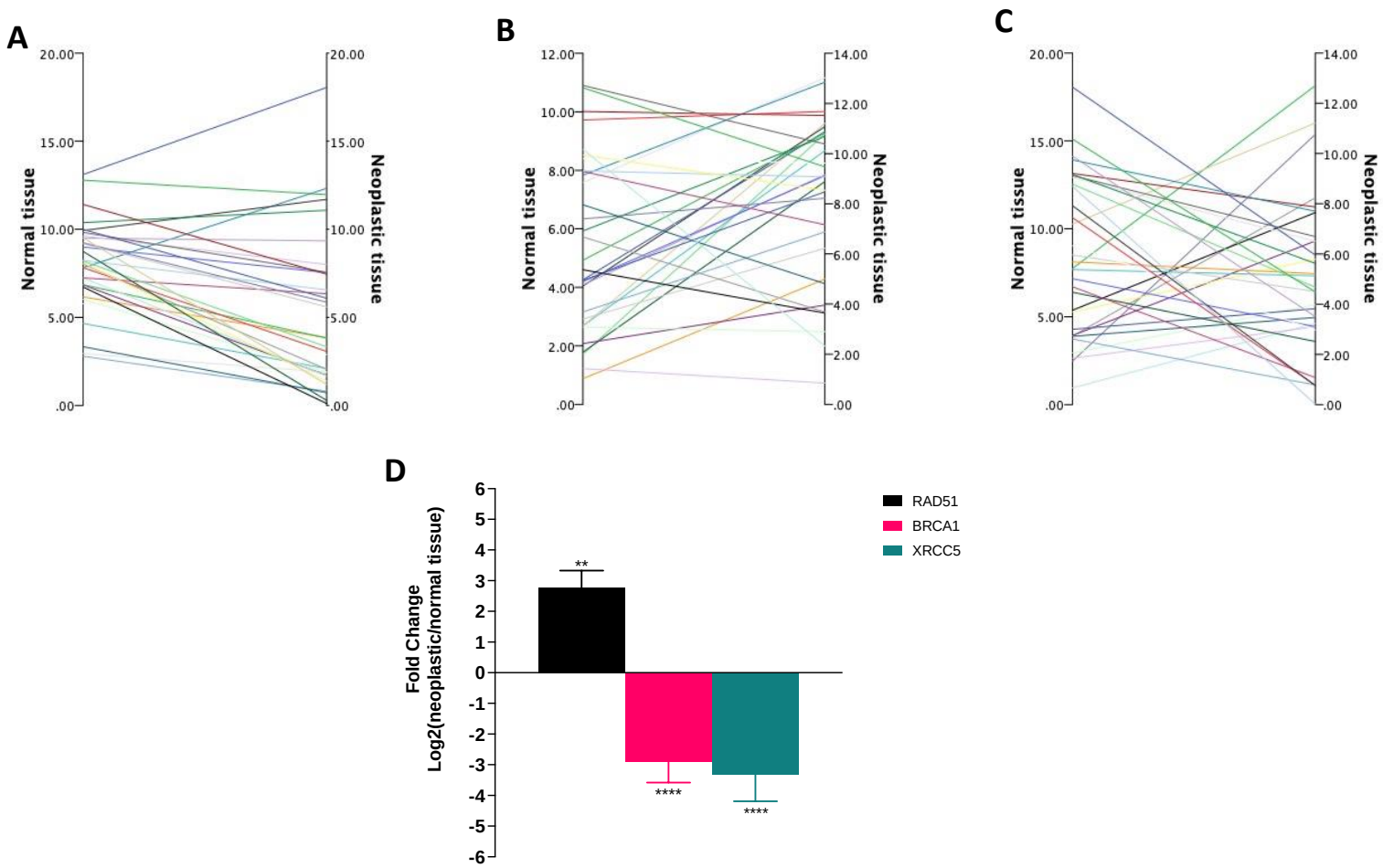


Figure 1. Gene expression of representative double strand break repair genes in colorectal liver metastases and matched normal liver. (A) RAD51; (B) BRCA1; (C) XRCC5; (D) Fold change induction between neoplastic and normal

tissues. Gene expression means between normal and neoplastic tissue were compared using Student's T test and Mann-Whitney's test was used for differences in fold-foldchange. **p<0.01; ****p<0.0001.

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

Next, we investigated the possible associations between clinicopathological features of CRLM patients and fold change or tumor mRNA levels of *RAD51, BRCA1 and XRCC5* (Table 3)***.*** *RAD51* and *XRCC5* were associated with neoadjuvant treatment for CRLM (p=0.017 for both) and MMR deficiency due to lack of MLH1 or MSH6 (p = 0.038 and p>0.001, respectively). *XRCC5* overexpression was also associated with MMR deficiency (p<0.001). No significant association between *BRCA1* mRNA levels and clinicopathological and molecular features of CRLM were found.

Table 3. Associations between expression of DSBR genes of and clinicopathological features of CRCLM patients.

		RAD51	*BRCA1*	*XRCC5*
CRC location	χ^2	1.391	0.155	1.391
	P	0.433	1.000	0.433
Sidedness	χ^2	1.474	1.043	1.474
	P	0.479	0.594	0.479
CEA (at CRC diagnosis)	χ^2	0.825	0.041	0.825
	P	0.594	1.000	0.594
CRC tumor Staging	χ^2	2.411	0.678	0.386
	P	0.182	0.648	0.662
CRC tumor grade	χ^2	3.163	0.290	0.491
	P	0.217	1.000	0.590
CRC neoadjuvant treatment	χ^2	2.489	0.080	3.475
	P	0.236	1.000	0.114
CRC adjuvant treatment	χ^2	0.077	2.696	0.77
	P	1.000	0.130	1.000
Metastatic lymph node	χ^2	0.068	1.245	0.68
	P	1.000	0.400	1.000
Lymphovascular invasion	χ^2	0.422	0.127	0.894
	P	0.695	1.000	0.440
Perineural invasion	χ^2	0.080	3.319	0.622
	P	1.000	0.114	0.695
Number of metastatic lesions	χ^2	2.133	0.237	0.237
	P	0.333	1.000	1.000
Size of largest liver metastasis	χ^2	0.005	1.302	1.302
	P	1.000	0.333	0.333
Synchronicity	χ^2	0.508	3.030	0.508
	P	0.722	0.153	0.722
Time between CRC and CRLM	χ^2	0.032	1.710	0.318
	P	1.000	0.272	0.715
CRLM tumor grade	χ^2	0.403	0.974	2.521
	P	0.647	0.393	0.167
Margins	χ^2	1.265	0.153	2.143
	P	0.299	0.730	0.272
CRLM neoadjuvant treatment	χ^2	**6.686**	0.516	**6.686**
	P	**0.017**	0.652	**0.017**
NLR	χ^2	2.032	0.508	0.508
	P	0.285	0.722	0.722
LMR	χ^2	1.166	0.130	0.130
	P	0.473	1.000	1.000
PLR	χ^2	0.027	2.548	0.784
	P	1.000	0.156	0.479
RAS mutation	χ^2	0.667	1.200	6.000
	P	1.000	1.000	0.100
dMMR	χ^2	**4.500**	0.500	**32.000**
	P	**0.038**	0.724	**<0.001**

CEA: Carcinoembryonic Antigen; LMR: Lymphocyte-to-monocyte ratio; NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio; dMMR: mismatch repair deficient

Associations between Ku80 protein expression and MMR deficiency in colorectal liver metastases and clinicopathological features

Next, we evaluated the protein expression of Ku80, the protein product of *XRCC5*, and the expression of MLH1 and MSH6 by immunohistochemistry and the potential associations with clinical features (Table 4). MMR deficiency was determined if the immunohistochemistry did not reveal MLH1 or MSH6 staining, denoting a lack of expression of these proteins. Ku80 was associated with lymphovascular invasion in primary CRC (p= 0.045) and synchronicity (p=0.043). MMR status was associated with synchronicity (p=0.0410, time between primary CRC, diagnosis of CRLM (p= 0.043) and preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio (p=0.041).

