

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

INFLUÊNCIA DA LATERALIDADE NA EXPRESSÃO E PROGNÓSTICO DE
GENES DE REPARO AO DANO DE DNA NO CÂNCER COLORRETAL

TESE DE DOUTORADO

JULIANO DE OLIVEIRA SILVEIRA

PORTO ALEGRE, FEVEREIRO DE 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**INFLUÊNCIA DA LATERALIDADE NA EXPRESSÃO E PROGNÓSTICO DE
GENES DE REPARO AO DANO DE DNA NO CÂNCER COLORRETAL**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular do Centro de
Biotecnologia da UFRGS como
requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor.

JULIANO DE OLIVEIRA SILVEIRA

JENIFER SAFFI – ORIENTADORA

EDUARDO CREMONESE FILIPPI CHIELA – CO-ORIENTADOR

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2023

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA, LOCALIZADO NA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE, SOB ORIENTAÇÃO DA DOUTORA JENIFER SAFFI E CO-ORIENTAÇÃO DO DOUTOR EDUARDO CREMONESE FILIPPI CHIELA. APOIO FINANCEIRO: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPQ).

BANCA EXAMINADORA

NICOLAS CARLOS HOCH

LABORATÓRIO DE ESTABILIDADE GENÔMICA
DEPT. DE BIOQUÍMICA - INSTITUTO DE QUÍMICA - USP

GUIDO LENZ

LABORATÓRIO DE SINALIZAÇÃO CELULAR
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA - UFRGS

RODRIGO LIGABUE BRAUN

(RELATOR E SUPLENTE)
DEPT. DE FARMACOCICIÊNCIAS – UFCSPA

Sumário

Lista de abreviaturas	6
Índice de figuras e tabelas	8
Resumo	9
Abstract	10
Introdução	11
1. Câncer colorretal	11
1.1 Epidemiologia	11
1.2 Biologia molecular do CCR	13
1.3 Lateralidade	14
2. Vias de Resposta ao Dano de DNA	17
2.1 Reparo de Malpareamento (MMR)	19
2.2 Reparo por Excisão de Bases (BER)	21
2.3 Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)	22
2.4 Reparo de Quebras Duplas	26
2.4.1 Recombinação Homóloga (HRR)	29
2.4.2 União das Extremidades Não Homólogas (NHEJ)	31
2.5 Anemia de Fanconi (FA)	34
2.6 Síntese Translesão (TLS)	36
Objetivo Geral	41

Objetivos específicos	41
Manuscrito do artigo	42
Discussão	60
Conclusão e perspectivas	74
Referências	77
Apêndice	90

Lista de abreviaturas

5-FU: 5-fluorouracil

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

BAX: Bcl-2-associated X protein

BER: Base excision repair

CCR: Câncer colorretal

CIMP: CpG island methylator phenotype

CMS: Consensus Molecular Subtype

CPF: Check Point Factor

CRC: Colorectal cancer

DDR: DNA damage response/repair

FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics

GG-NER: Global genome nucleotide excision repair

GGR: Global genome repair

HR: Homologous recombination

HRR: Homologous recombination repair

IARC: International Agency for Research on Cancer

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LSC: Left side colorectal cancer

MLH: MutL homolog

MMR: Mismatch repair

MSH: MutS homolog

MSI: Microsatellite instability

MSI-H: Microsatellite instability-high

MSI-L: Microsatellite instability-low

NER: Nucleotide excision repair

NHEJ: Non-homologous end joining

OGG1: 8-oxoguanine DNA glycosylase 1

p53: Tumor protein 53

POLB: DNA polymerase beta

Rad3 (ATR): Ataxia telangiectasia and Rad3 related

ROS: Reactive oxygen species

RSC: Right side colorectal cancer

SCNA: Somatic copy number alteration

TC-NER: Transcription-coupled nucleotide excision repair

TCR: Transcription-coupled repair

TGF-beta: Transforming growth factor beta

TLS: Translesion synthesis

Índice de figuras e tabelas

Figura 1. Distribuição de casos e óbitos para os 10 principais cânceres mais comuns em 2020 para ambos os sexos no mundo.	11
Figura 2. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.	11
Figura 3. Representação da vascularização do cólon e do reto.	14
Figura 4. Esquema de fontes de dano ao DNA, tipos de lesões e vias de resposta ao dano de DNA.	17
Figura 5. Complexos funcionais de ciclinas e quinases dependentes de ciclina (CDKs) e as vias de sinalização envolvidas na regulação dos pontos de controle do ciclo celular em resposta ao dano do DNA induzido por radiação ionizante (IR).	18
Figura 6. Principais características da via de reparo do mismatch e seus sensores de lesão, proteínas mediadoras e proteínas efetoras.	20
Figura 7. Principais características da via de reparo por excisão de bases e seus sensores de lesão, proteínas mediadoras e proteínas efetoras.	22
Figura 8. Principais características da via de reparo por excisão de nucleotídeos e seus sensores de lesão, proteínas mediadoras e proteínas efetoras.	23
Figura 9. Principais características da via de reparo de quebras duplas e suas proteínas mediadoras e efetoras.	25
Figura 10. Principais características da via de reparo de Anemia de Fanconi e suas proteínas mediadoras e efetoras.	28
Tabela 1. Proposta de taxonomia do câncer colorretal refletindo diferenças biológicas significativas nos subtipos moleculares consenso baseados na expressão gênica.	13

Resumo

O carcinoma colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna comum e uma das principais causas de morte em humanos. Sua patogênese molecular é heterogênea e afeta vários genes. A instabilidade genômica é um aspecto chave da carcinogênese do CCR e está intimamente ligada à resposta ao dano do DNA (DDR). As vias de reparo estão intrinsecamente associadas ao desenvolvimento do câncer. Novas evidências mostram que o CCR do lado esquerdo e do lado direito têm diferenças clínicas e pré-clínicas. Este estudo teve como objetivo investigar o impacto dos perfis transcricionais de DDR na sobrevida em diferentes sub-localizações do cólon e do reto. Regressão de Cox, análise de sobrevivência e expressão gênica diferencial foram usadas. O CRC do lado direito (RSC) teve a expressão gênica de DDR associada a um maior risco de morte, enquanto o CRC do lado esquerdo (LSC) e o câncer retal tiveram a maior expressão gênica associada a um risco menor. Todos os genes de DDR significativos tiveram menor expressão associada à melhor sobrevida em RSC, ao contrário de LSC e reto. Nossos resultados demonstram que RSC é diferente de LSC e reto, que possuem perfis de expressão de DDR semelhantes.

Palavras-chave: câncer colorretal, lateralidade, reparo de DNA, expressão gênica, sobrevida, risco de morte

Abstract

Colorectal carcinoma (CRC) is a common malignancy and a major cause of death in humans. Its molecular pathogenesis is heterogeneous and affects various genes. Genomic instability is a key aspect of CRC carcinogenesis and closely linked to DNA damage response (DDR). Repair pathways are intrinsically associated with cancer development. New evidence shows that left-sided and right-sided CRC have clinical and preclinical differences. This study aimed to investigate the impact of transcriptional DDR profiles on survival in different colon and rectal sub-locations. Cox regression, survival analysis, and differential gene expression were used. Right-sided CRC (RSC) had DDR gene expression associated with a higher risk of death, while left-sided CRC (LSC) and rectal cancer had most gene expression associated with a lower risk. All significant DDR genes had lower expression associated with better survival in RSC, unlike LSC and rectum. Our results demonstrate that RSC is distinct from LSC and rectum, which have similar DDR expression profiles.

Keywords: colorectal cancer, laterality, DNA repair, gene expression, survival, risk of death

Introdução

1. Câncer colorretal

1.1 Epidemiologia

Os cânceres de cólon e reto são a terceira malignidade mais comum em todo o mundo, com mais de 1 milhão de novos casos diagnosticados a cada ano. O carcinoma colorretal (CCR) é o terceiro com mais casos e o segundo em número de mortes no mundo (Cancer (IARC)n.d.; **Figuras 1 e 2**). Em 2022, cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e quase 10,0 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) ocorreram no mundo. O câncer de mama feminino ultrapassou o câncer de pulmão como o câncer mais comumente diagnosticado, com uma estimativa de 2,3 milhões de novos casos (11,7%), seguidos por câncer de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%) (Sung et al., 2021).

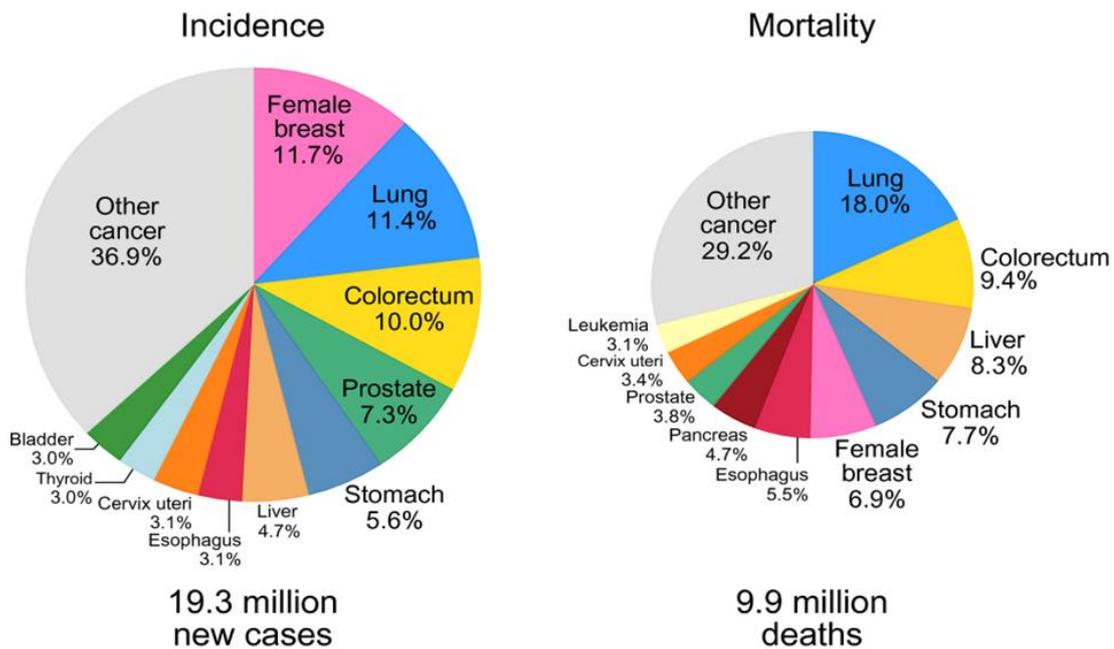


Figura 1. Distribuição de casos e óbitos para os 10 principais cânceres mais comuns em 2020 para ambos os sexos no mundo. Adaptado de Sung et al., 2021.

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens  Mulheres 	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. INCA, 2019.

1.2 Biologia molecular do CCR

Tanto os CCRs familiares quanto os esporádicos compartilham uma série de mutações e outras características moleculares (Norris et al., 2015). A patogênese molecular do CCR é heterogênea e pode afetar vários genes, seguindo uma sucessão mutagênica, traduzida em uma sequência morfológica, começando com a formação do adenoma e culminando no carcinoma (Testa et al., 2018). Os principais *drivers* de CCR são mutações nos genes *BRAF*, *NRAS* e *KRAS* e Instabilidade de Microssatélites (MSI), enquanto Subtipos Moleculares de Consenso (CMS) (Guinney et al., 2015) representam marcadores genômicos para novas classificações de subtipos de CCR (**Tabela 1**). O sistema de classificação CMS é usado principalmente em pesquisa para entender melhor a heterogeneidade molecular do câncer colorretal e para identificar potenciais alvos terapêuticos. No entanto, há um interesse crescente na aplicação clínica do CMS para ajudar a orientar as decisões de tratamento e prever os resultados dos pacientes. A instabilidade de microssatélites (MSI) é um tipo de alteração genética que ocorre quando o comprimento das sequências de DNA chamadas microssatélites, que são trechos repetitivos de nucleotídeos, é alterado devido a defeitos na maquinaria de reparo de malpareamento. Além disso, a instabilidade genômica é reconhecida como uma parte importante da carcinogênese do CCR e está intimamente ligada à resposta ao dano do DNA.

Tabela 1. **Proposta de taxonomia do câncer colorretal, refletindo diferenças biológicas significativas nos subtipos moleculares consenso baseados na expressão gênica.**

CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
MSI imunitário	Canônico	Metabólico	Mesenquimal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP alto, hipermutação	SCNA alto	Status MSI misturado, SCNA baixo, CIMP baixo	SCNA alto
Mutações de BRAF		Mutações de KRAS	
Infiltração e ativação imunitária	Ativação de WNT e MYC	Desregulação metabólica	Infiltração estromal, ativação de TGF- β , angiogênese
Pior sobrevida após recidiva			Pior sobrevida geral e sem recidiva

CIMP, fenótipo metilador de ilhas CpG (do inglês *CpG island methylator phenotype*); MSI, Instabilidade de microssatélites (do inglês *microsatellite instability*); SCNA, alterações somáticas de número de cópias (do inglês *somatic copy number alterations*).

1.3 Lateralidade

Nos últimos anos, também foi reconhecido que nem todos os cânceres de cólon são iguais. Uma característica distintiva chave pode ser a lateralidade (lado direito versus lado esquerdo). Essa distinção é baseada tanto na origem embriológica diferencial (o cólon direito originando-se do

intestino médio, enquanto o cólon esquerdo originando-se do intestino posterior) quanto no suprimento vascular (o cólon direito é suprido pela artéria mesentérica superior, enquanto o cólon esquerdo é suprido pela artéria mesentérica inferior) do cólon direito e esquerdo (**Figura 3**). Além disso, outros estudos demonstraram uma variedade de diferenças genéticas e histológicas notáveis entre os cânceres de cólon direito e esquerdo (Nawa et al., 2008).

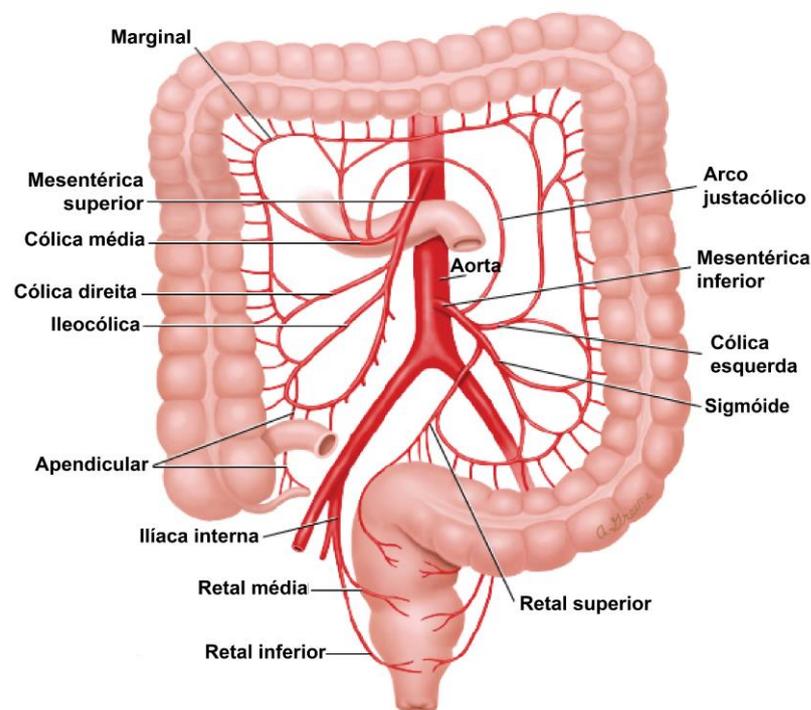


Figura 3. Representação da vascularização do cólon e do reto. (Blood Supply to the Colon and Rectum - UpToDate, n.d.)

O câncer colorretal se origina do tecido epitelial do cólon e pode se desenvolver no lado direito ou esquerdo do cólon. Dependendo da posição, os CCRs se comportam de forma diferente em termos de progressão da doença e sobrevida global. A diferença entre esses tumores pode ser atribuída à origem anatômica e de desenvolvimento, ou fatores

carcinogênicos distintos (como diferença na população bacteriana nos dois lados do cólon, ou exposição a nutrientes e ácidos biliares distintos) ou uma combinação desses fatores (Glebov et al., 2003).