Table 4. Associations between Ku80 protein expression and MMR status in CRLM and prognostic clinicopathological features.

		Ku80				MMR deficiency			
		Low	High	χ2	P	No	Yes	χ2	P
Age at diagnosis	≦ or 65	8	9	0.000	1.000	23	8	0.689	0.498
	> 65	7	8			16	3		
CRC location	Colon	10	13	0.379	0.699	25	7	0.122	1.000
	Rectum	5	4			14	13		
CEA at CRC diagnosis (ng/uL)	≦ 5	0	5	0.328	1.000	5	1	0.052	1.000
	> 5	1	15			19	5		
CRC tumor Staging	II	2	11	0.678	0.648	10	2	0.041	1.000
	III-IV	4	10			25	6		
CRC tumor grade	Low	2	1	0.290	1.000	3	2	0.551	0.591
	High	10	10			22	7		
CRC neoadjuvant treatment	No	9	9	0.00	1.000	22	6	0.012	1.000
	Yes	9	5			12	3		
CRC adjuvant treatment	No	7	2	3.548	0.109	9	2	0.213	1.000
	Yes	8	12			24	8		
Metastatic lymph nodes	No	6	8	1.245	0.400	15	5	0.000	1.000
	Yes	6	3			12	4		
CRC Lymphovascular invasion	No	8	2	4.368	**0.045**	20	5	0.142	0.717
	Yes	7	11			12	4		
CRC Perineural invasion	No	1	5	0.003	1.000	9	3	0.013	1.000
	Yes	3	16			23	7		
Number of metastatic lesions	≦ 3	13	14	0.112	1.000	32	3	0.036	1.000
	> 3	2	3			6	2		
Size of largest liver metastasis	≦ 5 cm	14	13	1.006	0.600	34	6	2.215	0.159
	> 5 cm	1	4			5	3		
Synchronicity	Metachronus	6	12	3.030	**0.043**	23	3	3.959	**0.041**
	Synchronus	9	5			16	8		
Time between CRC and CRLM	≦ 12 months	9	5	1.710	0.272	16	8	3.382	**0.043**
	> 12 months	6	9			18	2		
CRLM tumor grade	Low	6	3	0.121	1.000	24	7	1.938	0.309
	High	3	4			7	0		
Margins	R0	8	8	0.153	0.730	20	7	0.536	0.716
	R1-R2	6	8			15	3		
CRLM neoadjuvant treatment	No	4	2	0.516	0.652	8	0	2.695	0.168
	Yes	10	10			25	9		
NLR	≦ 2.59	7	7	0.98	1.000	23	3	3.455	**0.041**
	> 2.59	8	10			16	6		
LMR	≦2.96	9	10	0.05	1.000	20	6	0.037	1.000
	> 2.96	6	7			19	5		
PLR	≦ 123	8	6	1.480	0.289	16	6	0.534	0.510
	> 123	6	11			22	5		
RAS mutation	No	3	2	1.200	1.000	5	3	0.016	1.000
	Yes	2	1			2	1		
dMMR/Ku80	No	9	7	1.129	0.479	11	4	0.379	0.678
	Yes	6	10			14	3		

LMR: Lymphocyte-to-monocyte ratio; NLR: Neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLR: Platelet-to-lymphocyte ratio.

Survival analyses

We used Kaplan-Meier and Cox regression to investigate the prognostic value of clinicopathological and molecular features of CRLM. Considering all the patients included in or cohort (n=50), mean OS was 38.42 months (IC 95% 34.29 - 42.55) and mean PFS was 30.68 months (IC 95% 25.44 – 35.93) (Figure 2)**.** Gene expression and Ku80 data was available for 32 patients, and MMR repair status was available for all included patients.

Following univariate analysis of OS (Table 5), primary CRC location (p = 0.194), number of metastatic lesions (p=0.128) and *XRCC5* mRNA levels (p=0.025) were included in multivariate analysis. Figure 3 demonstrates overall survival patterns for high and low XRCC5 expression and adjusted primary CRC location and number of metastatic lesions. None of these variables demonstrated to independently predict OS, but high *XRCC5* expression showed a tendency as a prognostic factor for this outcome [HR= 9.120 (0.918 – 9.612), p= 0.058] (Figure 3A). Although the multivariate model including these variables did not reach statistical significance (p=0.127), patients with primary tumor in rectum, irrespective of the number of metastatic lesions, poorer OS rates can be seen if *XRCC5* mRNA levels are decreased of neoplastic tissues.

Regarding to PFS, univariate analysis identified the size of the largest CRCLM (p= 0.111), synchronicity (p= 0.175), surgical margins (p= 0.032), neoadjuvant treatment for CRLM (p=0.008) and *XRCC5* mRNA levels (p=0.054) as potential independent prognostic factors. The multivariate model including concomitantly surgical margins, neoadjuvant treatment for CRCLM and XRCC5 mRNA levels was statistically significant at p<0.001 level. However, the independent prognostic value was confirmed to positive (R1-R2) surgical margins HR=31.734 (3.534 – 288.930), p=0.016] and no neoadjuvant treatment for CRLM [HR=30.813 1.757 – 54.373), p=0.019) (Table 6). Figure 4 show Kaplan Meyer of univariate analysis of *XRCC5* mRNA levels and the PFS patterns according to *XRCC5* mRNA levels after adjusting for surgical margins and neoadjuvant treatment (Figures 4B and 4C).