O CCR é tradicionalmente tratado como uma doença coesa, especialmente em estudos pan-câncer (Y. Zhang et al., 2022). Trabalhos mais recentes separam cólon e reto, por suas diferenças acentuadas na sobrevida em curto prazo, complicações, recorrência e resposta aos tratamentos (van der Sijp et al., 2016). Novas evidências mostram que o CCR do lado esquerdo e direito apresentam diferenças observadas em ambientes clínicos, bem como em estudos pré-clínicos, incluindo risco de metástase (Benedix et al., 2010; Vatandoust et al., 2015), resposta à terapia (Benavides et al., 2019), imunogenicidade (Baek, 2019), histologia (Nawa et al., 2008), incidências relacionadas ao sexo e à idade (Iacopetta, 2002), e composição imunitária do microambiente tumoral (Takasu et al., 2020). Como se pode observar, as principais diferenças descritas até o momento dizem respeito ao comportamento clínico ou às características histopatológicas dos tumores. Além disso, a literatura diverge sobre o impacto da lateralidade na expressão gênica, resposta a fármacos e sobrevida de pacientes com CCR. Além disso, o panorama transcricional das vias de resposta a danos no DNA (DDR) e suas implicações clínicas de prognóstico ainda não foram exploradas levando-se em consideração a lateralidade.

2. Vias de Resposta ao Dano de DNA

O reparo de danos no DNA é um mecanismo importante que ajuda a manter a estabilidade do genoma e prevenir o desenvolvimento do câncer e outras patologias. As vias de resposta a danos no DNA (DDR) estão intrinsecamente associadas ao desenvolvimento do câncer e sua desregulação gera taxas elevadas de mutação, aumento da instabilidade genômica e aumento da heterogeneidade intratumoral (Burrell et al., 2013; Chae et al., 2016). Uma das principais maneiras pelas quais os danos ao DNA contribuem para o câncer é levando a mutações nos genes que regulam o crescimento e a divisão celular. Essas mutações podem fazer com que as células se dividam e cresçam descontroladamente, levando à formação de tumores. Além disso, o dano ao DNA também pode interromper o funcionamento normal das vias de reparo do DNA, levando a um acúmulo de danos não reparados no DNA (**Figura 4**). Isso pode desencadear um processo chamado instabilidade genômica, que se caracteriza por um aumento na frequência de mutações e anormalidades cromossômicas nas células. Essa instabilidade genômica pode contribuir para o desenvolvimento e progressão do câncer. No CCR, as vias DDR desempenham um papel importante tanto na carcinogênese quanto na resposta à terapia (Ijsselsteijn et al., 2020; Reilly et al., 2019).

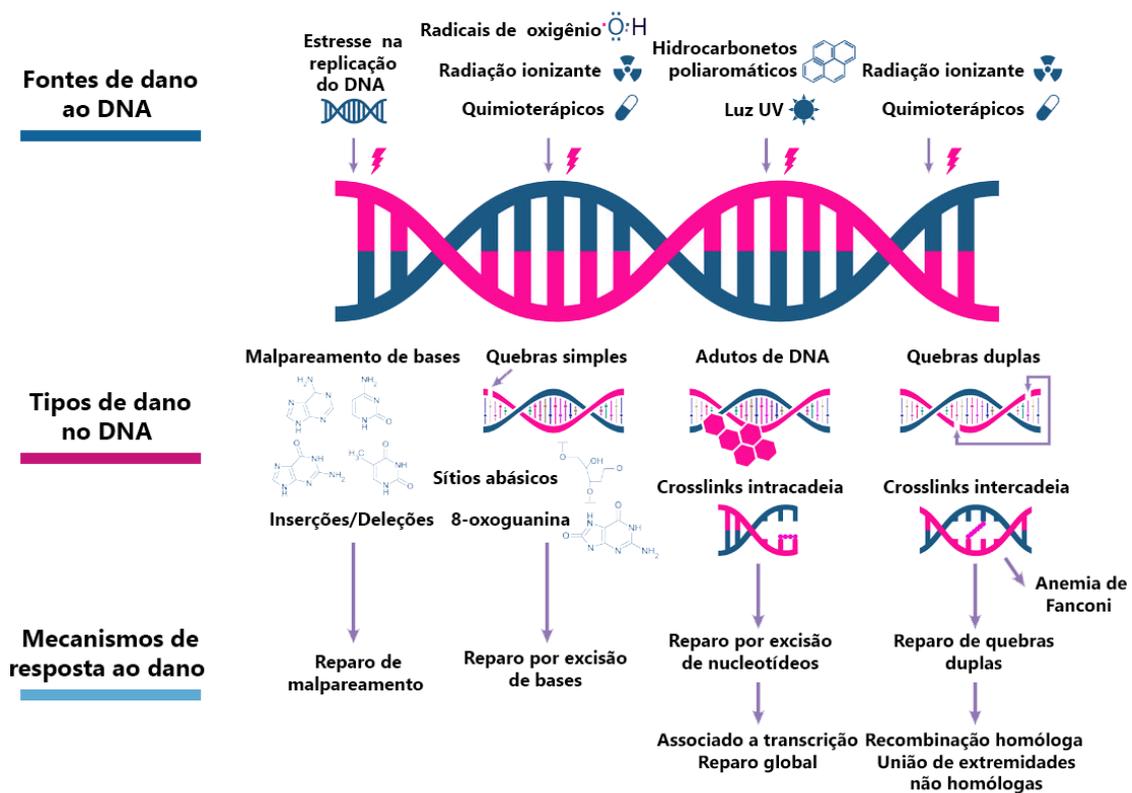


Figura 4. Esquema de fontes de dano ao DNA, tipos de lesões e vias de resposta ao dano de DNA. Adaptado de (Bourré, L. , 2020).

O uso de biomarcadores moleculares no estadiamento do câncer colorretal é limitado, levando a diagnósticos e tratamentos incorretos. Biomarcadores baseados em reparo de DNA mostram potencial como ferramentas diagnósticas e terapêuticas (Laporte et al., 2018).

As seções a seguir trazem uma breve descrição das vias de reparo de dano ao DNA abordadas neste estudo.

2.1 Reparo de Malpareamento (MMR)

O sistema de reparo de malpareamento (MMR, do inglês *Mismatch Repair*) é uma importante via que funciona na manutenção da integridade genômica. Está envolvido na recombinação mitótica e meiótica, apoptose, rearranjo do gene da imunoglobulina, hipermutação somática e outros processos (Olave & Graham, 2022). O MMR funciona reconhecendo a base incompatível e removendo o nucleotídeo incorreto da fita de DNA recém-sintetizada. O nucleotídeo correto é então inserido na posição correta pela DNA polimerase (**Figura 6**). As principais proteínas envolvidas no MMR são os homólogos de MutS (MSH) e os homólogos de MutL (MLH). Em humanos, existem quatro homólogos de MutS: MSH2, MSH3, MSH6 e MSH4/MSH5, e três homólogos de MutL: MLH1, PMS2 e MLH3 (Muthye & Lavrov, 2021). Em geral, os homólogos MutS reconhecem e se ligam à base incompatível, enquanto os homólogos MutL facilitam o processo de reparo a jusante, incluindo a remoção e substituição do nucleotídeo incorreto (Qiu et al., 2015). As interações entre as proteínas MSH e MLH são essenciais para o bom funcionamento da via MMR. Deficiências no MMR dão origem à hipermutabilidade e ao fenômeno chamado instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *Microsatellite Instability*). MMR promove um DDR mediado por uma quinase de sinalização, ATM e a ATM relacionada à Rad3 (ATR), em resposta a vários tipos de danos ao DNA, incluindo alguns encontrados em regimes de quimioterapia amplamente utilizados (Li et al., 2016).

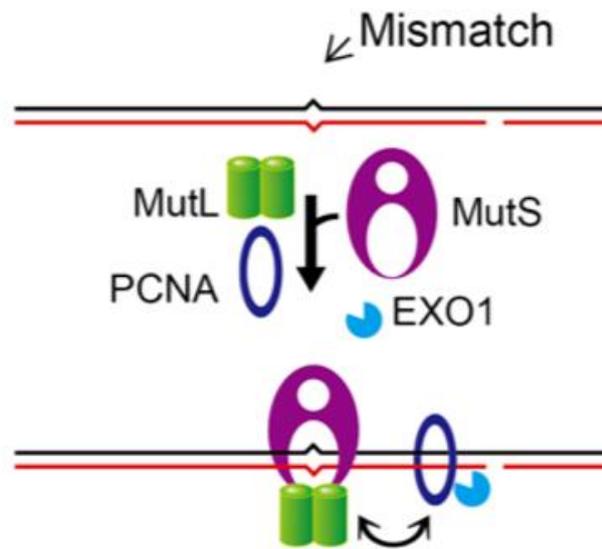


Figura 6. Principais características da via de reparo de malpareamento e seus sensores de lesão, proteínas mediadoras e proteínas efetoras. Adaptado de (R. Huang & Zhou, 2021).

MSI está associada a um maior risco de câncer colorretal, bem como outros tipos de câncer. De fato, estima-se que cerca de 15-20% dos cânceres colorretais são MSI-alto (MSI-H) e são causados por um defeito na via MMR (Zeinalian et al., 2018). Esses cânceres são caracterizados por um alto número de mutações em genes como *TGF-beta*, *BAX* e *p53*, que estão envolvidos na proliferação celular, apoptose e reparo do DNA.

O câncer colorretal MSI-H tende a ter melhor prognóstico do que outros subtipos de câncer colorretal, pois é menos provável que metastatize e responda bem à imunoterapia (Ozcan et al., 2018). No entanto, os mecanismos pelos quais o câncer colorretal MSI-H se desenvolve e progride não são totalmente compreendidos, e mais pesquisas são necessárias para

entender completamente a relação entre reparo de malpareamento de DNA, instabilidade de microssatélites e câncer colorretal.

2.2 Reparo por Excisão de Bases (BER)

O reparo por excisão de bases (BER, do inglês *Base Excision Repair*) corrige principalmente danos no DNA originados por processos de oxidação, desaminação e alquilação. Tais lesões de base causam uma pequena distorção na estrutura da hélice do DNA (Grundy & Parsons, 2020). O BER **(Figura 7)** é iniciado por uma glicosilase de DNA que reconhece e remove a base danificada, deixando um sítio abásico que é processado posteriormente por uma via curta de reparo (*short-patch*) ou via longa de reparo (*long-patch*) que usa amplamente diferentes proteínas para completar o reparo (Zhao et al., 2021). São conhecidas pelo menos 11 glicosilases de DNA distintas em mamíferos, cada uma reconhecendo algumas lesões frequentemente relacionadas com alguma sobreposição em especificidades (Krokan & Bjørås, 2013). As AP endonucleases clivam o *backbone* do DNA no local da lesão, facilitado pela proteína APE1 em humanos. Além disso estão envolvidas a DNA polimerase, que preenche a lacuna usando a fita intacta como molde, facilitada pela Polimerase beta (POLB) em humanos e a ligase que, liga a fita recém-sintetizada à fita quebrada, facilitada pela Ligase III em humanos (Grundy & Parsons, 2020). Um exemplo de DNA glicosilase é a 8-oxoguanina DNA glicosilase (OGG1), que reconhece e remove especificamente a 8-oxoguanina causada pelo estresse oxidativo. O uso de BER como alvo terapêutico? tem sido uma estratégia interessante para sobrecarregar as

células cancerígenas com danos no DNA, melhorar a eficácia da radioterapia ou quimioterapia, ou contribuir em uma combinação letal com uma mutação/perda de função específica das células do câncer através da letalidade sintética (Grundy & Parsons, 2020).

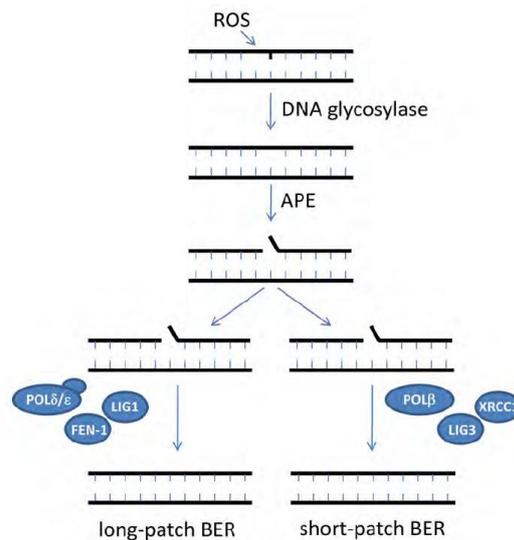


Figura 7. Principais características da via de reparo por excisão de bases e seus sensores de lesão, proteínas mediadoras e proteínas efetoras. ROS = espécie reativa de oxigênio. Adaptado de (Biedermann et al., 2011).

O papel do BER no CCR foi objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa (Leguissamo et al. (2017) e Vodicka et al. (2018)). Ambos os estudos apontam para a influência significativa de BER em características tumorais, prognóstico, e resposta à quimioterapia. Leguissamo e colaboradores identificaram que o aumento na expressão de genes e proteínas de BER está associado a características tumorais mais agressivas e desfechos piores no CCR. Além disso, desequilíbrios em BER, como a superexpressão de MPG, foram capazes de sensibilizar células de câncer de cólon deficientes em MMR ao 5-FU e TMZ, o que levou à depleção de ATP e acúmulo de lactato. Isso sugere que a

alteração do reparo de DNA e metabolismo, especificamente através da superexpressão de MPG, pode ser uma estratégia potencial para superar a resistência quimioterapêutica ao 5-FU em CCR com deficiência de MMR.

Vodicka et al. (2018), por outro lado, focaram na capacidade de reparo de DNA por BER como um fator que pode afetar o prognóstico do paciente e a resposta à quimioterapia. Seus resultados indicam que BER em mucosa adjacente não maligna estava positivamente associado à sobrevida global ($P = 0,007$) e à sobrevida livre de recidiva ($P = 0,04$). Além disso, em análise multivariada, bons respondedores à terapia nos estágios II e III do TNM com expressão de BER elevada em mucosa apresentaram melhor sobrevida geral. Ainda mais, a sobrevida geral desses pacientes foi ainda melhor na presença de uma expressão de BER diminuída no tecido tumoral. Isso sugere que o nível de BER pode estar associado à sobrevida dos pacientes, representando um potencial biomarcador prognóstico, útil para a previsão da resposta à terapia e abordagem individualizada para pacientes.

2.3 Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)

O reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês *Nucleotide Excision Repair*) é uma via importante para lidar com adutos volumosos induzidos por diferentes agentes ambientais. Estes adutos podem ser produtos químicos como agentes intercalantes, radiação ultravioleta e outros mutagênicos. O NER elimina essas lesões de DNA não necessariamente estruturalmente relacionadas por meio de uma reação multiplataforma do tipo "cortar e remendar". As duas subvias do NER, reparo global do genoma

(GGR - *Global Genome Repair*) e reparo acoplado à transcrição (TCR - *Transcription Coupled Repair*), diferem nos modos de reconhecimento dos danos (X. Zhang et al., 2022). A subvia do GG - NER previne a mutagênese ao sondar o genoma em busca de lesões que distorcem a hélice, enquanto o TC-NER remove as lesões que bloqueiam a transcrição para permitir a expressão gênica, evitando assim a morte celular (Marteijn et al., 2014). As principais proteínas envolvidas no NER são XPA, XPB e XPD (helicases que separam a dupla hélice de DNA no local danificado), XPG (uma endonuclease que cliva a fita de DNA), TFIIH (um complexo proteico que funciona na transcrição e reparo do DNA), XPC-hHR23B (proteínas responsáveis por reconhecer e iniciar o processo de reparo), XPE e XPF (endonucleases que clivam a fita de DNA), DNA polimerase e ligase (**Figura 8**). A XPA reconhece e se liga ao local danificado, facilitando o recrutamento de outros fatores de reparo.

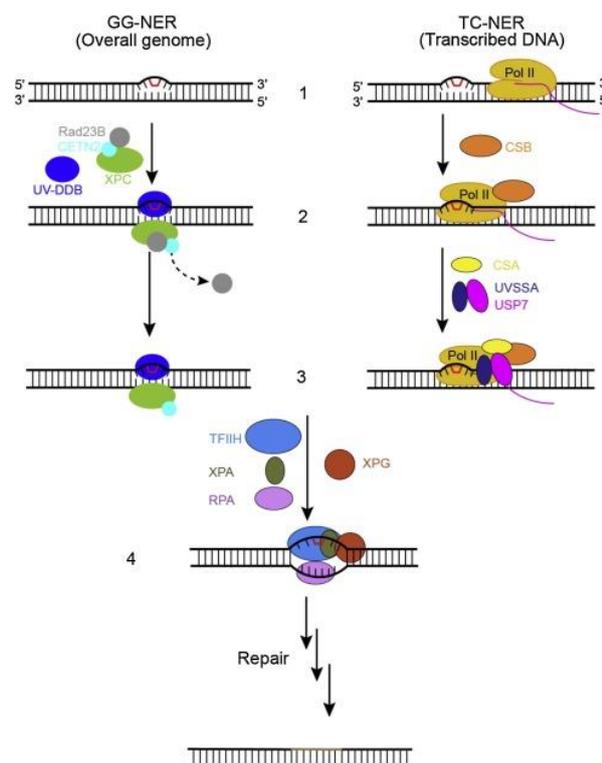


Figura 8. Principais características da via de reparo por excisão de nucleotídeos e seus sensores de lesão, proteínas mediadoras e proteínas efetoras. Adaptado de (Wang et al., 2018).