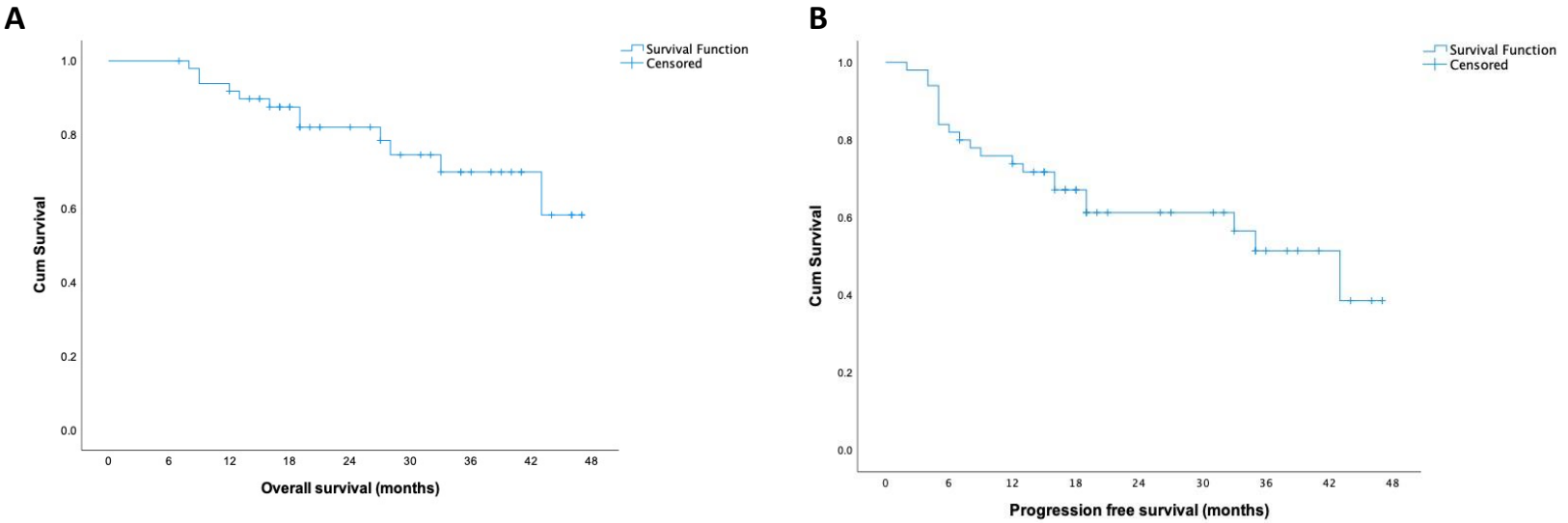
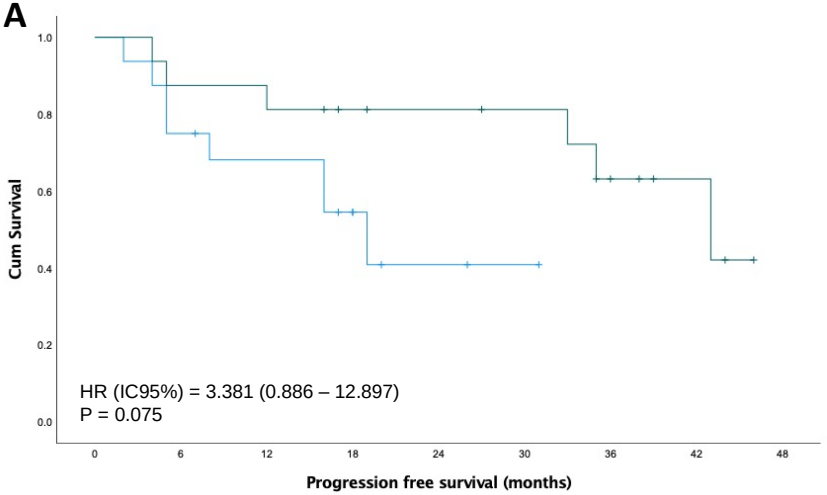


Figure 2. Survival of patients with colorectal liver metastases who underwent hepatectomy (n=50). (A) Overall survival and (B) Progression-free survival.

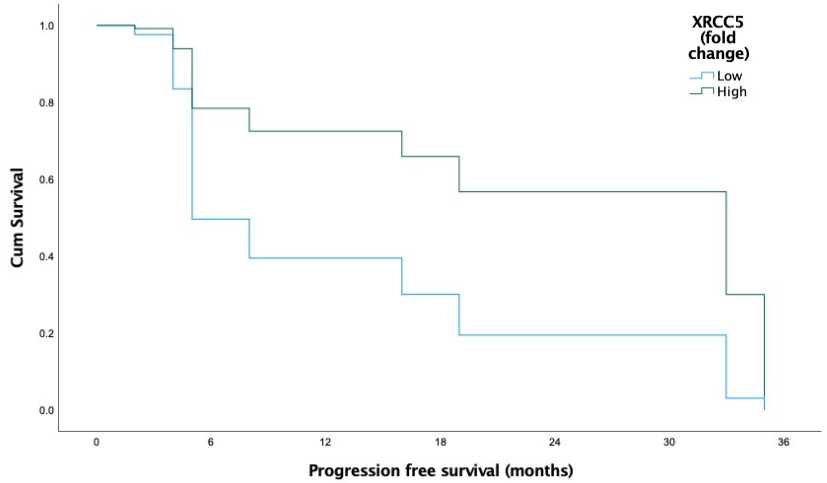
Table 5. Univariate and multivariate analyses of overall survival of CRLM patients.

Univariate Analysis		Multivariate Analysis		
Variable	**p**	**Variable**	**HR (95% CI)**	**p**
Gender	0.718			
Age	0.286			
CRC location	**0.194**	**Colon**	0.682 (0.120 - 3.867)	0.655
		Rectum	1.000	
Sidedness	0.417			
CRC TNM	0.379			
CRC tumor grade	0.501			
CRC neoadjuvant treatment	0.484			
CRC adjuvant treatment	0.804			
CRC nodal metastasis	0.683			
CRC lymphovascular invasion	0.499			
CRC perineural invasion	0.723			
Number of CRLM	**0.128**	**≦ 3**	1.000	0.469
		>3	1.848 (0.351 - 9.742)	
Size of the largest CRLM	0.832			
Synchronicity	0.625			
Time to CRLM	0.971			
CRLM grade	0.542			
Margins	0.640			
CRCLM neoadjuvant treatmer	0.470			
NLR	0.759			
LMR	0.667			
PLR	0.790			
RAS mutation	0.431			
RAD51 mRNA	0.466			
BRCA1 mRNA	0.392			
XRCC5 mRNA	**0.025**	**High**	1.000	0.059
		Low	9.120 (0.918 - 9.612)	
Ku80 IHC	0.392			
dMMR	0.675			

A


Cum Survival
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
6
12
18
24
30
36
42
48
HR (IC95%) = 3.381 (0.886 – 12.897)
P = 0.075
Progression free survival (months)

B


Cum Survival
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
6
12
18
24
30
36
XRCC5 (fold change)
Low
High
Progression free survival (months)

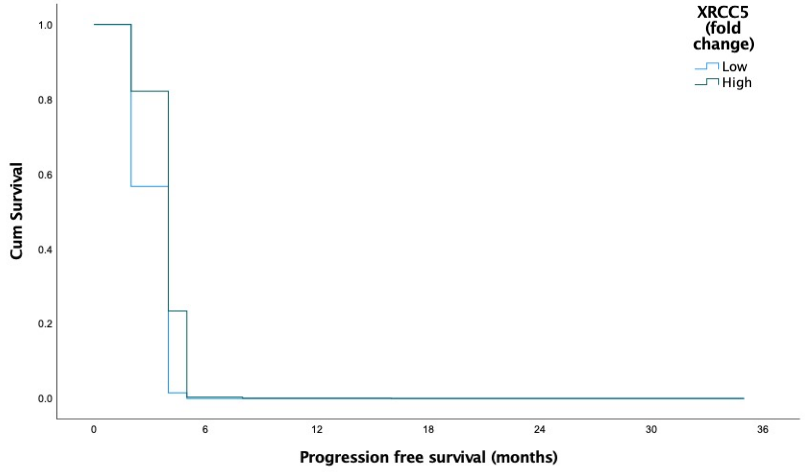

Cum Survival
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
6
12
18
24
30
36
XRCC5 (fold change)
Low
High
Progression free survival (months)

Figure 3. Overall survival of CRLM patients and survival patterns. (A) Univariate analysis and KM plot of XRCC5 mRNA levels; and Cox regression of XRCC5 mRNA adjusted to CRC location and number of metastatic lesions: (B) Rectum and > 3 liver metastases; and (B) Rectum and < 3 liver metastases.

Table 6. Univariate and multivariate analyses of progression free survival of CRLM patients.

Univariate Analysis		Multivariate Analysis		
Variable	**p**	**Variable**	**HR (95% CI)**	**p**
Gender	0.433			
Age	0.812			
CRC location	0.982			
Sidedness	0.951			
CRC TNM	0.223			
CRC tumor grade	0.432			
CRC neoadjuvant treatment	0.376			
CRC adjuvant treatment	0.605			
CRC nodal metastasis	0.963			
CRC lymphovascular invasion	0.787			
CRC perineural invasion	0.682			
Number of CRLM	0.536			
Size of the largest CRLM	**0.111**	≦ 5 cm	0.254 (0.14 - 4.651)	
		> 5 cm	1,000	0.355
Synchronicity	**0.175**	Synchronus	1,000	0.847
		Metachronus	0.855 (0.174 - 4.201)	
Time to CRLM	0.568			
CRLM grade	0.594			
Margins	**0.032**	R0	1,000	**0.016**
		R1-R2	31.734 (3.534 – 288.930)	
CRLM neoadjuvant treatment	**0.008**	No	1,000	**0.019**
		Yes	30.813 (1.757 - 54.373)	
NLR	0.819			
LMR	0.418			
PLR	0.417			
RAS mutation	0.227			
RAD51 mRNA	0.327			
BRCA1 mRNA	0.635			
XRCC5 mRNA	**0.054**	Low	6.727 (0.471 - 9.058)	0.160
		High	1,000	
Ku80 IHC	0.476			
dMMR	0.764			

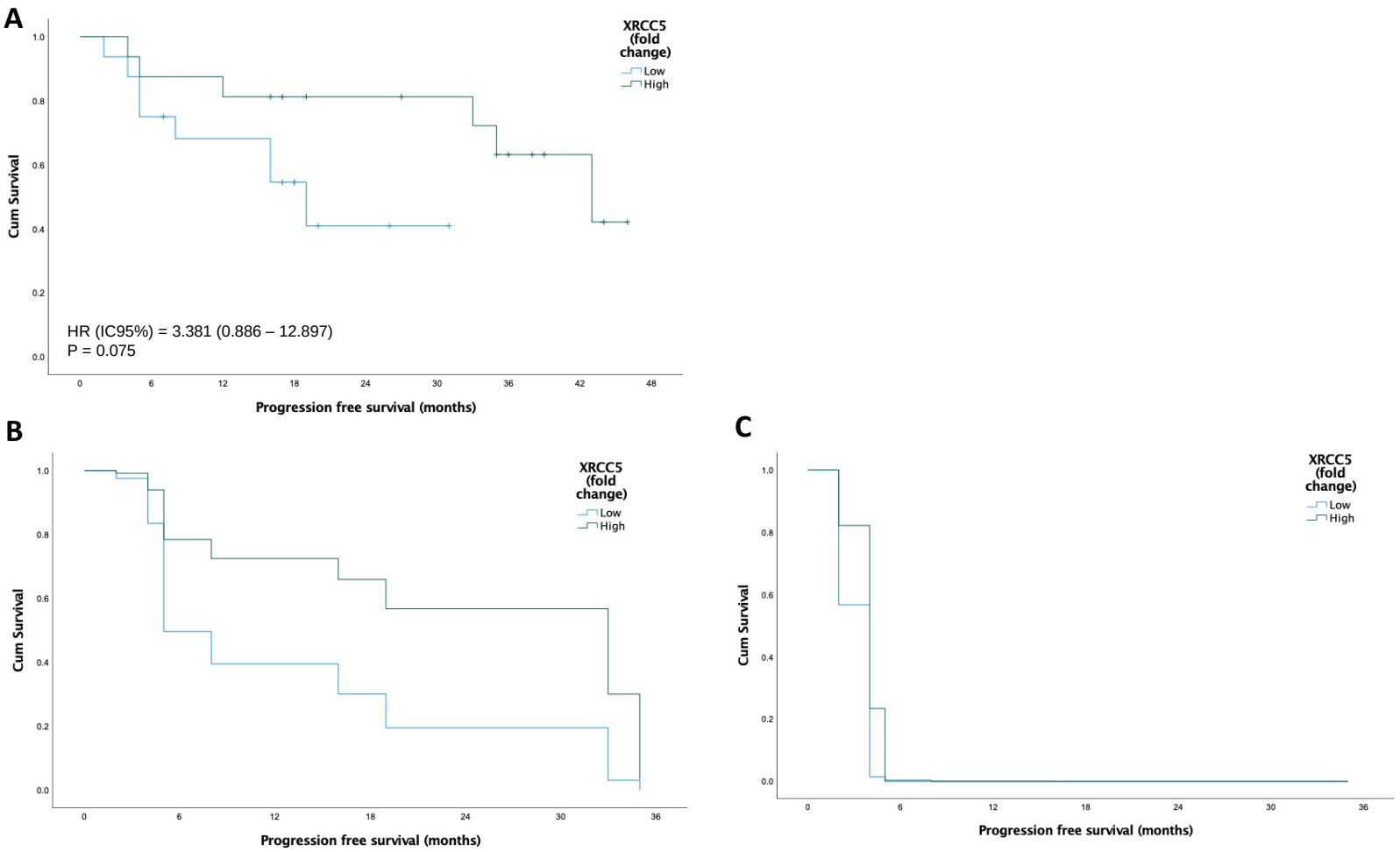


Figure 4. Progression-free survival of CRLM patients and survival patterns. (A) Univariate analysis and KM plot of XRCC5 mRNA levels; and Cox regression of XRCC5 mRNA adjusted to surgical margins and neoadjuvant treatment for

CRLM: (B) R1-R2 surgical margins and neoadjuvant treatment for CRLM; and (C) R1-R2 surgical margins and no neoadjuvant treatment for CRLM

DISCUSSION

Although hepatectomy with curative intent is considered the best approach for CRLM and the advances in systemic therapies for liver-only stage IV CRC increased the number of patients eligible to hepatectomy, more than half of patients develop recurrent disease after surgery (27). Except for *RAS* and *BRAF* mutations and MMR deficiency, which predict response to targeted therapy, prognostication for patients with resectable CRLM is exclusively based on clinicopathological factors (6). In fact, *RAS* and *BRAF* mutations and MMR status are yet to be confirmed in prognostication and decision making in actual clinical management of resectable *versus* non-resectable CRLM (28–30) . Hence, accurate prediction of the recurrence risk in these patients remains an unmet clinical need.