Alguns estudos buscaram elucidar os efeitos de NER do CCR. O estudo de Ye et al. (2022) explora a capacidade reduzida de reparo por NER devido a variantes genéticas e seu possível papel na suscetibilidade ao câncer. Através de uma meta-análise, os autores descobriram que variantes em genes ERCC1 (rs11615 e rs3212986), ERCC2 (rs1799793) e ERCC5 (rs17655) estavam associadas à suscetibilidade ao câncer colorretal (CCR). Descobriu-se que a variante rs11615 no gene ERCC1 diminuiu o risco de CCR, enquanto as variantes rs3212986 em ERCC1, rs1799793 em ERCC2 e rs17655 em ERCC5 aumentaram o risco de CCR. Os resultados indicam uma associação significativa entre essas variantes genéticas no contexto de vias de reparo de NER e a suscetibilidade ao CCR, particularmente na população asiática.

Contrariamente, Melton et al. (2003) não encontraram associações significativas entre polimorfismos em genes de reparo de NER (XPD, XPF, XPG, ERCC1) e a ocorrência de CCR. No entanto, uma associação fraca, mas significativa, foi encontrada entre a variante C no gene RR (XRCC3) e o CCR. Dziki et al. (2018) fornecem mais evidências do papel do NER no CCR, observando uma diminuição significativa na capacidade de NER em linfócitos de pacientes com CCR em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, identificaram uma associação entre o risco aumentado de CCR e variantes genéticas no gene XPC. Por outro lado, Chang-Claude et al. (2016)

ressaltam que, apesar de uma grande quantidade de estudos conduzidos, ainda não há conclusões firmes que possam ser traduzidas para a clínica. Esses estudos destacam a complexidade e as nuances da interação entre as vias de reparo do DNA e a suscetibilidade ao CCR, e apontam para a necessidade de pesquisas adicionais e bem projetadas.

2.4 Reparo de Quebras Duplas

As quebras duplas do DNA são um tipo de dano ao DNA que ocorre quando ambas as fitas da molécula de DNA são quebradas. Eles podem ser gerados por uma variedade de fatores externos, como radiação ionizante (raios X e gama), agentes químicos ou exposição à luz ultravioleta, bem como por processos celulares normais, como replicação ou estresse oxidativo (Wright et al., 2018). Existem duas vias principais envolvidas no reparo de quebras de fita dupla de DNA: recombinação homóloga (HR) e junção de extremidade não homóloga (NHEJ) (**Figura 9**). HR usa uma sequência de DNA homóloga como modelo para reparar a quebra, enquanto NHEJ liga diretamente as extremidades quebradas da molécula de DNA sem a necessidade de um modelo (Chang et al., 2017; Yamamoto & Hirasawa, 2022). A escolha entre essas duas vias depende do estágio do ciclo celular, da presença de extremidades quebradas do DNA e da disponibilidade de um molde homólogo. É importante que as células reparem as quebras de fita dupla do DNA de forma eficaz e eficiente para evitar rearranjos e mutações cromossômicas que podem levar a disfunções como o câncer.

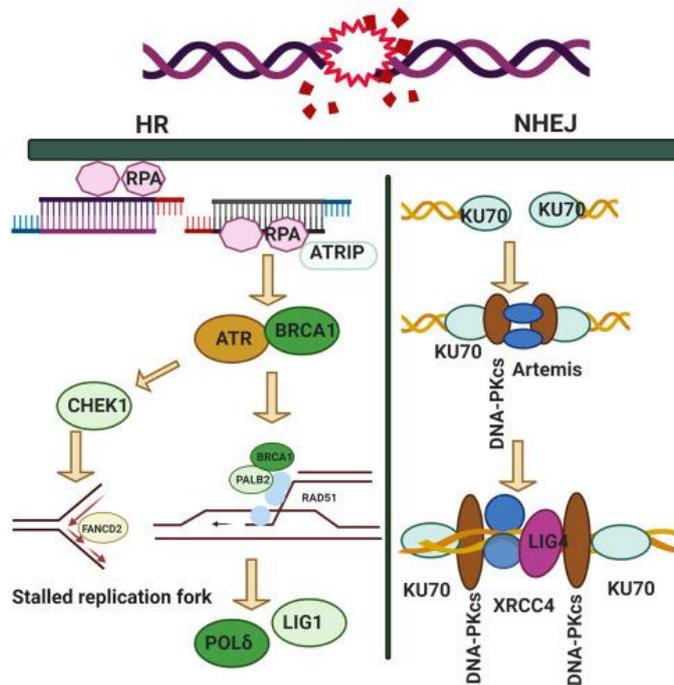


Figura 9. Principais características da via de reparo de quebras duplas e suas proteínas mediadoras e efetoras. Adaptado de (R. Huang & Zhou, 2021).

Avaliando os efeitos das quebras duplas no CCR Pardini et al. (2016) destacaram a importância das variações genéticas nas regiões 3' não traduzidas dos genes alvo que podem afetar a ligação de microRNAs, resultando em expressão diferencial de proteínas. Eles hipotetizaram que os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos locais de ligação do microRNA (miRSNPs) nas vias de reparo do DNA podem ser responsáveis por diferenças interindividuais na capacidade de reparo do DNA e, portanto, afetar a suscetibilidade ao CCR e o prognóstico. Eles analisaram a associação de miRSNPs em genes de reparo de DSBs com o risco de CCR e o resultado clínico, encontrando uma forte associação entre o genótipo CC de rs2155209 no MRE11A e um risco reduzido de CCR.

Tomasini e colaboradores (2021) discutiram como o direcionamento de genes envolvidos nas respostas ao estresse de replicação e no reparo de DSBs poderia proporcionar novas oportunidades terapêuticas para o tratamento de CCRs. Eles examinaram a oportunidade de considerar agentes terapêuticos que visam o reparo do DNA e a resposta ao estresse de replicação do DNA como estratégias para explorar defeitos genéticos ou funcionais nas vias de resposta ao dano do DNA (DDR) por meio de mecanismos letais sintéticos, ainda não explorados no CCR. Apesar dos avanços na identificação de características clínicas e moleculares com significativo valor prognóstico e preditivo em CRC, as opções terapêuticas ainda dependem principalmente de regimes baseados em quimioterapia convencional. Os autores sugerem que o direcionamento de genes envolvidos nas respostas ao estresse de replicação e reparo de DSBs de DNA, como MRE11, RAD51, RAD52 e POLQ, pode ser uma estratégia para expandir o espectro de opções terapêuticas sistêmicas, adaptando assim os tratamentos de CRC e melhorando o prognóstico da doença.

O estudo de Kato et al. (2015) investigou a sensibilidade de pacientes com CCR à quimioterapia em relação à expressão de proteínas de reparo de quebras duplas. Os pacientes com expressão negativa de MRE11 e RAD51 tiveram uma redução significativamente maior no tamanho do tumor e maior tempo de sobrevida livre de progressão em comparação com os casos com expressão positiva. Isso sugere que a ausência de expressão de proteínas de reparo de DSB pode ser um indicativo de maior sensibilidade à quimioterapia,

e a presença dessas proteínas pode ser um útil indicador prognóstico para pacientes com CCR.

Sartori (2019) discutiu a importância de se explorar a capacidade aumentada de reparo de DSB por células cancerígenas como uma potencial abordagem terapêutica. Devido ao estresse de replicação induzido por oncogenes e aos defeitos adquiridos nos mecanismos de resposta a danos no DNA, as células cancerígenas dependem de um reparo eficiente de DSB para sua sobrevivência. Este fator também contribui para a resistência à radio e quimioterapia e, por fim, para a recorrência do câncer. No entanto, essas mesmas vulnerabilidades podem ser exploradas terapeuticamente para matar preferencialmente as células tumorais. Sartori destaca a validação clínica de tais abordagens, conhecidas como letalidade sintética, em cânceres que apresentam mutações nos genes supressores de tumor BRCA1 ou BRCA2. O autor também enfatiza a importância das abordagens de tratamento combinado e a letalidade sintética decorrente das interdependências da via de reparo de DSB.

2.4.1 Recombinação Homóloga (HRR)

O reparo por recombinação homóloga (HRR, do inglês *Homologous Recombination Repair*) permite que a célula acesse e copie as informações da sequência de DNA intacta para reparar danos ao DNA que afetam a outra fita da dupla hélice. As atividades enzimáticas necessárias para esse processo incluem busca de homologia, invasão da fita de DNA, reparo da síntese de DNA e restauração de cromossomos intactos (Wright et al., 2018). Variantes de

linhagem germinativa na via HR, compreendem pelo menos 10 genes, como *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *NBS1(NBN)*, *PALB2*, *RAD51C* e *RAD51D*, os quais levam à suscetibilidade hereditária a tipos específicos de câncer, incluindo os da mama, ovários, próstata e pâncreas (Yamamoto & Hirasawa, 2022). No geral, a recombinação homóloga é uma via dinâmica com múltiplos intermediários metaestáveis e reversíveis projetados para alcançar o reparo do DNA com alta fidelidade.

Cremolini et al. (2022) abordaram a deficiência no HRR (HRD) em CCR. O estudo envolveu a análise de sequenciamento de próxima geração, sequenciamento de transcriptoma completo e sequenciamento de exoma completo de amostras de CCR. Dos 9321 tumores de CCR analisados, 13.6% foram classificados como HRD e 86.4% como proficiente em recombinação homóloga (HRP). Descobriu-se que tumores HRD eram mais frequentes entre tumores com alta instabilidade de microsatélites ou reparo de erros de pareamento deficiente (MSI-H/dMMR) do que em tumores estáveis de microsatélites ou reparo de erros de pareamento proficiente (MSS/pMMR). Interessantemente, pacientes com tumores MSS/pMMR e HRD mostraram maior sobrevivência geral em comparação com tumores MSS/pMMR e HRP. Os autores concluíram que tumores HRD são um subgrupo distinto de CCRs MSS/pMMR com características moleculares e prognósticas específicas, sugerindo a eficácia potencial de agentes que alvejam o sistema de recombinação homóloga e inibidores de checkpoint imunológico neste subgrupo.

Por outro lado, Liang et al. (2022) investigaram o papel da via de recombinação homóloga (HR) na sensibilidade à quimioterapia e prognóstico de pacientes com CCR. O estudo envolveu a coleta de 35 amostras de pacientes com CCR após tratamento com quimioterapia e análise de dados de mutação e prognóstico clínico. Os autores descobriram que pacientes com tipo mutante de HR (HR-MUT) são menos propensos a experimentar metástases tumorais após receber quimioterapia. Além disso, o HR-MUT foi identificado como um preditor independente do prognóstico da quimioterapia para pacientes com CCR. Análises de enriquecimento de vias revelaram que o HR-MUT apresentava uma taxa significativamente menor de habilidade de reparo de danos no DNA, crescimento tumoral, atividade metastática e atividade de metabolismo de ácidos graxos do tumor, embora sua atividade de resposta imune fosse notavelmente maior. Conclui-se que o HR-MUT pode ser um marcador relevante para pacientes com CCR recebendo quimioterapia, uma vez que está estreitamente relacionado à melhoria do tempo de sobrevivência geral e à redução da resistência à quimioterapia.

2.4.2 União das Extremidades Não Homólogas (NHEJ)

As quebras duplas de DNA são o tipo mais perigoso de dano ao DNA porque podem resultar na perda de grandes regiões cromossômicas. Em todas as células de mamíferos, essas quebras que ocorrem ao longo do ciclo celular são reparadas predominantemente pela via de união das extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês *Non-Homologous End Joining*)

(Scully et al., 2019). As principais proteínas envolvidas no NHEJ são Ku70/Ku80, DNA-PKcs, Ligase IV, XRCC4, Artemis e DNA Ligase III (Chang et al., 2017). Ku70/Ku80 formam um complexo que se liga às extremidades quebradas do DNA e recruta outros componentes do NHEJ. A DNA-PKcs é uma quinase que fosforila componentes para promover o processo de reparo. A Ligase IV liga diretamente as extremidades quebradas do DNA, enquanto o XRCC4 estabiliza o complexo Ku70/Ku80 e promove a ligação mediada pela Ligase IV. A proteína Artemis está envolvida no processamento das extremidades do DNA na NHEJ, e a DNA Ligase III repara quebras de fita simples no DNA e também pode participar da via NHEJ. A via NHEJ utiliza proteínas que reconhecem, cortam, polimerizam e ligam as extremidades do DNA de maneira flexível. Essa flexibilidade permite que o NHEJ funcione em uma ampla gama de configurações de extremidades, com as junções de DNA reparadas resultantes frequentemente contendo mutações (Chang et al., 2017).

Kim et al. (2005) exploraram a relação entre mutações de repetição mononucleotídico na codificação do gene hRAD50, a formação da variante de splicing hMRE11 mutante, e a deficiência de MMR em tumores. As proteínas hRAD50 e hMRE11 formam um heterotrímero com NBS1, e esse heterotrímero está envolvido no reparo de quebra de DNA de dupla fita por recombinação homóloga e NHEJ. Seu estudo revelou que as mutações dos genes hRAD50 e hMRE11 em tumores deficientes em MMR estão relacionadas a defeitos no NHEJ. Eles descobriram que as linhagens celulares deficientes em MMR com

expressões reduzidas de hRAD50 e hMRE11 eram mais sensíveis à radiação gama, e essas linhas celulares apresentavam um NHEJ prejudicado. Isso sugere que mutações nos genes hRAD50 e hMRE11 em tumores deficientes em MMR podem resultar em alterações cromossômicas durante a progressão do tumor.

Davis et al. (2017) e Wang et al. (2022) exploraram mais profundamente a dualidade do papel do NHEJ na carcinogênese e no CCR. Davis et al. observaram que o NHEJ, embora tradicionalmente considerado uma proteção contra a instabilidade genômica, também pode promover a aberração cromossômica e a instabilidade genômica, particularmente em células que têm um defeito em uma das outras vias de reparo do DSB. Isso levanta a questão de como uma única via pode tanto suprimir quanto promover a carcinogênese, com o contexto genético subjacente ditando se o NHEJ promove ou suprime a carcinogênese e altera a resposta dos tumores aos terapêuticos convencionais. Wang et al. exploraram o papel da hipermetilação do DNA na patogênese do CCR e identificaram o TBX20 como um fator de transcrição que, quando hiporregulado com hipermetilação do promotor em tecidos de CRC de estágio inicial, pode resultar em um prognóstico pobre para pacientes com CRC. Eles descobriram que o TBX20 suprime a proliferação celular e o crescimento tumoral, prejudicando o reparo de quebra dupla fita mediado por NHEJ. Isso sugere que a inibição do reparo de DNA mediado por NHEJ pelo TBX20 pode servir como um potencial

biomarcador para prever o prognóstico de pacientes com CRC de estágio inicial e um alvo terapêutico para terapia combinada.

2.5 Anemia de Fanconi (FA)

A Anemia de Fanconi (FA, do inglês *Fanconi Anemia*) é uma doença autossômica recessiva causada por defeitos em pelo menos oito genes distintos FANCA, B, C, D1, D2, E, F e G (**Figura 10**) (Peake & Noguchi, 2022). O fenótipo clínico de todos os grupos é semelhante e é caracterizado por defeitos na medula óssea, propensão ao câncer e outros defeitos congênitos típicos (Gueiderikh et al., 2022). O principal fenótipo celular é a hipersensibilidade a danos no DNA, particularmente as pontes intercadeias (do inglês *crosslinks*) do DNA (García-de-Teresa et al., 2020). Os mecanismos de resistência a quimioterápicos variam de pessoa para pessoa e incluem inativação ou efluxo de drogas, alteração de alvo, inibição da morte celular, heterogeneidade do tumor e resposta ao dano do DNA (Gottesman, 2002). Uma causa primária da resistência à platina, por exemplo, é a restauração da via de reparo a danos no DNA da FA. Durante o tratamento do câncer, a via FA é ativa ou superexpressa para superar ou evitar os efeitos prejudiciais ao DNA dos fármacos anticâncer (Helleday et al., 2008). A compreensão fundamental da via de FA, que investigue o impacto da deficiência de FA, representa uma estratégia para prevenir a resistência a fármacos anti câncer, como a cisplatina utilizada no tratamento de CCR (Ghosal et al., 2020).