Alterations in DNA damage response (DDR) and repair are recognized events within the carcinogenesis, and deficiencies or imbalances in DNA repair pathways provide the rational for a number of cytotoxic and targeted agents (31). MMR remains the unique DNA repair pathway applicable to CRC clinical practice. However, recent data showing that the prevalence of somatic DDR defects in CRC ranges between 10% and 30% and predict to worse outcomes and resistance to therapy may change this scenario (21,32). A recent report have also suggested that these mutations may also predict pre-operative chemotherapy response and post-operative survival in CRLM patients (23). Of DDR and DNA repair pathways, genes involved with the repair of DSB are somatically mutated in up to 20% of CRC (33), but the influence of DSBR alterations in CRLM remains unknown. The present study observed *RAD51* and *XRCC5* overexpression in deficient MMR and exposed to neoadjuvant chemotherapy prior to hepatectomy for CRLM, and an association between *XRCC5* overexpression and better PFS and OS.

HRR pathway functions by using a homologous DNA strand as a template to perform error free repair at DSB sites (34). The role of RAD51 and BRCA1 as tumor suppressors was confirmed by their action in homologous recombination-mediated DNA repair (35). While mean fold-change of *RAD51* denoted overexpression (2.76, $p= 0.0015$), the opposite was observed for *BRCA1* (-2.64; $p<0.0001$) in liver metastasis compared to adjacent matched healthy tissues. Moreover, *RAD51* was particularly overexpressed in patients who underwent neoadjuvant treatment for

CRCLM. It has been suggested that RAD51 overexpression increases tumor resistance to crosslinking agents (such as oxaliplatin) and topoisomerase inhibitors (such as irinotecan), both used in neoadjuvant setting of liver-only stage IV CRC (36). Importantly, it has been suggested that increasing RAD51 expression is one of the mechanisms by which HRR deficient cells restore HRR function or replication fork stability (37,38). Also, it has been reported to be associated with advanced T stage (39) and poorer OS (40) in CRC. However, survival analyses did not show significant associations for *RAD51* upregulation in our cohort.

BRCA1 encodes a nuclear phosphoprotein involved in preserving genomic stability, repair of DNA DSB through HRR and alternative NHEJ (41). Although mutations in *BRCA1* respond to nearly 50% of all inherited breast and ovarian cancers (42), *BRCA1* gene silencing is a very frequent event in sporadic breast cancer, and it is correlated with its progression and overall survival (43). In CRC, allelic loss at the *BRCA1* locus occurs in 40% of all sporadic cases, and epigenetic silencing of *BRCA1* has been reported in patients with unresectable sporadic CRC. Both mechanisms are associated with *BRCA1* downregulation, which predicts short overall survival and poor response to oxaliplatin in patients with metastatic CRC (44,45). Data on BRCA1 in CRLM are scarce, but it has been recently reported that individual somatic *BRCA1* mutations are found in 2.2% of resected CRLM. Nevertheless, in our cohort, *BRCA1* was downregulated in CRLM, and it was not associated with clinicopathological features.

Finally, we investigated *XRCC5*/Ku80, a subunit of the Ku heterodimer that binds to DSB and is part of the core of classical NHEJ (c-NHEJ). Contrary to HRR, NHEJ performs a template independent DSB repair. Previous studies have described both overexpression and downregulation of NHEJ pathway genes and proteins in colorectal cancer. Upregulation of Ku70 and Ku80 and substantial activation of the NHEJ pathway are associated with resistance to chemoradiotherapy (46), and downregulation or loss of these proteins are related to higher genomic instability (47) and better response to radiotherapy in colorectal tumors. In our cohort, overexpression of *XRCC5* was more frequent in patients who received neoadjuvant chemotherapy prior to hepatectomy and whose CRLM harbor MMR deficiency. Data on the association between *XRCC5*/Ku80 expression and MMR status in CRC are scarce. Our findings differ from a recent report that dMMR/MSI-

high CRC exhibit reduced XRCC5 expression (48). However, this study was conducted with primary CRC rather than CRLM. Although the concordance of MMR between primary CRC and distant metastases is likely to be high (49), *XRCC5* fold-induction may reflect cellular response against neoadjuvant chemotherapy induced DNA damage in CRLM.

Univariate analyses of PFS and OS also identified *XRCC5* mRNA levels as possible prognostic factor for recurrence or death. Although overexpression of *XRCC5* was not confirmed as an independent predictor of OS after multivariate analyses, a tendency of decreased *XRCC5* as contributor to shorter OS was observed (HR IC95% = 9.120 (0.918 - 9.612); p=0.059). Regarding PFS, although the multivariate model including surgical margins, neoadjuvant treatment for CRLM and XRCC5 mRNA levels concomitantly was statistically significant at $p<0.001$ level, only neoadjuvant treatment for CRLM and surgical margins after hepatectomy were confirmed as independent prognosticators. However, we observed decreased *XRCC5* gene expression in neoplastic tissues of CRLM adjusted for positive surgical margins (R1-R2), which may predict to poorer PFS in those patients who received neoadjuvant treatment for CRLM compared to those who did not receive it.

MMR deficient pattern (clinically referred as MSI-high) is assessed by immunohistochemistry and indicates to the loss of expression of MLH1/PMS2 but with intact MSH2/MSH6 or the contrary (50). In this study, MMR deficiency was associated with synchronous disease and an interval between CRC and CRLM inferior to 12 months. However, in stage IV CRC, MMR deficiency is predictive for response to immunotherapy, but no prognostic advantage was found in this setting (51,52). In our cohort, MMR deficiency due to lack of MLH1 or MSH6 protein expression occurred in 22% (11/50) of the patients. This MMR deficiency rate is much higher than the reported for stage IV CRC population (3-5%) (53). Despite no statistical significance for the association between MMR deficiency and neoadjuvant treatment for CRLM, 9 patients with dMMR underwent chemotherapy prior to hepatectomy. Indeed, it is well documented that treated rectal cancer may show decreased or absent MMR protein expression, especially with MSH6 and PMS2 (54,55). In our cohort, 5 dMMR CRLM occur due to loss of MSH6. Since a high concordance rates between primary CRC and matched liver metastases molecular

phenotypes, a confirmatory evaluation of MMR deficiency in these cases should be performed in primary colorectal tumors (50).

Inflammation-related parameters have been shown to have prognostic value in numerous cancers, including CRC and liver metastases (56,57). Increased NLR, results from lymphocytopenia and/or a high neutrophil count and may cause a poor immune response against the tumor and the metastatic process. Therefore, NLR is an acknowledged and potentially useful inflammation-based prognostic parameter in solid tumors (58). Additionally, tumors with dMMR are known to display several differentiating characteristics, such as increased mutational burden, and presence of high levels of tumor-infiltrating lymphocytes, including CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes, T-helper cell 1 and cytotoxic T-lymphocytes (59). Consistently, our study also has shown that MMR deficiency is associated with neutrophil-to-lymphocyte ratio superior to the cohort median value (median NLR > 2.59). The association of dMMR and NLR in CRC has been previously reported, and patients with dMMR CRC were more likely to have higher NLR (60,61), which in turn predicts poorer DFS and OS and is associated with a more aggressive tumor phenotype. However, we did not identify a prognostic value for NLR, nor for the other evaluated inflammatory-blood index, LMR and PLR, in our cohort of patients with resectable CRLM.

There are multiple limitations of this study. First, our cohort followed 50 patients, but we could evaluate the molecular features of only 32 (64%). Second, since data from primary CRC has been retrospectively retrieved, a significant lack of information occurred for several patients, weakening the statistical power. Third, most of the patients assessed for gene and protein expression underwent neoadjuvant treatment for CRLM (68%), which may have induced DNA damage to neoplastic cells without resulting in cell death and thus influencing in the observed changes in DSBR pathway. Finally, the short duration of follow-up time was insufficient to evaluate 5-year survival outcomes and precisely conclude which patients developed late disease recurrence.

In conclusion, our results suggest a role for *XRCC5* as a prognosticator in resectable CRLM. Low XRCC5 mRNA levels may predict worse post-operative survival, particularly in patients with positive surgical margins and who did not receive neoadjuvant chemotherapy for CRLM. Nevertheless, prospective studies

with larger sample sizes, including matched primary CRC and covering the molecular mechanisms of XRCC5/Ku80 regulation in CRLM are warranted for further conclusions. Also, if there is role for XRCC5/Ku80 as therapeutical target in metastatic CRC and CRLM are yet to be elucidated.

REFERENCES

1. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. Ann Surg. 2006;244(2):254–9.
2. Platell CFE. Changing patterns of recurrence after treatment for colorectal cancer. Int J Color Dis. 2007;22:1223–31.
3. Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, Langeberg WJ, Kelsh MA, Mowat FS, et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: Review and meta-analysis of prognostic factors. Clin Epidemiol. 2012;4(1):283–301.
4. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical Score for Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer. Ann Surg. 1999;230(3):309.
5. De Jong MC, Pulitano C, Ribero D, Strub J, Mentha G, Schulick RD, et al. Rates and patterns of recurrence following curative intent surgery for colorectal liver metastasis: An international multi-institutional analysis of 1669 patients. Ann Surg. 2009;250(3):440–7.
6. Spelt L, Andersson B, Nilsson J, Andersson R. Prognostic models for outcome following liver resection for colorectal cancer metastases : A systematic review. Eur J Surg Oncol. 2012;38(1):16–24. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2011.10.013
7. Bronte G, Rolfo C, Peeters M, Russo A. How to find the Ariadne ' s thread in the labyrinth of salvage treatment options for metastatic colorectal cancer ? Expert Opin Biol Ther. 2014;743–8.
8. Barbon C, Margonis GA, Andreatos N, Rezaee N, Sasaki K, Buettner S, et al. Colorectal Liver Metastases : Does the Future of Precision Medicine Lie in Genetic Testing ? J Gastrointes Sur. 2018; 22(7): 1286-1296.
9. Patel JN, Fong MK, Jagosky M. Colorectal Cancer Biomarkers in the Era of Personalized Medicine. J Pers Med. 2019;1:1–20.
10. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for

immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. Ann Oncol. 2019;30(8):1232–43.

11. Cremolini C, Benelli M, Fontana E, Pagani F, Rossini D, Fucà G, et al. Benefit from anti-EGFRs in RAS and BRAF wild-type metastatic transverse colon cancer: A clinical and molecular proof of concept study. ESMO Open. 2019;4(2):1–7.
12. Hou JT, Zhao LN, Zhang DJ, Lv DY, He WL, Chen B, et al. Prognostic value of mismatch repair genes for patients with colorectal cancer: Meta-analysis. Technol Cancer Res Treat. 2018;17:1–11.
13. Allegra CJ, Rumble RB, Hamilton SR, Mangu PB, Roach N, Hantel A, et al. Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti – Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy : American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. J Clin Oncol. 2015, 10;34 (2): 179-85.
14. Roock W De, Claes B, Bernasconi D, Schutter J De, Biesmans B, Fountzilas G, et al. On the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer : a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010;11(August):753–62.
15. Schirripa M, Bergamo F, Cremolini C, Casagrande M, Lonardi S, Aprile G, et al. BRAF and RAS mutations as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection. Br J Cancer. 2015;112(12):1921–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.142
16. Connor MJO. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. Mol Cell [Internet]. 2015;60(4):547–60. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.040
17. Dietlein F, Thelen L, Reinhardt HC. Cancer-specific defects in DNA repair pathways as targets for personalized therapeutic approaches. Trends Genet. 2014;30(8):326–39. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2014.06.003
18. Trenner A, Sartori AA. Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment. Front Oncol. 2019;9(December):1–10.
19. Kitao H, Iimori M, Kataoka Y, Wakasa T, Tokunaga E, Saeki H, et al. DNA replication stress and cancer chemotherapy. Cancer Sci. 2018;109(2):264–

71.

20. Takamatsu S, Brown JB, Yamaguchi K, Hamanishi J, Yamanoi K, Takaya H, et al. The utility of homologous recombination deficiency biomarkers across cancer types. preprint. 2021;1–36.
21. Reilly NM, Novara L, Di Nicolantonio F, Bardelli A. Exploiting DNA repair defects in colorectal cancer. Mol Oncol. 2019;13(4):681–700.
22. Arai H, Elliott A, Xiu J, Wang J, Battaglin F, Kawanishi N, et al. The Landscape of Alterations in DNA Damage Response Pathways in Colorectal Cancer. Clin Cancer Res. 2021;27(11):3334-3242.
23. Wang K, Liu M, Wang H, Jin K, Yan X, Bao Q, et al. Mutated DNA Damage Repair Pathways Are Prognostic and Chemosensitivity Markers for Resected Colorectal Cancer Liver Metastases. Front Oncol. 2021;11(March):1–12.
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods. 2001;25(4):402–8.
25. Detre S, Saccani Jotti G, Dowsett M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: Validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. J Clin Pathol. 1995;48(9):876–8.
26. Sylman JL, Mitrugno A, Atallah M, Tormoen GW, Shatzel JJ, Yunga ST, et al. The predictive value of inflammation-related peripheral blood measurements in cancer staging and prognosis. Front Oncol. 2018;8(mar):1–11.
27. Butte JM, Gönen M, Allen PJ, Kingham TP, Butte JM, Go M, et al. Recurrence After Partial Hepatectomy for Metastatic Colorectal Cancer : Potentially Curative Role of Salvage Repeat Resection. Ann Surg Oncol. 2015; Aug, 22(8):2761-71.
28. Tosi F, Magni E, Amatu A, Mauri G, Bencardino K, Truini M, et al. Effect of KRAS and BRAF Mutations on Survival of Metastatic Colorectal Cancer After Liver Resection : A Systematic Review and Meta-Analysis. Clin Colorectal Cancer. 2017;16(3):153–63.
29. Brudvik KW, Jones ÃRP, Giuliante F, Shindoh J, Passot ÃG, Chung ÃMH, et al. RAS Mutation Clinical Risk Score to Predict Survival After Resection of Colorectal Liver Metastases. Ann Surg. 2019;269(1).
30. Gagnière J, Dupré A, Gholani SS, Pezet D, Boerner T, Gönen M, et al. Is Hepatectomy Justified for BRAF Mutant Colorectal Liver Metastases ? Ann

Surg. 2018; 271(1):147 - 154.