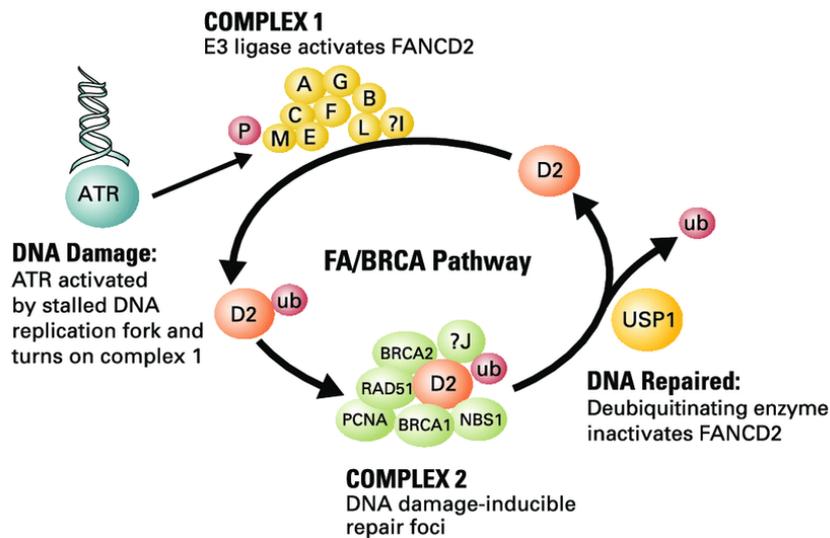


Figura 10. Principais características da via de reparo de Anemia de Fanconi e suas proteínas mediadoras e efetoras. Adaptado de (Kennedy & D'Andrea, 2006).

O estudo de Mini et al. (2022) discute a relação entre FA e CCR) sublinhando o papel crítico que a via de FA desempenha no sistema de resposta ao dano do DNA. Eles identificaram que as mutações germinativas bialélicas em um ou mais dos 22 genes de FA atualmente reconhecidos foram associadas à doença de Fanconi, enquanto as mutações monoalélicas germinativas, mutações somáticas ou a hipermetilação do promotor de alguns genes FANC aumentam o risco de desenvolvimento de câncer, incluindo CCR. A via FA é uma parte substancial do sistema de resposta ao dano do DNA que participa no reparo DNA por meio da recombinação homóloga e protege a estabilidade do genoma por meio da estabilização da forquilha de replicação. Estudos recentes revelaram associações entre os níveis de expressão do gene/proteína de FA (ou seja, genes FANC) e a progressão e resistência a medicamentos do CCR. Além disso, a via FA

representa um potencial alvo no tratamento do CCR, com as características do gene FANC contribuindo para a quimiossensibilização das células tumorais a agentes de ligação cruzada de DNA, como oxaliplatina e cisplatina.

O Consórcio EPICOLON (2016) e Galimi et al. (2006) fornecem mais observações sobre a ligação entre FA e CCR. O Consórcio EPICOLON realizou sequenciamento do exoma completo do DNA germinativo em 74 pacientes com CCR de 40 famílias espanholas não relacionadas com forte agregação de CCR compatível com um padrão de herança autossômica dominante e sem mutações em genes de CCR hereditário conhecidos. Eles descobriram um enriquecimento de variantes em genes da via de RDD de FA em sua coorte de CCR familiar, indicando que a via de FA pode desempenhar um papel importante na predisposição hereditária ao CCR. Galimi et al. analisaram o papel dos principais genes FA em CCR e descobriram que uma fração de pacientes com CCR apresentava alterações na via FA/BRCA, necessária para a ativação do reparo do DNA. Eles sugerem que uma compreensão mais clara da frequência de cada alteração nos genes FA e sua relação com as características histológicas e/ou clínicas no CCR é necessária.

2.6 Síntese Translesão (TLS)

Como já comentado anteriormente, o reparo do DNA é essencial para a sobrevivência celular. Em todos os domínios da vida, vias de reparo propensas a erros e livres de erros garantem a manutenção da integridade do genoma sob estresse. Os mecanismos mutagênicos de reparo de baixa

fidelidade ajudam a evitar a potencial letalidade associada a danos não reparados, tornando-os importantes para a manutenção do genoma e, em alguns casos, o modo preferido de reparo (Joseph & Badrinarayanan, 2020). No entanto, as células regulam cuidadosamente a escolha da via para restringir a atividade dessas vias apenas a certas condições. Um desses mecanismos de reparo é a síntese translesão (TLS, do inglês *Translesion Synthesis*), em que uma DNA polimerase de baixa fidelidade é empregada para sintetizar através de uma lesão. A maioria das polimerases de DNA recém-descobertas são especializadas na síntese translesão e no reparo do DNA, em vez da replicação. Embora as taxas de erro intrínseco sejam maiores para polimerases de translesão e reparo do que para polimerases replicativas, as polimerases especializadas aumentam a estabilidade do genoma e reduzem a tumorigênese (Yang & Gao, 2018). As principais polimerases envolvidas na síntese de translesão são DNA Polimerase η (Pol η ou Pol eta), DNA Polimerase ι (Pol ι ou Pol iota), DNA Polimerase κ (Pol κ ou Pol kappa) e DNA Polimerase ζ (Pol ζ - ou Pol zeta) (Yang & Gao, 2018). São polimerases especializadas que têm a capacidade de contornar tipos específicos de danos ao DNA, como os causados por luz ultravioleta, exposição química ou estresse oxidativo, e permitem que as células continuem a replicação do DNA. Pol η e ι têm altas taxas de erro e estão envolvidos no desvio de adutos de DNA volumosos ou danos oxidativos, enquanto Pol κ e ζ estão envolvidos no reparo sem erros de quebras de fita dupla de DNA e danos oxidativos (Hubscher et al., 2002; Shilkin et al., 2020).

Essas polimerases desempenham um papel vital na manutenção da estabilidade genômica. Em células de CCR, no entanto, o aumento da ativação da via TLS também pode contribuir para o desenvolvimento de resistência a quimioterápicos que danificam o DNA, como 5-fluorouracil (5-FU) e oxaliplatina, permitindo que as células se repliquem apesar dos danos causados pelas fármacos e continuem se dividindo (Silvestri & Landi, 2019).

O estudo de Xu et al. (2012) evidenciou que as polimerases TLS têm um papel crucial na instabilidade cromossômica, afetando a suscetibilidade e a metástase CCR. Através do estudo de quatro polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes de TLS em pacientes com CCR e controles, eles encontraram diferenças significativas na frequência do genótipo dos SNPs rs462779 e rs373572 entre os pacientes e controles em ambas as coortes. Em pacientes com CCR metastático, a frequência do genótipo AA do rs373572 aumentou significativamente em comparação com aqueles sem CCR metastático. Esses resultados sugerem que os polimorfismos nos genes TLS estão associados à suscetibilidade ao CCR na população chinesa e podem ser um novo biomarcador para a previsão do risco de metástase do CCR.

Por outro lado, Eoff et al. (2017) e Saffi et al. (2020) enfatizaram o papel de TLS na tolerância ao dano do DNA (DDT), contribuindo para a etiologia de vários tipos de câncer, incluindo o CCR. A revisão de Eoff et al. destaca o papel central de TLS na passagem de lesões de DNA induzidas por medicamentos, promovendo a heterogeneidade do tumor e envolvimento dessas enzimas na manutenção do nicho de células-tronco do câncer. Eles

sugerem a inibição de TLS como uma maneira de melhorar as terapias existentes. Saffi et al., por outro lado, apresentaram um estudo que avaliou o valor prognóstico da modulação molecular do reparo de quebras de fita dupla (XRCC2 e XRCC5), DDT/TLS (POLH, POLK e POLQ), e reparo de *crosslink* intercadeia em CCR esporádico. Os resultados indicaram que a baixa expressão ou não metilação de POLH e POLK estavam relacionadas a tumores com pior comportamento biológico. No entanto, a metilação de POLK estava associada a uma melhor sobrevida livre de doença. Portanto, POLK e POLH são potenciais biomarcadores prognósticos em CCR.

Justificativa

Estudar o DDR é crucial para entender o desenvolvimento e a progressão do câncer colorretal. Como já descrito anteriormente, o câncer colorretal é o terceiro câncer mais comum em todo o mundo e surge a partir de uma série de alterações genéticas e epigenéticas que se acumulam ao longo do tempo. Um dos principais mecanismos que impedem o acúmulo de mutações genéticas é o reparo de danos ao DNA. Compreender os mecanismos moleculares de DDR e os efeitos de sua expressão em diferentes sublocalizações no câncer colorretal também é importante para o desenvolvimento de novos tratamentos, definição de grupos para ensaios clínicos e diagnóstico.

Objetivo Geral

Investigar o impacto dos perfis transcricionais de reparo ao dano de DNA na sobrevida de pacientes com CCR e no risco em diferentes sublocalizações do cólon e do reto.

Objetivos específicos

- Definir uma lista completa de genes de reparo ao dano de DNA.
- Calcular curvas de sobrevida de pacientes com CCR para diferentes subseções do cólon e do reto utilizando a expressão gênica de genes de reparo a partir de *dataset* com dados de RNAseq de tumores de CCR.
- Calcular o risco de morte associado à expressão de genes de reparo em diferentes subseções do cólon e do reto utilizando a expressão gênica de genes de reparo a partir de *dataset* com dados de RNAseq de tumores de CCR.
- Calcular a expressão diferencial comparando diferentes subseções do cólon e do reto utilizando a expressão gênica de genes de reparo a partir de *dataset* com dados de RNAseq de tumores de CCR.
- Comparar as diferentes subseções e analisar o panorama da expressão gênica de genes de reparo no contexto da lateralidade no câncer colorretal.

Manuscrito do artigo

Manuscrito do artigo intitulado "Taking sides: laterality influence on gene expression of DNA damage repair in colorectal cancer" a ser submetido a periódico científico.

Laterality influence on gene expression of DNA damage repair in colorectal cancer

Juliano de Oliveira Silveira^{1,3}; Eduardo Filippi-Chiela²; Jenifer Saffi^{3,*} .

1 Centro de Biotecnologia, PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2 Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

3 Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Electronic address: jenifers@ufcspa.edu.br.

*** Corresponding Author:**

Jenifer Saffi

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Laboratório de Genética Toxicológica

#Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Porto Alegre, RS, Brazil

#+555133084021

ORCID: 0000-0002-5372-2934

Email: jenifers@ufcspa.edu.br

Abstract : Colorectal carcinoma (CRC) is the third most common malignancy worldwide, and second in number of deaths in the world. The molecular pathogenesis of CRC is heterogeneous and can affect several genes. Moreover, genomic instability is recognized as an important part of CRC carcinogenesis and is tightly connected to DNA damage response. DNA damage repair

(DDR) pathways are intrinsically associated with cancer development and establishment. Traditionally, CRC is considered as one coherent disease, however, new evidence shows that left and right-sided CRC present differences observed in clinical settings, as well as in pre-clinical studies. Therefore, this study aimed to investigate the impact of DDR transcriptional profiles on survival in different sublocations of the colon and rectum using Cox regression, survival analysis and differential gene expression. Right side CRC (RSC) has DDR genes' expression associated only with higher risk of death, while Left side CRC (LSC) and Rectum have most genes' expression associated with lower risk. The pattern is the same with survival analysis. All significant DDR genes had lower expression associated with better survival in RSC, as opposed to LSC and Rectum. Our results demonstrate that RSC is distinctively different from LSC and Rectum. LSC and Rectum have similar DDR expression profiles.

Keywords : colorectal cancer, DNA damage repair, laterality, survival, risk

1. Introduction

Cancers of the colon and rectum are the third most common malignancy worldwide, and over 1 million new cases are diagnosed each year. Colorectal carcinoma (CRC) is the third with the most cases and second in number of deaths in the world[1]. Both familial and sporadic cancers share a range of mutations and other molecular features[2]. The molecular pathogenesis of CRC is heterogeneous and can affect several genes, following a mutagenic succession, translated into a morphological sequence, starting with the formation of the adenoma, and ending in the carcinoma[3].

The main drivers of CRC are mutations in *BRAF*, *NRAS*, and *KRAS* genes and Microsatellite Instability (MSI), while Consensus Molecular Subtypes (CMS)[4] represent genomic markers for new classifications of CRC subtypes. Moreover, genomic instability is recognized as an important part of CRC carcinogenesis and is tightly connected to DNA damage response. DNA damage repair (DDR) pathways are intrinsically associated with cancer development and establishment for their dysregulation generates elevated mutation rates, increased genomic instability, and enhanced intra-tumor heterogeneity[5], [6]. In CRC, DDR plays an important role in both carcinogenesis and response to therapy[7], [8].

CRC is traditionally treated as one cohesive disease, especially in pan-cancer studies[9]. More recent works separate colon and rectum, for their accentuated differences in short-term survival, complications, recurrence, and response to treatments[10]. In embryo development,

the midgut gives rise to the distal duodenum, jejunum, ileum, cecum, ascending colon, and the proximal two-thirds of the transverse colon (right side). On the other hand, the hindgut develops into the distal one-third of the transverse colon, descending colon, sigmoid colon, and the rectum (left side and rectum)[11]. New evidence shows that left and right-sided CRC present differences observed in clinical settings, as well as in pre-clinical studies, including metastasis risk[12], [13], response to therapy[14], immunogenicity[15], histology[16], sex- and age-related incidences[17], and tumor microenvironment immune composition[18]. As can be seen, the main differences described so far concern the clinical behavior or histopathological characteristics of the tumors. Furthermore, the literature diverges on the impact of laterality on gene expression, drug response, and survival of CRC patients. However, the transcriptional landscape of DDR pathways and their clinical implications of prognosis had not yet been explored with laterality.

Therefore, in the present study, we aimed to investigate the impact of DDR transcriptional profiles on survival in different sublocations of the colon and rectum. Using a list of 189 genes of DDR pathways, we found that Right side colon (RSC) is distinctively different from Left side (LSC) and Rectum. The left side and Rectum have similar expression profiles and share more molecular similarities.

2. Materials and Methods

2.1. Data acquisition

We queried seven functional signaling pathways involved in DNA damage repair (DDR): homologous recombination (HRR), mismatch repair (MMR), base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER), nonhomologous end-joining (NHEJ), Fanconi anemia (FA), and translesion synthesis (TLS). The search resulted in 189 DDR genes which were used for further analysis. TCGA data were obtained from Broad GDAC Firehose (<https://gdac.broadinstitute.org/>, accessed on August 28th, 2020). Level 3 expression data for Colon and Rectum Adenocarcinoma (COADREAD) and available phenotype datasets were used. Primary tumor samples were analyzed, excluding metastatic tumor samples. Samples with unavailable relevant patient clinical information were also excluded.

2.2. Cox regression

Multivariable Cox hazard regressions were performed for expression levels of queried genes shown in Suppl. Table 1 and adjusted for clinical variables according to the available information. Diagnostic analyses of the models were performed based on Martingale and weighted Schoenfeld residual plots and tests; clinical variables available in the baseline models were stratified to meet the proportional hazards assumption when necessary; patients were censored at 1800 days. Results were considered significant when the p-value < 0.05 (95% CI). Details of the models are provided in Suppl. Table 2.

2.3. Survival analysis

For survival analysis, we used the Kaplan-Meier method to evaluate the correlation between overall survival time and gene expression. The median was used as a cutoff value for the classification of patients into high and low-expression groups. The curves were created after gene expression was discretized to the two groups. The statistical significance of overall survival was assessed using the Log-Rank test. All analyses were computed in the R statistical environment. Multivariable Cox proportional hazards, log-rank tests, and Kaplan-Meier curves were obtained using `survival`, `ggplot2` and `survminer` packages in R (version 3.3.1) environment.

2.4. Differential expression analysis

The differential gene expression analysis was performed on averaged CRC samples from each location to evaluate if they presented a statistically different value. The Wilcoxon rank test for paired data was applied to assess whether a gene was differentially expressed by comparing one sublocation with another. Statistical significance was determined using $p < 0.05$.

2.5. Contingency tables and Chi-squared

The CMS and MSI dataset were formatted as a contingency table using the `gplots` package, and graphical displays were generated using functions such as `balloonplot` and `mosaicplot` from the same package in R. The chi-square test of independence was performed using the `chisq.test` function, and the resulting Pearson residuals were extracted and visualized using the `corrplot` package.

3. Results

3.1. Colorectal cancer is not a cohesive disease

Initially, we investigated molecular aspects of colorectal cancer dividing the colon in left and right and comparing both with neoplasias of rectal origin. The Chi-square test demonstrates that CMS1 and high Microsatellite Instability are associated with RSC, suggesting that hallmarks of multiomic subtypes discretize the Colon on the Left and Right with distinct patterns (Fig 1). LSC and Rectum, on the other hand, are not associated with any variable. Driver mutations present another marker of difference in RSC. When retrieving mutations from the browser COSMIC[19], the top 13 mutated genes in RSC differ from left and rectum tumors, including BRAF high frequency in RSC, which characterizes CMS1 CRC subtype (Supp. Fig 1).

Figure 1

Oliveira-Silveira J et al

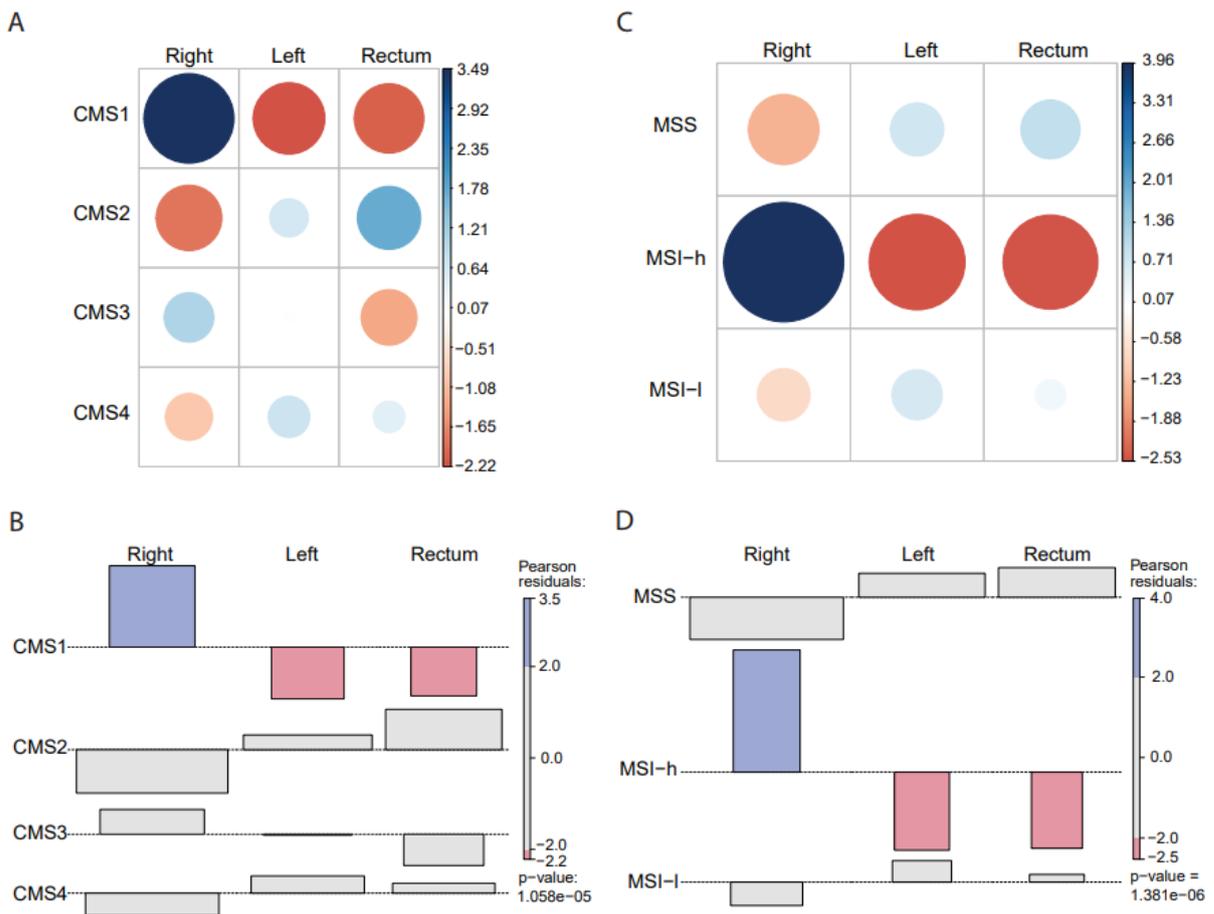
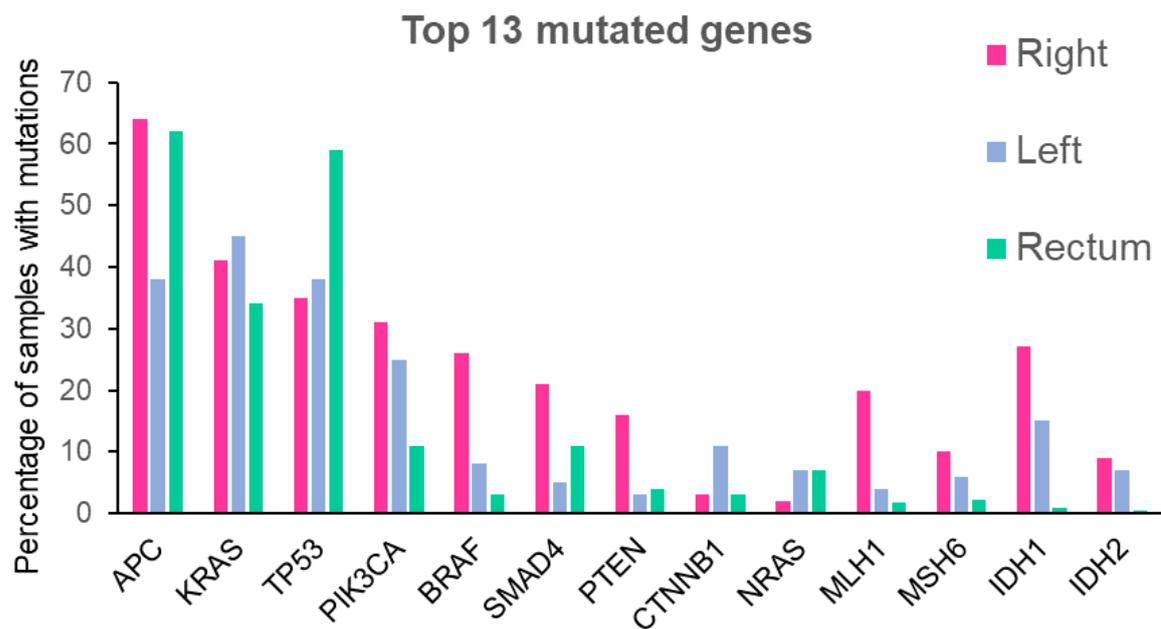


Figure 1 - **Consensus Molecular Subtype and Microsatellite Instability profiles are different in RSC from LSC and Rectum.** A and C: contingency tables for CMS and MSI status consecutively ($p < 0.05$). B and D: Chi-square calculation with Pearson residuals for CMS and MSI status consecutively. Pearson residuals were calculated to assess the nature of the dependence. Blue color indicates that the observed value is higher than the expected value if

the data were random. Red color specifies that the observed value is lower than the expected value if the data were random. CMS1, Consensus Molecular Subtype 1; CMS2, Consensus Molecular Subtype 2; CMS3, Consensus Molecular Subtype 3; CMS4, Consensus Molecular Subtype 4. RSC, Right Side Colon; LSC, Left Side Colon; MSS, Microsatellite stable; MSI-h, Microsatellite Instable High; MSI-l, Microsatellite Instable Low.



Supplemental Figure 1 - **Incidence of mutations in the top 13 most frequently mutated driver genes in colorectal cancer separated by anatomical site.**

To test the effect of segmentation of COADREAD dataset into Colon-Rectum, Left Colon-Right Colon and Rectum in risk of death association with expression of DDR genes, we performed Cox hazard regressions (p -value < 0.05) using 189 genes in each subgroup (Supp. Table S2, Supp File S4). Interestingly, there was a plethora of significant genes hidden in confounding factors when all samples were considered one group Colon and Rectum (13 genes). New genes showed up when the Colon only (5 genes) and Rectum (9 genes) were divided. Besides, more genes were discovered when Colon was further divided into Right (15 genes) and Left (12 genes) (Fig 2A). When divided into three sections (Right, Left and Rectum) a total of 36 genes were associated with the risk of death.

Figure 2

Silveira JDO et al

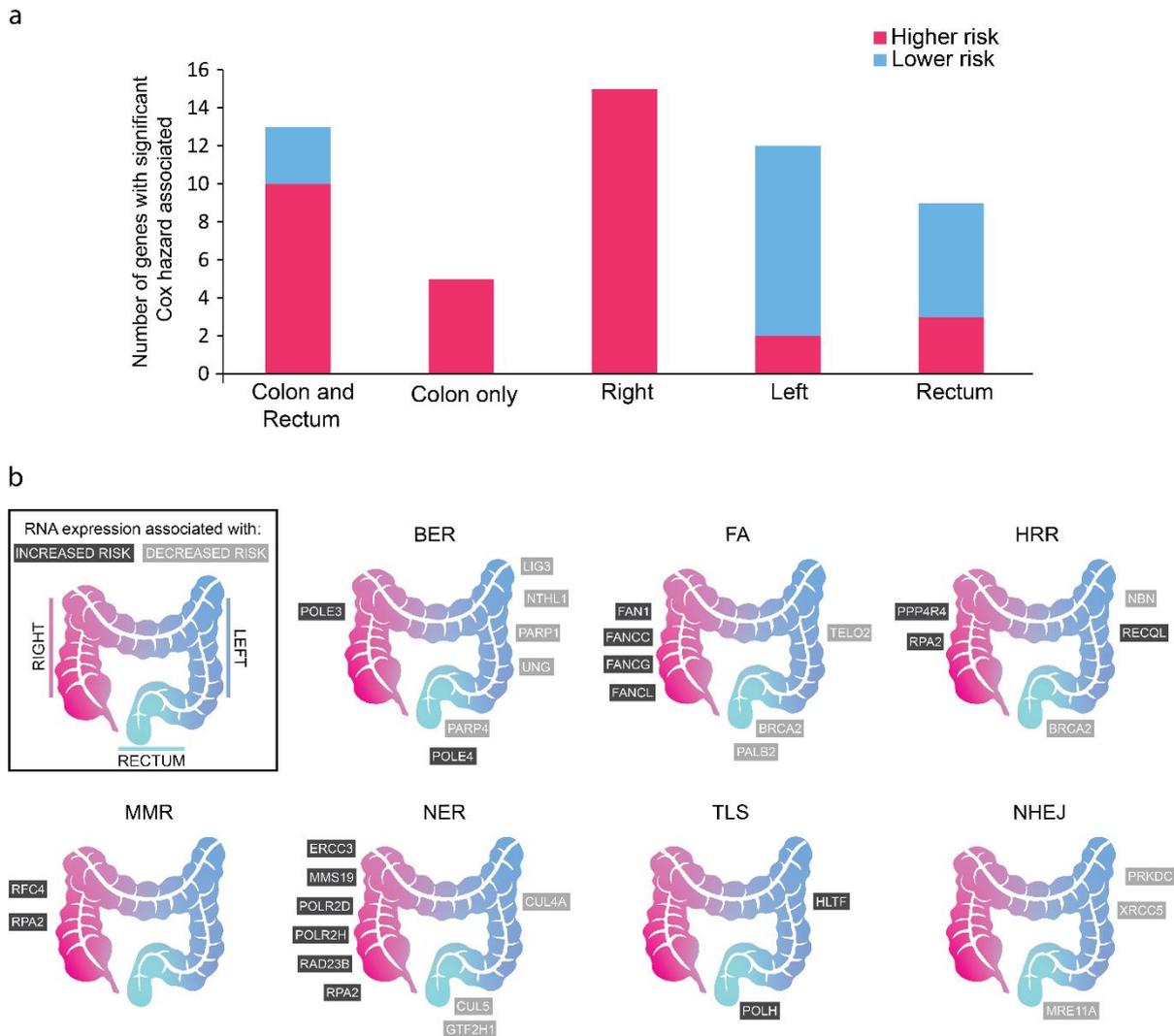


Figure 2 - Cox hazard regressions using 189 DNA damage repair genes showing an overall protective state associated with the expression of DDR genes in the left side and a pattern of increased risk of death associated with expression in the right side. A - Number of DDR genes with expression significantly associated with risk of death (Cox hazard, p-value < 0.05). B - Scheme representing the laterality of gene expression of DDR. Genes with expression associated with increased risk of death (dark grey) or decreased risk of death (light grey). Base excision repair (BER), Fanconi Anemia (FA), homologous recombination (HRR), mismatch repair (MMR), nucleotide excision repair (NER), Nonhomologous End-Joining (NHEJ), and translesion synthesis (TLS).

3.2. Subdivisions of colon and rectum unravel new biomarkers

Right side colon (RSC) is distinctively different from LSC and rectum. Cox regression analysis shows different effects of DNA damage repair (DDR) in different loci in the large intestine. Segmentation of CRC in the Colon and Rectum, and further colon in left and right, provide insight into the different profiles. When analyzed together (Colon and Rectum), only a fraction of the genes' expression is significantly associated with decreased risk of death (Fig 2B) (Supp. Table 2). When separated in the colon and rectum, the proportion of genes associated with decreased risk of death is augmented in the rectum, whereas in the colon subdivision the totality of genes is associated with increased risk of death. In further analysis, when we divided once again colon samples into RSC and LSC, we observed an even higher proportion of genes associated with a decreased risk of death in LSC, demonstrating a similar profile to that of rectum-located tumors.

3.3. Left side colon is more similar to Rectum than to Right side.

Among the DDR pathways, Base Excision Repair (BER), Fanconi Anemia (FA), and Nucleotide Excision Repair (NER) have the most genes with expression significantly associated with increased or decreased risk of death. NER and FA genes are predominantly associated with a higher risk of RSC while BER genes are mostly associated with decreased risk on LSC (Figure 2B). Moreover, when analyzing BER, FA, HRR, and NER, it is possible to observe that LSC shares a protective state pattern with Rectal cancer, suggesting similarities between the two. In the mentioned pathways, most genes' expressions are associated with decreased risk of death.

3.4. Kaplan–Meier survival estimation curves also show the same opposing pattern.

Kaplan-Meier curves were created after gene expression was discretized to “high” and “low” groups based on the median expression distribution of each queried gene (Supp. Files S1, S2, S3). Survival differences between both groups assessed using a log-rank test showed the same pattern with high expression of DDR genes increasing survival in samples from Left origin, while low expression increases survival in Right origin samples (Fig 3). A transition pattern from low expression associated with better survival in right to high expression in the left illustrates the distinctiveness of RSC.

Figure 3

Oliveira-Silveira J et al

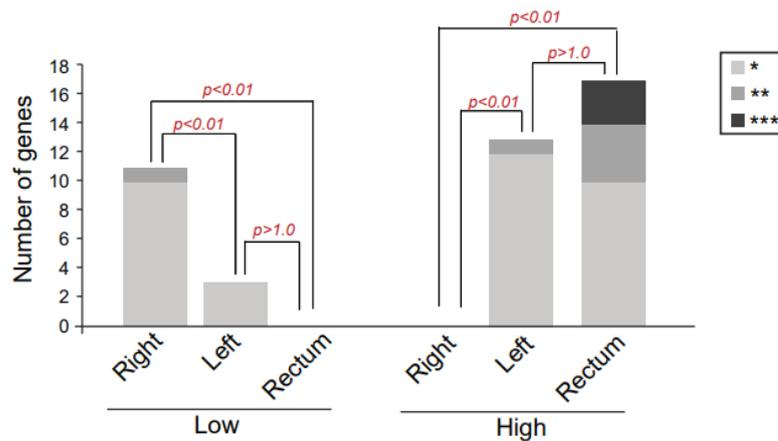


Figure 3 - **Summary of Kaplan–Meier survival estimation results.** Number of DDR genes associated with increased survival and laterality. Median overall survival differences between high and low groups were assessed using the log-rank test. Patients were discretized by the median as low (lower than the median) or high (higher than the median). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.5. Differential gene expression corroborates Right/Left-Rectum divide.

Gene expression analysis demonstrates more evidence that LSC and Rectum share similarities and differ from RSC. In total 70% (66/97) of genes show differences between RSC and LSC or Rectum (Profiles 2, 5 and 6), with 32% (31/97) showing differences between RSC and LSC and Rectum at the same time (Profile 2) (Fig 4). Out of the 31 Profile 2 genes, a sum of 22 DDR genes is underexpressed in RSC while a total of 10 is overexpressed. In the samples shown, genes BRCA2, PALB2, and MMS19 have indistinguishable expression levels in the rectum and left-sided samples, while both are distinguishable from RSC samples (Fig 4).