31. Li L, Guan Y, Chen X, Yang J, Cheng Y. DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. Front Pharmacol. 2021;11(February):1–13.
32. Heeke AL, Pishvaian MJ, Brody JR, Chen W, Marshall JL. Prevalence of Homologous Recombination – Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types abstract. Am Soc Clin Oncol Educ B. 2018;1–13.
33. Muzny DM., Bainbridge MN., Chang, K.; Dinh, H.H.; Drummond JA., Fowler G., Kovar, C.L.; Lewis, L.R.; Morgan MB., Newsham I. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature. 2012;487(7407):330–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature11252
34. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR, Angeles L. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;18(8):495–506.
35. Zhao W, Steinfeld JB, Liang F, Chen X, David G, Ma CJ, et al. Promotion of RAD51-mediated homologous DNA pairing by BRCA1-BARD1. Nature. 2018;550(7676):360–5.
36. Laurini E, Marson D, Fermeglia A, Aulic S, Fermeglia M, Pricl S. Pharmacology & Therapeutics Role of Rad51 and DNA repair in cancer : A molecular perspective. Pharmacol Ther. 2020;107492. Available from: https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107492
37. Quigley D, Alumkal JJ, Wyatt AW, Kothari V, Lloyd P, Aggarwal R, et al. Analysis of circulating cell-free DNA identifies multi-clonal heterogeneity of. Cancer Discov. 2017;1–17.
38. Zellweger R, Dalcher D, Mutreja K, Berti M, Schmid JA, Herrador R, et al. Rad51-mediated replication fork reversal is a global response to genotoxic treatments in human cells. J Cell Biol. 2015;208(5):563–79.
39. Lee JH, Bae AN, Jung SJ. Clinicopathological and Prognostic Characteristics of RAD51 in Colorectal Cancer. Medicina (Kaunas) 2020; 56 (2): 48.
40. Tennstedt P, Fresow R, Simon R, Marx A, Terracciano L, Petersen C, et al. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. Int J cancer. 2013;2126:2118–26.
41. Badie S, Carlos AR, Folio C, Okamoto K, Bouwman P, Jonkers J, et al. BRCA1 and CtIP promote alternative non- homologous end-joining at uncapped

telomeres. EMBO J. 2015;34(3):410–24.

42. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K, Mooij TM, Jervis S, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. JAMA. 2017;317(23):2402–16.
43. Ruscito I, Gasparri ML, Marco MP De, Costanzi F, Besharat AR, Papadia A, et al. The Clinical and Pathological Profile of BRCA1 Gene Methylated Breast Cancer Women : A Meta-Analysis. Cancers (Basel) 2021;1–14.
44. Garcia JM, Rodriguez R, Dominguez G, Silva J, Provencio M, Silva J, et al. Prognostic significance of the allelic loss of the BRCA1 gene in colorectal cancer. Gut. 2003;1756–64.
45. Moutinho C, Martinez-cardús A, Santos C, Navarro-pérez V, Martínez-balibrea E, Musulen E, et al. Epigenetic Inactivation of the BRCA1 Interactor SRBC and Resistance to Oxaliplatin in Colorectal Cancer. J Natl Cancer Inst. 2013; 106(1):322.
46. Pucci S, Polidoro C, Joubert A, Mastrangeli F, Tolu B, Benassi M, et al. Ku70, Ku80, sClusterin: a “cluster” of predicting factors for neoadjuvant chemoradiotherapy treatment response in patients affected by locally advanced rectal cancer. Int J Radiat Oncol. 2016; 97(2):381-388. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.10.018
47. Beggs AD, Domingo E, McGregor M, Presz M, Johnstone E, Midgley R, et al. Loss of expression of the double strand break repair protein ATM is associated with worse prognosis in colorectal cancer and loss of Ku70 expression is associated with CIN. Oncotarget. 2012;3(11):1348–55.
48. Arora M, Kumari S, Singh J, Chopra A, Chauhan SS. PAXX , Not NHEJ1 Is an Independent Prognosticator in Colon Cancer. Front Moll Biosc. 2020;7(October):1–15.
49. He W, Hu W, Wang F, Rong Y, Yang L, Xie Q. Comparison of Mismatch Repair Status Between Primary and Matched Metastatic Sites in Patients With Colorectal Cancer. J Natl Compr Canc Netw. 2019;17(10).
50. Chen W, Frankel WL. A practical guide to biomarkers for the evaluation of colorectal cancer. Mod Pathol. 2019; 32(Suppl1):1-15. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41379-018-0136-1
51. Jin Z, Sinicrope FA. Prognostic and predictive values of mismatch repair

deficiency in non-metastatic colorectal cancer. Cancers (Basel). 2021;13(2):1–16.

52. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: A pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. Clin Cancer Res. 2014;20(20):5322–30.
53. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. J Clin Oncol. 2005;23(3):609–18.
54. Kuan S, Ren B, Brand R, Dudley B, Reetesh K. Neoadjuvant therapy in microsatellite stable colorectal carcinoma induces concomitant loss of MSH6 and Ki67 expression. Hum Pathol. 2017; 63:33-39. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2017.02.003
55. Vilkin A, Halpern M, Morgenstern S, Brazovski E, Gingold-belfer R, Boltin D, et al. How reliable is immunohistochemical staining for DNA mismatch repair proteins performed after. Hum Pathol. 2014;45(10):2029–36. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2014.07.005
56. Song Y, Yang Y, Gao P, Chen X, Yu D, Xu Y, et al. The preoperative neutrophil to lymphocyte ratio is a superior indicator of prognosis compared with other inflammatory biomarkers in resectable colorectal cancer. BMC Cancer. 2017;1–8.
57. Patel M, Mcsorley ST, Park JH, Roxburgh CSD, Edwards J, Horgan PG, et al. The relationship between right-sided tumour location , tumour microenvironment , systemic inflammation , adjuvant therapy and survival in patients undergoing surgery for colon and rectal cancer. Nat Publ Gr. 2018;118(5):705–12. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2017.441
58. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. J Natl Cancer Inst. 2014;106(6):1–11.
59. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wick EC, Elizabeth M, Taube JM, et al. The vigorous immune microenviroment of microssatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. Cancer Discov. 2015;5(1):43–51.
60. Pine JK, Morris E, Hutchins GG, West NP, Jayne DG, Quirke P, et al. Systemic

neutrophil-to-lymphocyte ratio in colorectal cancer : the relationship to patient survival , tumour biology and local lymphocytic response to tumour. Br J Cancer. 2015;113(2):204–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2015.87