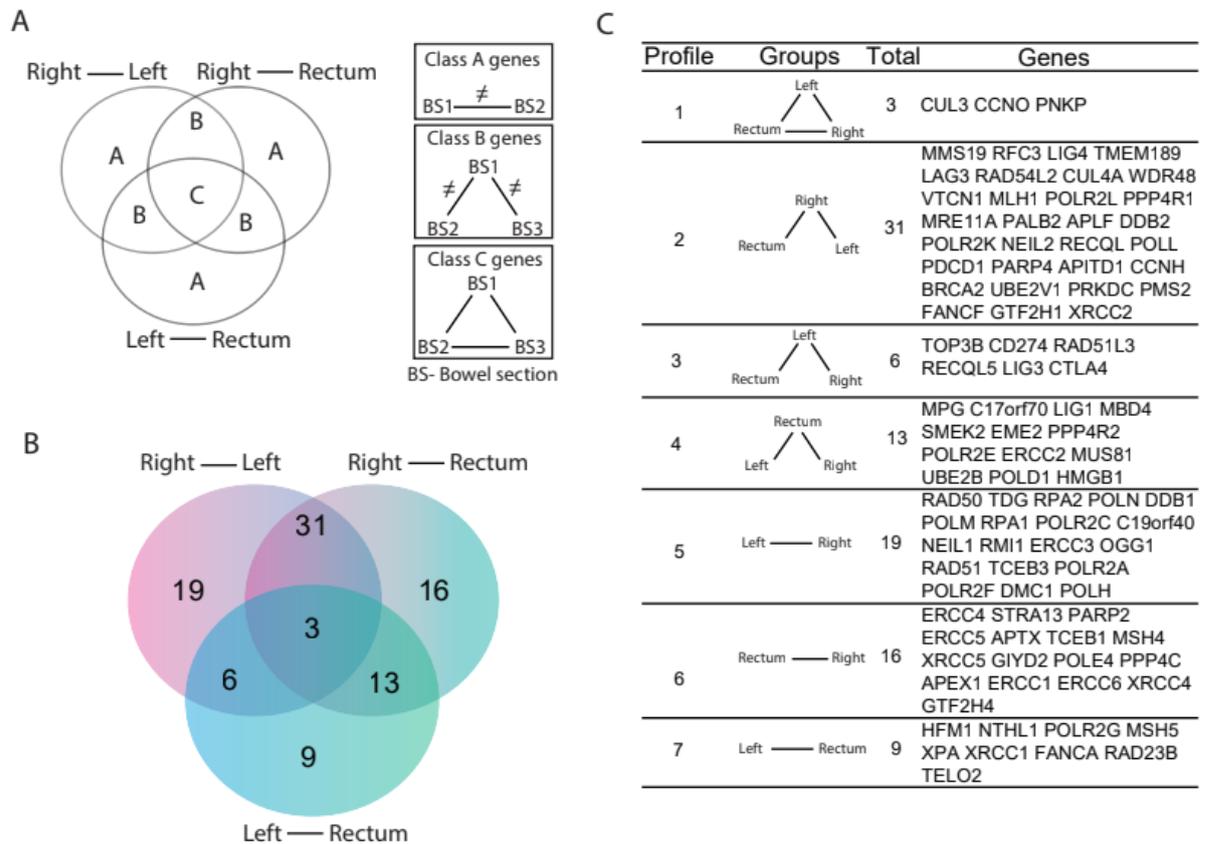


Figure 4 - **Comparison of differentially expressed genes.** A. Representative scheme guiding Venn interpretation (left) and gene expression comparisons between Bowel Section (BS) (Right). B. Venn diagrams show the number of common and unique DEGs between different BSs. C. Differentially expressed genes in each BS combination. Genes were classified in 7 profiles according to each combination. DEG analyses shown have p-value < 0.05.

4. Discussion

In the last two decades, it has become a consensus that cancers differ from each other molecularly, even considering tumors originating from the same anatomical sites. In parallel to the characterization of intertumoral heterogeneity, omics studies have demonstrated the presence of physiologically distinct subcompartments in human organs. Among these organs is the large intestine, which presents distinct characteristics, for example, in the pattern of gene expression, microbiota composition, immune functioning, and inflammatory profile. Thus, it is plausible to infer that, from such different backgrounds, colorectal neoplasms present

particularities associated with laterality. However, the molecular characterization of these differences remains poorly understood, especially considering key pathways in CRC carcinogenesis and outcome. Here, we characterized the expression profile of DDR pathways and its impact on the risk of death and prognosis of primary CRCs patients stratified by tumor location. Our work goes further to demonstrate the association of DDR genes with clinical parameters that would not be noted in the classical stratification of colon and rectal locations.

Here, we intended to show the transcriptional differences between CRC tumors originating from different sublocations, focusing on major DNA repair (DDR) pathways. Previous studies have shown right-side colon (RSC) tumors have a higher incidence of mutations in the DNA mismatch repair pathway and do not respond well to conventional chemotherapy[20]. To our thought, ours is the first study assessing the expression profile of main DDR pathways and its impact on the risk of death and prognosis of primary CRCs patients stratified by tumor location. Among the DDR pathways, Base Excision Repair (BER), Fanconi Anemia (FA), and Nucleotide Excision Repair (NER) have the most genes with expression significantly associated with increased or decreased risk of death. NER and FA genes have expression predominantly associated with higher risk on RSC while BER genes are mostly associated with decreased risk on LSC. Moreover, when analyzing BER, FA, HRR, and NER, it is possible to observe that LSC shares a protective state pattern with Rectal cancer, suggesting similarities between the two. In the mentioned pathways, most genes' expressions are associated with decreased risk of death.

Therefore, the literature has brought relevant evidence considering the impact of laterality on the prognosis and risk of death in CRC. We found that patients from the LSC and rectum subsets had more DNA repair genes with expression associated with better survival. The right side, on the other hand, showed most genes with expression associated with worst survival. Here, we also assessed the risk of death for CRC patients considering DDR pathways. Compared to the entire cohort (i.e. RSC and LSC together), Cox regression showed different profiles of risk of death when CRC patients were divided into Colon and Rectum, and further divided into RSC, LSC, and Rectum. More significant genes are associated with risk when CRC is divided into three subsections (Right, Left and Rectum). Cox regression analysis showed that all significant DDR gene expressions in RSC were associated with an increased risk of death. Whereas, LSC showed more genes with expression associated with decreased risk of death. Petrelli et al. in a systematic review and meta-analysis analyzed 66 studies, with over 1.4 million

subjects, and concluded that CRC patients with left-side origin have a 19% reduced risk of death when compared with right-side[21]. In this case, laterality was shown to have prognostic value independently of the stage, race, and adjuvant chemotherapy.

In general, considering the prognosis, there is a consensus that patients with right-side tumors have worse prognosis[22], [23]. However, sidedness also influences the incidence and the impact of signaling pathways in the survival of CRC patients[24], while this effect seems to be dependent on the genetic status of main driver genes, like KRAS and TP53. A meta-analysis identified a worse prognosis for RSC patients in KRAS wild-type tumors but not in KRAS-mutated tumors, at least in CRC patients with liver metastasis[25]. Furthermore, sidedness also impacts the survival of patients with metastatic tumors, since patients with recurrent liver metastasis from right-side tumors had shorter overall survival[26]. In a pioneer study, Sugai et al observed an increased incidence of TP53 mutations in left-side CRCs[24]. Posteriorly, Pan et al assessed the influence of sidedness in the prognosis of CRC patients considering the status of TP53. The authors found that the poorer survival of patients with RSC in relation to LSC seems to be restricted to the subgroup of patients with non-gain-of-function TP53 mutation. Complementary to that, only LSC patients had poorer survival when comparing gain-of-function TP53 mutated patients versus those with no-gain-of-function TP53 mutation[27]. In Huang et al. 2023, the mutation landscape of CRC was explored, highlighting frequently mutated genes and their association with RSC and LSC[28]. The study identified differences in mutation frequencies, with APC and TP53 mutations more common in left-sided CRC and PIK3CA mutations more common in right-sided CRC. The presence of DNA damage response (DDR) mutations was observed in both MSI and MSS CRC.

Finally, we also investigated differences in CMS and MSI, which are clinically relevant variables in CRC. Our results corroborate previous studies showing increased incidence of CMS1 and MSI among right-sided tumors[4], [29]. The MSI profile impacts, for instance, lymphocyte infiltration[30] and response to therapy[31], so the differences in MSI observed here could underlie the differences in the immune composition of tumor microenvironment[18] and in the sensitivity to classic chemotherapy and targeted therapies[32], [33] between right and left CRC tumors. For example, patients with KRAS/RAS-wt mCRC treated with first-line EGFR-I plus chemotherapy with a LSC primary tumor showed improved results in a drug trial when compared to RSC patients[14]. Furthermore, the specific differences in tumor microenvironment between right and left colorectal tumors may also contribute to explaining

the differential impact of immune-associated markers in the prognosis and response to immunotherapy. For instance, PD-L1 expression is higher in right than left-side tumors and associated with worse prognosis in left-side cancer. The same association was observed with the Treg-specific marker Foxp3[18].

5. Conclusion

These results together suggest that DDR gene expression effect on Right Side Colon is distinct from the other two subdivisions, and Left Side Colon and Rectum have similar profiles and likely share more molecular similarities, including those associated with response to DNA damaging agents such as chemotherapy. Because DNA damage response is an important aspect of tumor response to different therapies, tumor localization should be accounted for when developing and testing new drugs or electing subjects for clinical trials. Treating all samples as one cohesive disease may lead to confounding effects that hide potential therapeutic benefits in subgroups, which would otherwise be mistaken for null results. Furthermore, DDR gene expression levels should not function as risk and prognostic markers for patients with CRC unless the anatomical site of the tumor is taken into account. In conclusion, Right Side primary tumors should be treated as a different neoplasm from tumors with a Left/Rectum origin due to its DDR gene expression landscape.

Competing interests

The author(s) declare no competing interests.

Acknowledgements: We also thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for granting a scholarship to Juliano de Oliveira Silveira during his doctorate.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Contributions

JOS, EC and JS wrote the main manuscript text, JOS and EC prepared figures 1, 2, 3 and 4. All authors reviewed the manuscript.

Data availability

The current research and analysis data sets come from the online database the Cancer Genome Atlas (TCGA, <http://can-cergenome.nih.gov/>). Processed data and R language code used in the analysis are available in the Supplemental Material file. Other data supporting the results of this study can be obtained from the corresponding author upon reasonable request.

Para o propósito da tese, seguem os materiais complementares:

<https://drive.google.com/drive/folders/1LqtHFwRE81lwkV7mcggQrxfEhD7oKb8q?usp=sharing>

References

- [1] T. I. A. for R. on Cancer (IARC), “Global Cancer Observatory.” <https://gco.iarc.fr/> (accessed Oct. 31, 2022).
- [2] A. L. Norris *et al.*, “Familial and sporadic pancreatic cancer share the same molecular pathogenesis,” *Fam. Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 95–103, Mar. 2015, doi: 10.1007/s10689-014-9755-y.
- [3] U. Testa, E. Pelosi, and G. Castelli, “Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells,” *Med. Sci.*, vol. 6, no. 2, p. 31, Apr. 2018, doi: 10.3390/medsci6020031.
- [4] J. Guinney *et al.*, “The consensus molecular subtypes of colorectal cancer,” *Nat. Med.*, vol. 21, no. 11, Art. no. 11, Nov. 2015, doi: 10.1038/nm.3967.
- [5] Y. K. Chae *et al.*, “Genomic landscape of DNA repair genes in cancer,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 17, pp. 23312–23321, Apr. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.8196.
- [6] R. A. Burrell, N. McGranahan, J. Bartek, and C. Swanton, “The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution,” *Nature*, vol. 501, no. 7467, Art. no. 7467, Sep. 2013, doi: 10.1038/nature12625.
- [7] N. M. Reilly, L. Novara, F. Di Nicolantonio, and A. Bardelli, “Exploiting DNA repair defects in colorectal cancer,” *Mol. Oncol.*, vol. 13, no. 4, pp. 681–700, Apr. 2019, doi: 10.1002/1878-0261.12467.
- [8] R. Ijsselsteijn, J. G. Jansen, and N. de Wind, “DNA mismatch repair-dependent DNA damage responses and cancer,” *DNA Repair*, vol. 93, p. 102923, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102923.
- [9] Y. Zhang, F. Chen, D. S. Chandrashekar, S. Varambally, and C. J. Creighton, “Proteogenomic characterization of 2002 human cancers reveals pan-cancer molecular subtypes and associated pathways,” *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, Art. no. 1, May 2022, doi: 10.1038/s41467-022-30342-3.
- [10] M. P. L. van der Sijp *et al.*, “Differences between colon and rectal cancer in complications, short-term survival and recurrences,” *Int. J. Colorectal Dis.*, vol. 31, no. 10, pp. 1683–1691, Oct. 2016, doi: 10.1007/s00384-016-2633-3.
- [11] D. J. Wilson and B. Bordoni, “Embryology, Bowel,” in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Accessed: Jul. 03, 2023. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545247/>
- [12] S. Vatandoust, T. J. Price, and C. S. Karapetis, “Colorectal cancer: Metastases to a single organ,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 41, pp. 11767–11776, Nov. 2015, doi: 10.3748/wjg.v21.i41.11767.
- [13] F. Benedix *et al.*, “Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival,” *Dis. Colon Rectum*, vol. 53, no. 1, pp. 57–64, Jan. 2010, doi: 10.1007/DCR.0b013e3181c703a4.
- [14] M. Benavides *et al.*, “Tumour location and efficacy of first-line EGFR inhibitors in KRAS/RAS wild-type metastatic colorectal cancer: retrospective analyses of two phase II randomised Spanish TTD trials,” *ESMO Open*, vol. 4, no. 6, p. e000599, Dec. 2019, doi: 10.1136/esmoopen-2019-000599.
- [15] S. K. Baek, “Laterality: Immunological Differences Between Right-Sided and Left-Sided Colon Cancer,” *Ann. Coloproctology*, vol. 35, no. 6, pp. 291–293, Dec. 2019, doi: 10.3393/ac.2019.11.11.
- [16] T. Nawa *et al.*, “Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology,” *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 23, no. 3, pp. 418–423, Mar. 2008, doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.04923.x.

- [17] B. Iacopetta, "Are there two sides to colorectal cancer?," *Int. J. Cancer*, vol. 101, no. 5, pp. 403–408, Oct. 2002, doi: 10.1002/ijc.10635.
- [18] C. Takasu *et al.*, "Impact of sidedness of colorectal cancer on tumor immunity," *PLOS ONE*, vol. 15, no. 10, p. e0240408, Oct. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0240408.
- [19] "COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer | Nucleic Acids Research | Oxford Academic."
<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D941/5146192?login=false> (accessed Oct. 31, 2022).
- [20] "Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature - PMC." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6089587/> (accessed Dec. 19, 2022).
- [21] F. Petrelli *et al.*, "Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis," *JAMA Oncol.*, vol. 3, no. 2, pp. 211–219, Feb. 2017, doi: 10.1001/jamaoncol.2016.4227.
- [22] I. Azar *et al.*, "The impact of primary tumor sidedness on survival in early-onset colorectal cancer by stage: A National Veterans Affairs retrospective analysis," *Cancer Med.*, vol. 10, no. 9, pp. 2987–2995, May 2021, doi: 10.1002/cam4.3757.
- [23] S. Malakorn *et al.*, "Tumor Sidedness, Recurrence, and Survival After Curative Resection of Localized Colon Cancer," *Clin. Colorectal Cancer*, vol. 20, no. 1, pp. e53–e60, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.clcc.2020.08.007.
- [24] T. Sugai *et al.*, "Analysis of Molecular Alterations in Left- and Right-Sided Colorectal Carcinomas Reveals Distinct Pathways of Carcinogenesis," *J. Mol. Diagn. JMD*, vol. 8, no. 2, pp. 193–201, May 2006, doi: 10.2353/jmoldx.2006.050052.
- [25] M. Belias *et al.*, "Is Laterality Prognostic in Resected KRAS-Mutated Colorectal Liver Metastases? A Systematic Review and Meta-Analysis," *Cancers*, vol. 14, no. 3, p. 799, Feb. 2022, doi: 10.3390/cancers14030799.
- [26] K. Sasaki *et al.*, "The prognostic implications of primary colorectal tumor location on recurrence and overall survival in patients undergoing resection for colorectal liver metastasis," *J. Surg. Oncol.*, vol. 114, no. 7, pp. 803–809, Dec. 2016, doi: 10.1002/jso.24425.
- [27] M. Pan *et al.*, "TP53 Gain-of-Function and Non-Gain-of-Function Mutations Are Differentially Associated With Sidedness-Dependent Prognosis in Metastatic Colorectal Cancer," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 40, no. 2, pp. 171–179, Jan. 2022, doi: 10.1200/JCO.21.02014.
- [28] W. Huang *et al.*, "Differences in DNA damage repair gene mutations between left- and right-sided colorectal cancer," *Cancer Med.*, vol. 12, no. 9, pp. 10187–10198, Apr. 2023, doi: 10.1002/cam4.5716.
- [29] S. Stintzing *et al.*, "Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial," *Ann. Oncol.*, vol. 30, no. 11, pp. 1796–1803, Nov. 2019, doi: 10.1093/annonc/mdz387.
- [30] A. Buckowitz *et al.*, "Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases," *Br. J. Cancer*, vol. 92, no. 9, Art. no. 9, May 2005, doi: 10.1038/sj.bjc.6602534.
- [31] S. T. Kim *et al.*, "The Impact of Microsatellite Instability Status and Sidedness of the Primary Tumor on the Effect of Cetuximab-Containing Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer," *J. Cancer*, vol. 8, no. 14, pp. 2809–2815, 2017, doi: 10.7150/jca.18286.
- [32] D. J. Sargent *et al.*, "Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer," *J. Clin. Oncol. Off. J.*

Am. Soc. Clin. Oncol., vol. 28, no. 20, pp. 3219–3226, Jul. 2010, doi:
10.1200/JCO.2009.27.1825.

- [33] A. Passardi, M. Canale, M. Valgiusti, and P. Ulivi, “Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 6, p. E1324, Jun. 2017, doi:
10.3390/ijms18061324.

Discussão

Nos últimos vinte anos, tornou-se consenso que os cânceres diferem entre si molecularmente, mesmo considerando tumores originados dos mesmos locais anatômicos. Paralelamente à caracterização da heterogeneidade intertumoral, estudos ômicos demonstraram a presença de subcompartimentos fisiologicamente distintos em órgãos humanos. Entre esses órgãos está o intestino grosso, que apresenta características distintas, por exemplo, no padrão de expressão gênica, composição da microbiota, funcionamento imunológico e perfil inflamatório.

Assim, é plausível inferir que, a partir de contextos tão diferentes, as neoplasias colorretais apresentem particularidades associadas à lateralidade. No entanto, a caracterização molecular dessas diferenças permanece pouco compreendida, especialmente considerando as principais vias na carcinogênese e desfecho do CCR. Aqui, caracterizamos o perfil de expressão das vias de RDD e seu impacto no risco e prognóstico de pacientes com CCRs primários estratificados pela localização do tumor. Nosso trabalho vai além, ao demonstrar a associação dos genes de DDR com parâmetros clínicos que não seriam notados na estratificação clássica de localizações de cólon e reto. A interação entre as vias de DDR e o CCR destaca a natureza complexa da oncogênese, especialmente no contexto da lateralidade. A seguir discutimos nossos resultados das vias MMR, BER, NER e FA. Cada um desempenha um papel crítico na manutenção da estabilidade genômica, demonstrando a complexidade dos nossos sistemas de salvaguarda genômica, e apresenta fatores importantes na biologia do CRC.

Uma dessas vias importantes no CCR é a de reparo ao dano de DNA por malpareamento. Também conhecida como Mismatch Repair (MMR), desempenha um papel crucial na manutenção da estabilidade genômica ao corrigir erros de pareamento de bases que ocorrem durante a replicação do DNA- (citar a mesma referência da introdução). Quando o sistema MMR é deficiente, como resultado de mutações ou baixa expressão em genes-chave dessa via, ocorre um fenômeno conhecido como instabilidade de microssatélites (MSI), caracterizado por uma alta taxa de mutações. Estas alterações genômicas aceleradas podem promover a carcinogênese, (ref) contribuindo para o desenvolvimento e progressão de várias formas de câncer, incluindo o câncer colorretal. De fato, a deficiência de MMR está associada a uma subcategoria distinta de câncer colorretal, conhecida como câncer colorretal com instabilidade de microssatélites, que tem características clinicopatológicas e prognóstico distintos, como já descrito na introdução. Nossos achados sobre a expressão de RPA2 e RFC4, proteínas envolvidas na via de MMR, em CCR do lado direito e sua associação com o risco de mortalidade ampliam ainda mais a compreensão da base molecular do câncer colorretal, conforme descrito por Liu et al. (2019), Wang et al. (2014), Dobbelstein et al. (2015), e Karatzas et al (2007).

Nos estudos de Liu et al (2019). e Wang et al. (2015), a superexpressão de RFC4 foi associada à progressão do câncer, à radioresistência e ao pior prognóstico em CCR. O resultado do nosso trabalho sobre MMR adiciona uma nova dimensão a esse entendimento, especificando que a superexpressão de RFC4, particularmente em CCR do lado direito, está associada a um aumento

no risco de morte. Isso não apenas apoia as descobertas anteriores sobre o papel de RFC4 como um potencial marcador prognóstico, mas também enfatiza a importância da localização do tumor nos resultados clínicos de pacientes com CCR. Em nossa pesquisa, foi demonstrado que a superexpressão do gene RFC4 está correlacionada com um risco elevado de morte, enquanto a literatura científica aponta para um envolvimento desse gene na radioresistência, que pode, também, estar associada a maior risco de morte (Ref). Infelizmente, a coorte de pacientes utilizada em nosso estudo não dispunha de dados suficientes relativos ao tratamento, impossibilitando a realização de uma análise direta desta possível relação. Contudo, é plausível postular que exista uma resposta diferencial à radioterapia de acordo com a lateralidade do tumor, dado que esta característica tem demonstrado relevância nas particularidades do câncer colorretal. Esta hipótese, embora não confirmada por nosso estudo, abre um campo promissor para pesquisas futuras.

Da mesma forma que com RFC4, o estudo de Karatzas et al. (ano) mostrou que RPA1 e RPA2 estão associados a estágios avançados da doença e à pior sobrevida geral. Nossos resultados corroboram essas descobertas e as ampliam, sugerindo que a expressão elevada de RPA2 é particularmente prejudicial no CCR do lado direito. O trabalho de Dobbstein et al. (ano) revelou que o medicamento de quimioterapia 5-FU interfere com o reparo do DNA, especificamente pela via de MMR, que normalmente envolveria RPA2. Embora o estudo não envolva diretamente RFC4, a interação dessas proteínas na complexa rede de reparo do DNA e no ciclo celular pode ter implicações

para o tratamento, particularmente em casos de CCR do lado direito. Coletivamente, essas descobertas sugerem um panorama do câncer colorretal, onde tanto as características moleculares do tumor (como os níveis de expressão de RFC4 e RPA2) quanto a localização anatômica do tumor (CCR do lado direito) impactam significativamente o prognóstico do paciente. Mais pesquisas são necessárias para entender completamente essas interações e suas implicações para o tratamento, mas esse conhecimento pode abrir o caminho para estratégias terapêuticas mais personalizadas e eficazes para o CCR utilizando a via de MMR.

O reparo por excisão de base (BER) é uma via fundamental de reparo de DNA que se dedica à correção de lesões em bases individuais causadas por desaminação, oxidação ou alquilação. A falha ou ineficiência desta via pode resultar em acúmulo de danos no DNA que, por sua vez, podem levar à mutação e instabilidade genômica - fatores que são bem conhecidos por contribuir para o desenvolvimento de câncer, incluindo o CCR. Alterações na eficiência da via BER, seja por mutações em genes-chave ou por mudanças na expressão desses genes, podem influenciar tanto a susceptibilidade ao CCR quanto a resposta ao tratamento, uma vez que muitos agentes quimioterápicos exercem seus efeitos causando danos que são alvos da via BER (ref). Como tal, o papel do BER na carcinogênese e terapêutica do CCR é um tópico ativo de pesquisa na biologia molecular do câncer. Em nosso estudo, identificamos uma associação significativa entre a expressão de genes de BER, especificamente LIG3, NTHL1, PARP1 e UNG, e um menor risco de mortalidade em pacientes diagnosticados com CCR primário proveniente

do lado esquerdo. Nossos resultados sugerem um possível papel protetor para esses genes no contexto de CCR, uma noção que se alinha com o entendimento atual da função integral que esses genes têm na manutenção da estabilidade genômica.

O gene NTHL1, por exemplo, desempenha um papel crítico na via BER como uma glicosilase de DNA, conforme destacado por Sweasy et al. (2020). A pesquisa deles indicou que mutações e função alterada no NTHL1 poderiam contribuir para a progressão do câncer e envelhecimento, destacando seu papel em uma síndrome tumoral rara, a polipose associada à NTHL1 (NAP). Isso se alinha com nossos achados do possível papel protetor do NTHL1 no CCR, sugerindo que a função regular desse gene pode ser fundamental para prevenir a instabilidade genômica que poderia promover o desenvolvimento e a progressão do tumor no CCR. Além disso, o trabalho de Dantzer et al. (2014) também fornece um contexto esclarecedor para nossas descobertas a respeito do papel do PARP1. O PARP1 é um participante vital na resposta e reparo do dano ao DNA, incluindo a BER. Ele é ativado em resposta ao dano ao DNA e contribui para o reparo de quebras de fita simples (SSBs). A revisão de Dantzer e colaboradores indica que a inibição do PARP1 e a depleção da via BER contribuem para o acúmulo de SSBs na fase S, levando ao colapso da forquilha de replicação, quebras de fita dupla e, conseqüentemente, à morte celular. Assim, a manutenção da função do PARP1, conforme sugerido por nosso estudo, poderia ajudar a prevenir essa cascata prejudicial e, assim, contribuir para um melhor prognóstico do CCR. Nossos resultados, no contexto desses estudos anteriores, destacam a importância da via BER e seus

respectivos genes no CCR, oferecendo uma área promissora para futuras pesquisas em estratégias terapêuticas direcionadas.

Na paisagem molecular do CCR, a via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) assume um papel crucial. Essa via é responsável pela remoção de uma ampla gama de lesões no DNA, incluindo aquelas introduzidas por agentes que induzem grandes distorções na dupla hélice, como adutos, pontes intra e inter cadeia e radiação ultravioleta. Em particular, variações genéticas, como polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) em genes envolvidos em NER, como o ERCC4, têm sido associados à suscetibilidade ao CCR. Deficiências nessa via de reparo podem comprometer a estabilidade genômica, favorecendo a acumulação de mutações e promovendo a transformação maligna e a progressão do tumor (ref). Portanto, a função adequada do NER é essencial para a manutenção da integridade do genoma e a prevenção do desenvolvimento do CCR. Além disso, a expressão e atividade desses genes de reparo podem ter implicações significativas para a resposta ao tratamento e o prognóstico em pacientes com CCR. Em nossa investigação observamos uma correlação notável entre a expressão dos genes de reparo por BER ERCC3, MMS19, POLR2D, POLRDH, RAD23B e RPA2 e o prognóstico do paciente. Especificamente, níveis mais elevados de expressão desses genes estavam associados a um risco maior de morte em pacientes com tumores de CCR primários localizados no lado direito.

Wu et al. (2019) elucidaram o papel do gene ERCC4, envolvido na via de reparo de excisão de nucleotídeos (NER), na suscetibilidade ao CCR. Um

polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) neste gene (rs6498486 AC/CC) estava associado a um risco diminuído de CCR em comparação com o genótipo AA. No contexto de nossas descobertas, isso destaca a complexa interação entre diferentes mecanismos de reparo de DNA e sua influência no prognóstico do CCR, em especial o efeito de um polimorfismo em diminuir o risco analogamente ao efeito da baixa expressão. Por fim, Zhao et al. (2021) identificaram um papel para RAD23B, uma proteína relacionada ao reparo do dano ao DNA, na facilitação da invasão e metástase das células de CCR, ambos fatores-chave na progressão da doença e na sobrevivência do paciente. Intrigantemente, descobrimos que uma maior expressão de RAD23B correlacionou-se com piores desfechos em CCR do lado direito, sublinhando ainda mais o papel crítico das vias de reparo do DNA no prognóstico do câncer.

A via de reparo de DNA da Anemia de Fanconi (FA) desempenha um papel importante a manutenção da integridade genômica, reparando danos no DNA por meio de um complexo inter-relacionamento entre várias proteínas FA. Alterações nesta via, através de mutações ou disfunções em genes FA, podem levar à instabilidade genômica, um fator chave na carcinogênese do CCR. Nossos achados revelaram uma nova camada de complexidade na relevância prognóstica dos genes da FA no CCR. Descobrimos que a expressão dos genes FA PALB2 e BRCA2 está associada a um menor risco de morte em pacientes com tumores primários de CCR localizados no reto, enquanto o gene TEL2 exerce um efeito semelhante no CCR do lado esquerdo. Por outro lado, a expressão dos genes FA FAN1, FANCC, FANCG e

FANCL foi encontrada associada a um maior risco de morte em pacientes com tumores primários de CCR localizados no lado direito. Esses resultados sublinham o papel bidirecional dos genes FA no prognóstico do CCR e destacam a importância da localização do tumor em influenciar esses desfechos.

Hou et al. (2020) mostraram que a deleção do número de cópias do gene PALB2 e a baixa expressão de mRNA, levando a uma redução na localização do BRCA2 e subsequente prejuízo na via FA, poderiam servir como indicadores prognósticos ruins no CCR. Em linha com essas descobertas, nosso estudo demonstrou um papel protetor da expressão de PALB2 e BRCA2 no câncer retal, corroborando ainda mais a importância desses genes no prognóstico do CCR. Da mesma forma, o trabalho de Antoniou et al. (2022) forneceu evidências de que variantes patogênicas em BRCA1 e BRCA2 estavam associadas a um risco aumentado de vários cânceres, incluindo CCR. Nossas observações dão mais apoio ao papel central do BRCA2 no prognóstico do CCR, com uma expressão mais alta vinculada a melhores resultados em pacientes com câncer retal.

Huang et al. (2020) descobriram uma correlação entre a superexpressão de TELO2, uma proteína que interage com mTOR, e piores resultados clínicos em pacientes com CCR. No entanto, em nosso estudo, observamos que a expressão aumentada de TELO2 estava associada a um menor risco de morte no CCR do lado esquerdo. Essa aparente discrepância pode ser devido à heterogeneidade do tumor ou a diferenças nas populações de pacientes estudadas e requer investigação adicional. A pesquisa de Valle et al. (2015)

ligou mutações no gene FAN1 ao aumento da suscetibilidade ao CCR em famílias. De maneira similar, descobrimos que a expressão aumentada de FAN1, junto com outros genes FA FANCC, FANCG e FANCL, estava vinculada a um prognóstico pior em pacientes com CCR do lado direito. Essa observação destaca ainda mais os papéis multifacetados dos genes FA na patogênese e progressão do CCR. Por fim, o trabalho de Mini et al. (2020) sugeriu que os genes FA poderiam servir como biomarcadores prognósticos e preditivos significativos para o manejo e tratamento do CCR. Nosso estudo se alinha a essa perspectiva, revelando que os níveis de expressão de genes FA específicos, dependendo da localização do tumor, podem fornecer informações valiosas sobre o prognóstico do paciente.

Neste trabalho, nós objetivamos mostrar as diferenças transcricionais entre tumores CRC originários de diferentes sublocalizações, com foco nas principais vias de reparo do DNA. Estudos anteriores mostraram que os tumores do cólon direito (RSC) têm uma maior incidência de mutações na via de reparo de malpareamento e não respondem bem à quimioterapia convencional (Baran et al., 2018). De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo avaliando o perfil de expressão das principais vias de DDR e seu impacto no risco e prognóstico de pacientes com CCR primário estratificado por localização tumoral. Entre as vias de DDR, Reparo por Excisão de Base (BER), Anemia de Fanconi (FA) e Reparo por Excisão de Nucleotídeo (NER) têm a maioria dos genes com expressão significativamente associada a risco aumentado ou diminuído. Os genes NER e FA têm expressão predominantemente associada a maior risco de RSC, enquanto os genes BER

estão mais associados a menor risco de LSC. Além disso, ao analisar BER, FA, HRR e NER, é possível observar que o LSC compartilha um padrão de estado protetor com o câncer retal, sugerindo semelhanças entre os dois. Nas vias mencionadas, a expressão da maioria dos genes está associada à diminuição do risco de morte.