61. Park JH, Powell AG, Roxburgh CSD, Horgan PG, Mcmillan DC. Mismatch repair status in patients with primary operable colorectal cancer : associations with the local and systemic tumour environment. Br J Cancer. 2016;114(5):562–70. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.17

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo sugerem um papel para o gene da via de reparo do DNA por junção de extremidades não homólogas *XRCC5* como um potencial fator prognóstico nas metástases hepáticas ressecáveis secundárias ao câncer colorretal. Níveis reduzidos de *XRCC5* foram associados a um maior risco de progressão e morte nos pacientes com MHCCR. Embora a análise multivariada de sobrevida não tenha confirmado *XRCC5* como fator prognóstico independente, a tendência estatística sugere que níveis reduzidos na expressão de *XRCC5* podem predizer a um maior risco de recorrência e pior sobrevida pós-operatória nos pacientes submetidos á hepatectomia, particularmente naqueles com margens cirúrgicas positivas e que não receberam quimioterapia perioperatória. No entanto, estudos prospectivos com tamanhos de amostra maiores, incluindo tumores colorretais primários pareados com a metástase hepática e que incluam os mecanismos moleculares da regulação de *XRCC5*/Ku80 nas metástases são necessários para conclusões adicionais. Além disso, se há papel para XRCC5/Ku80 como alvo terapêutico no câncer colorretal metastático ainda não foram elucidados.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Incrementar o tamanho amostral e o tempo de seguimento com intuito de aumentar o poder estatístico e validar os dados observados até o momento.
- Avaliar a expressão proteica de RAD51 e BRCA1 em metástases hepáticas de tumores colorretais.
- Avaliar a expressão proteica de MSH2 e PMS2 para, junto aos dados de MLH1 e MSH6, determinar o status de MSI
- Validar a sensibilidade e especificidade dos componentes da via de reparo de quebras dupla do DNA na predição do risco de recorrência e da sobrevida em pacientes com metástases hepáticas de tumores colorretais submetidos à hepatectomia .

6 ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nome:_____
Assinatura do Participante:_____
Data:_____

Nome:_____
Assinatura do Pesquisador:_____
Data:_____

Nome:_____
Assinatura da Testemunha:_____
Data:_____

7 ANEXO II – FICHA DE COLETA DE DADOS

Identificação:

Número do paciente na pesquisa: _____

Nome do paciente: _____

Data Nascimento: ___/___/_____

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

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

Nome da Mãe: _____

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

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

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

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

TUMOR PRIMÁRIO

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

Colonoscopia

Data: ___/___/_____

Localização da lesão primária: ( ) Cólon Direito (incluindo transverso) ( ) Colón Esquerdo (e sigmoide)

( ) Reto

Biópsia: ( ) Adenocarcinoma bem diferenciado ( ) Adenocarcinoma Moderadamente diferenciado ( ) Adenocarcinoma pouco diferenciado

Estadiamento: T ____ N _____ M _____ EC: ____ EP _____

Metástases: ( ) Sim ( ) Não Se sim, ( ) Hepáticas ( ) Extra-Hepáticas**_____

Número de lesões Hepáticas:_____ Bilateral: ( ) Sim ( )Não

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

Tamanho da maior lesão (mm): _____

Cirurgia do tumor primário

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

Quimioterapia *Neoadjuvante*: ( ) Sim ( ) Não

Se sim: N° Ciclos:_____ Esquema: _____

Radioterapia *Neoadjuvante*: ( ) Não ( ) Sim ; se Sim, Localização: ( ) Sitio primário

( ) Outro:_____

Quimioterapia *Adjuvante*: ( ) Sim ( ) Não,

Se sim: N° Ciclos:_____ Esquema: _____

Data da cirurgia: ___/___/_____

Cirurgia realizada:

( ) Colectomia Direita ( ) Colectomia Esquerda ( ) Colectomia Total ( ) Procto-colectomia

( ) Outra:_____

Hospital: ( )HSR ( ) Outro: _____

Anatomopatológico

Localização: ( ) Cólon Direito ( ) Cólon Esquerdo ( )Reto

Diferenciação: ( ) Pouco Diferenciado ( ) Moderadamente diferenciado ( ) Bem diferenciado

Mucina: ( ) Não ( )Sim

Margens cirúrgicas: ( )comprometidas ( )livres

Invasão perineural: ( )Não ( )Sim

Invasão linfovascular: ( ) Não ( )Sim

Número LFN ressecados: _____ Número LFN comprometidos: _____

Presença de MSI: ( ) Não ( ) Sim

RAS: ( ) Selvagem ( ) Mutado

BRAF: ( ) Selvagem ( ) Mutado

Segundo tumor colônico sincrônico: ( ) Não ( ) Sim

METÁSTASE HEPÁTICA

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

Imagem

Data: ___/___/_____

Número de lesões Hepáticas:_____ Bilateral: ( ) Sim ( )Não

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

Tamanho da maior lesão (mm): _____

Quimioterapia Neoadjuvante: ( ) Sim ( ) Não

Se sim: N° Ciclos:_____ Esquema: _____

Quimioterapia Intra-arterial: ( ) Não ( ) Sim

Cirurgia: No mesmo momento do tumor primário: ( )Sim ( )Não

Data da cirurgia: ___/___/_____

CEA *pré-operatório (último antes da cirurgia)*: _____

Modalidade: ( )aberta ( )vlp

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

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

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

Tempo de internação hospitalar: _____ dias

Complicações:_____

Clavien-Dindo[$]: ( )I ( )II ( )IIIA ( )IIIB ( )IVA ( )IVB ( )V

Data do óbito: ____/____/_____

Hemograma pré-operatório:

Data: ___/___/_____

Hemoglobina:_____

Hematócrito: _____

Leucócitos totais: _____

Neutrófilos***: _____ (absoluto) _____ % (relativo)
Linfócitos: _____ (absoluto) _____ % (relativo)
Monócitos: _____(absoluto) _____ % (relativo)
Plaquetas: _____

Anatomopatológico

Número de lesões: _____

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

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

SEGUIMENTO:

Data da Última Consulta: ___/___/_____.

Recidiva da doença: ( ) Não ( ) Sim

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

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

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

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

Esquemas: _____

Local:_____

ÓBITO: Data: __/__/__

LEGENDA:

&:DII = Doença Inflamatória Intestinal: Doença de Crohn, Retocolite Ulcerativa; ***IMC**= Índice de

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

8 ANEXO III - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: ANTONIO NOCCHI KALIL

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

Versão: 1

CAAE: 72393917.8.0000.5335

Instituição Proponente: ISCMPA

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.261.736

Apresentação do Projeto:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

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

Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

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

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

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

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

Continuação do Parecer: 2.261.736

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

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

PORTO ALEGRE, 06 de Setembro de 2017

Assinado por:
ELIZETE KEITEL
(Coordenador)

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