Ainda que escassas, há evidências relevantes considerando o impacto da lateralidade no prognóstico e risco de CCR. Contribuindo na área, neste estudo identificamos que os pacientes dos subconjuntos LSC e reto apresentam mais genes de reparo de DNA com expressão associada à melhor sobrevida. Pacientes com tumores do lado direito, por outro lado, apresentaram a maioria dos genes com expressão associada à pior sobrevida. Nós também avaliamos o risco de morte para pacientes com CRC considerando as vias DDR. Em comparação com toda a coorte (ou seja, RSC e LSC juntos), a regressão de Cox mostrou diferentes perfis de risco quando os pacientes com CRC foram divididos em cólon e reto e posteriormente divididos em RSC, LSC e Reto. Mais genes com resultados significativos estão associados ao risco quando o CCR é dividido em três subseções (direito, esquerdo e reto). A análise de regressão de Cox mostrou que todas as expressões significativas de genes de DDR em RSC foram associadas a um risco aumentado de morte, enquanto LSC mostrou mais genes com expressão associada à diminuição do risco de morte. Petrelli et al. em uma revisão sistemática e meta-análise analisaram 66 estudos, com mais de 1,4 milhão de indivíduos, e concluíram que pacientes com CCR com origem no lado esquerdo têm um risco de morte 19% menor quando comparados com o lado

direito (Petrelli et al., 2017). Neste caso, a lateralidade mostrou ter valor prognóstico independentemente do estágio, raça e quimioterapia adjuvante.

De fato, estudos posteriores nos levaram a um consenso atual de que pacientes com tumores do lado direito têm pior prognóstico (Azar et al., 2021; Malakorn et al., 2021). No entanto, a lateralidade também influencia a incidência e o impacto das vias de sinalização na sobrevivência de pacientes com CCR (Sugai et al., 2006), enquanto esse efeito parece ser dependente do status genético dos principais genes drivers, como KRAS e TP53. Uma meta-análise identificou um pior prognóstico para pacientes com RSC em tumores com KRAS tipo selvagem, mas não em tumores com mutação KRAS, pelo menos em pacientes com CRC com metástase hepática (Belias et al., 2022). Além disso, a lateralidade também afeta a sobrevida de pacientes com tumores metastáticos, uma vez que pacientes com metástase hepática recorrente de tumores do lado direito tiveram sobrevida geral mais curta (Sasaki et al., 2016). Em um estudo pioneiro, Sugai e colaboradores observaram um aumento da incidência de mutações TP53 em CCRs do lado esquerdo (Sugai et al., 2006). Posteriormente, Pan et al. avaliaram a influência da lateralidade no prognóstico de pacientes com CCR considerando o estado de TP53. Os autores constataram que a pior sobrevida dos pacientes com RSC em relação ao LSC parece estar restrita ao subgrupo de pacientes com mutação TP53 sem ganho de função. Complementarmente, apenas os pacientes LSC tiveram uma sobrevida pior ao comparar pacientes com mutação TP53 com ganho de função versus aqueles com mutação TP53 sem ganho de função (Pan et al., 2022).

Finalmente, também investigamos diferenças em CMS e MSI, que são variáveis clinicamente relevantes no CRC (Rebersek, 2020). Nossos resultados corroboram estudos anteriores mostrando maior incidência de CMS1 e MSI entre os tumores do lado direito (Guinney et al., 2015; Stintzing et al., 2019). O perfil do MSI impacta, por exemplo, a infiltração de linfócitos (Buckowitz et al., 2005) e a resposta à terapia (Kim et al., 2017), então as diferenças no MSI observadas aqui podem ser a base das diferenças na composição imunitária do microambiente do tumor (Takasu et al., 2020) e na sensibilidade à quimioterapia clássica e terapias direcionadas (Passardi et al., 2017; Sargent et al., 2010) entre tumores CRC direito e esquerdo. Por exemplo, pacientes com CCR metastático KRAS/RAS-wt tratados com EGFR-I de primeira linha mais quimioterapia com um tumor primário LSC mostraram melhores resultados em um teste de fármacos quando comparados a pacientes com RSC (Benavides et al., 2019). Além disso, as diferenças específicas no microambiente tumoral entre os tumores colorretais direito e esquerdo também podem contribuir para explicar o impacto diferencial dos marcadores imunoassociados no prognóstico e na resposta à imunoterapia. Por exemplo, a expressão de PD-L1 é maior em tumores do lado direito do que no lado esquerdo e associada a pior prognóstico no câncer do lado esquerdo. A mesma associação foi observada com o marcador específico de Treg Foxp3 (Takasu et al., 2020).

A lateralidade é observada em mais órgãos no corpo humano e outros pesquisadores já buscaram verificar associações entre essa diferença e desfechos no câncer. Em um estudo, Roychoudhuri et al. examinaram os

correlatos epidemiológicos da lateralidade do câncer nos cinco principais órgãos pareados do corpo (mamas, pulmões, rins, testículos e ovários). Descobriu-se que as diferenças na incidência de câncer por lateralidade coincidem com diferenças no tamanho dos órgãos, muito acentuadamente nos pulmões, tanto em homens quanto nas mulheres, e também nos testículos e rins, sugerindo que o tamanho dos órgãos é um fator importante subjacente à assimetria na incidência de câncer nesses órgãos (Roychoudhuri et al., 2006). Esses resultados sugerem que a massa de tecido nesses órgãos é um importante contribuinte para a assimetria na incidência de câncer e essa variável deve também ser investigada no CCR. Além disso, a lateralidade do tumor pode ser um fator prognóstico independente em pacientes com câncer de ovário avançado (Yamada et al., 2021). A incorporação da lateralidade do tumor pode melhorar o desempenho preditivo do sistema de estadiamento FIGO em pacientes com câncer de ovário avançado. Já em câncer de mama, um estudo retrospectivo com pacientes recém-diagnosticados de janeiro de 2000 a junho de 2016 na África do Sul demonstrou relação estatisticamente significativa entre lateralidade e estágio, com a mama direita apresentando cânceres em estágio mais avançado (Mokone-Fatunla et al., 2019). Assim como o dos seus parceiros bilaterais, e talvez ainda mais criticamente, o comportamento do CCR é altamente afetado pela localização anatômica do tumor, que por sua vez afeta suas características moleculares e imunológicas. Compreender as características dessas duas entidades diferentes é muito importante tanto para rastreamento quanto para o desenvolvimento de terapias eficazes.

Em resumo, nosso estudo, em conjunto com trabalhos anteriores, destaca a interação complexa entre genes de reparo ao dano de DNA, localização do tumor e prognóstico do CCR. Essas descobertas lançam luz sobre as complexidades da maquinaria de reparo do DNA no CCR, lançando as bases para estratégias de medicina personalizada baseadas nas características moleculares dos tumores.

Conclusão e perspectivas

De maneira conjunta, nossos resultados sugerem que o efeito da expressão de genes de DDR no lado direito do cólon é distinto das outras duas subdivisões. De fato, o lado esquerdo do cólon e o reto têm perfis semelhantes e provavelmente compartilham mais semelhanças moleculares, incluindo aquelas associadas à resposta a agentes prejudiciais ao DNA, como a quimioterapia. Como a resposta ao dano do DNA é um aspecto importante da resposta do tumor a diferentes terapias, a localização do tumor deve ser considerada no desenvolvimento e teste de novos medicamentos ou na seleção de indivíduos para ensaios clínicos. Tratar todas as amostras como uma doença coesa pode levar a vieses de confusão que ocultam potenciais benefícios terapêuticos em subgrupos, que de outra forma seriam confundidos com resultados nulos. Além disso, os níveis de expressão de genes de DDR não devem funcionar como marcadores de risco e prognóstico para pacientes com CCR, a menos que o local anatômico do tumor seja levado em consideração.

Em suma, os tumores primários do lado direito devem ser tratados como uma neoplasia diferente dos tumores com origem no esquerdo/reto devido ao seu cenário de expressão gênica do DDR. Nossas conclusões são relevantes para a interpretação da doença do câncer de cólon e reto. Demonstramos que as expressões de genes de DDR contribuem para descrever o comportamento diferencial de carcinomas em diferentes lados do cólon, o que deve ser clinicamente relevante para análises de prognóstico e para projetar e melhor interpretar os resultados de terapias experimentais. O

uso de abordagens semelhantes às descritas no presente estudo podem ser úteis para melhor entender o potencial vínculo entre a heterogeneidade na lateralidade do CCR com o comportamento maligno e o prognóstico do CCR.

Com base nos nossos achados, algumas perspectivas podem ser propostas, incluindo:

1. Replicação em outras coortes: embora o estudo aqui apresentado esclareça as diferenças moleculares entre os CCRs do lado esquerdo e do lado direito, ele se baseia no banco de dados The Cancer Genome Atlas. A replicação em outros bancos de dados seria útil para validar os achados e avaliar sua generalização.
2. Validação funcional das diferenças de expressão gênica: no presente estudo, foram identificadas diferenças no efeito da expressão gênica de DDR entre os CCRs do lado esquerdo e do lado direito, mas as implicações funcionais dessas diferenças não são totalmente compreendidas. Estudos seguintes podem ter como objetivo validar o significado funcional dessas diferenças, por exemplo, avaliando como a expressão gênica afeta a resposta a quimioterápicos de linhagens celulares provenientes de diferentes regiões do intestino.
3. Exploração de outras vias moleculares: embora o estudo tenha se concentrado nas vias de reparo do DNA, é possível que outras vias moleculares também difiram entre os CCRs dos lados direito, esquerdo e do reto. Estudos futuros poderiam explorar outras vias, como vias de sinalização celular ou vias metabólicas, para identificar diferenças adicionais que poderiam ser exploradas para fins terapêuticos.

4. Integração de dados multi-ômicos: nos últimos anos, tem havido um interesse crescente na integração de dados de múltiplas tecnologias ômicas, como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. As análises integrativas podem fornecer um quadro mais completo das diferenças moleculares e clínicas entre os CCRs do lado esquerdo e do lado direito e levar à identificação de novos alvos terapêuticos.

Por fim, nossos resultados contribuem com uma nova perspectiva para uma melhor compreensão do comportamento do CCR, podendo ainda servir como prova de conceito para outros tumores bilaterais como os de mama, ovário, pulmão, testículos ou rim. Este trabalho pode influenciar futuros experimentos, bem como futuras intervenções diagnósticas e terapêuticas em CCR e outros tipos de câncer com assimetrias esquerda-direita.

Referências

- Azar, I., Al Masalmeh, N., Esfandiarifard, S., Virk, G., Kiwan, W., Frank Shields, A., Mehdi, S., & Philip, P. A. (2021). The impact of primary tumor sidedness on survival in early-onset colorectal cancer by stage: A National Veterans Affairs retrospective analysis. *Cancer Medicine*, *10*(9), 2987–2995. <https://doi.org/10.1002/cam4.3757>
- Baek, S. K. (2019). Laterality: Immunological Differences Between Right-Sided and Left-Sided Colon Cancer. *Annals of Coloproctology*, *35*(6), 291–293. <https://doi.org/10.3393/ac.2019.11.11>
- Baran, B., Mert Ozupek, N., Yerli Tetik, N., Acar, E., Bekcioglu, O., & Baskin, Y. (2018). Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Research*, *11*(4), 264–273. <https://doi.org/10.14740/gr1062w>
- Belias, M., Sasaki, K., Wang, J., Andreatos, N., Kamphues, C., Kyriakos, G., Seeliger, H., Beyer, K., Kreis, M. E., & Margonis, G. A. (2022). Is Laterality Prognostic in Resected KRAS-Mutated Colorectal Liver Metastases? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers*, *14*(3), 799. <https://doi.org/10.3390/cancers14030799>
- Benavides, M., Díaz-Rubio, E., Carrato, A., Abad, A., Guillén, C., Garcia-Alfonso, P., Gil, S., Cano, M. T., Safont, M. J., Gravalos, C., Manzano, J. L., Sánchez, A., Alcaide, J., López, R., Massutí, B., Sastre, J., Martínez, E., Escudero, P., Méndez, M., & Aranda, E. (2019). Tumour location and efficacy of first-line EGFR inhibitors in KRAS/RAS wild-type metastatic colorectal cancer: Retrospective analyses of two phase II randomised

Spanish TTD trials. *ESMO Open*, 4(6), e000599.

<https://doi.org/10.1136/esmooopen-2019-000599>

Benedix, F., Kube, R., Meyer, F., Schmidt, U., Gastinger, I., Lippert, H., & Colon/Rectum Carcinomas (Primary Tumor) Study Group. (2010). Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: Differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. *Diseases of the Colon and Rectum*, 53(1), 57–64.

<https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e3181c703a4>

Biedermann, S., Mooney, S., & Hellmann, H. (2011). *Recognition and Repair Pathways of Damaged DNA in Higher Plants*.

<https://doi.org/10.5772/21380>

Blood supply to the colon and rectum—UpToDate. (n.d.). Retrieved January 3, 2023, from

https://www.uptodate.com/contents/image/print?imageKey=SURG%2F73756&source=graphics_gallery&topicKey=91221

Buckowitz, A., Knaebel, H.-P., Benner, A., Bläker, H., Gebert, J., Kienle, P., von Knebel Doeberitz, M., & Kloor, M. (2005). Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *British Journal of Cancer*, 92(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602534>

Burrell, R. A., McGranahan, N., Bartek, J., & Swanton, C. (2013). The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution.

Nature, 501(7467), Article 7467. <https://doi.org/10.1038/nature12625>

Cancer (IARC), T. I. A. for R. on. (n.d.). *Global Cancer Observatory*. Retrieved

October 31, 2022, from <https://gco.iarc.fr/>

- Chae, Y. K., Anker, J. F., Carneiro, B. A., Chandra, S., Kaplan, J., Kalyan, A., Santa-Maria, C. A., Platanias, L. C., & Giles, F. J. (2016). Genomic landscape of DNA repair genes in cancer. *Oncotarget*, *7*(17), 23312–23321. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8196>
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *18*(8), 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- García-de-Teresa, B., Rodríguez, A., & Frias, S. (2020). Chromosome Instability in Fanconi Anemia: From Breaks to Phenotypic Consequences. *Genes*, *11*(12), 1528. <https://doi.org/10.3390/genes11121528>
- Ghosal, K., Agatemor, C., Han, R. I., Ku, A. T., Thomas, S., & Mukherjee, S. (2020). Fanconi Anemia DNA Repair Pathway as a New Mechanism to Exploit Cancer Drug Resistance. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *20*(9), 779–787. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200103114556>
- Glebov, O. K., Rodriguez, L. M., Nakahara, K., Jenkins, J., Cliatt, J., Humbyrd, C.-J., DeNobile, J., Soballe, P., Simon, R., Wright, G., Lynch, P., Patterson, S., Lynch, H., Gallinger, S., Buchbinder, A., Gordon, G., Hawk, E., & Kirsch, I. R. (2003). Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *12*(8), 755–762.

Gottesman, M. M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*, 53, 615–627.

<https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103929>

Grundy, G. J., & Parsons, J. L. (2020). Base excision repair and its implications to cancer therapy. *Essays in Biochemistry*, 64(5), 831–843.

<https://doi.org/10.1042/EBC20200013>

Gueiderikh, A., Maczkowiak-Chartois, F., & Rosselli, F. (2022). A new frontier in Fanconi anemia: From DNA repair to ribosome biogenesis. *Blood Reviews*, 52, 100904. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100904>

<https://doi.org/10.1016/j.blre.2021.100904>

Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., De Sousa E Melo, F.,

Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., ... Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21(11),

Article 11. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>

Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., & Sharma, R. A. (2008).

DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature Reviews.*

Cancer, 8(3), 193–204. <https://doi.org/10.1038/nrc2342>

Huang, R., & Zhou, P.-K. (2021). DNA damage repair: Historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer

therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6, 254.

<https://doi.org/10.1038/s41392-021-00648-7>

Huang, R.-X., & Zhou, P.-K. (2020). DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduction*

- and Targeted Therapy*, 5, 60. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0150-x>
- Hubscher, U., Maga, G., & Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 133–163.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.090501.150041>
- Iacopetta, B. (2002). Are there two sides to colorectal cancer? *International Journal of Cancer*, 101(5), 403–408. <https://doi.org/10.1002/ijc.10635>
- Ijsselsteijn, R., Jansen, J. G., & de Wind, N. (2020). DNA mismatch repair-dependent DNA damage responses and cancer. *DNA Repair*, 93, 102923. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102923>
- Joseph, A. M., & Badrinarayanan, A. (2020). Visualizing mutagenic repair: Novel insights into bacterial translesion synthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(5), 572–582. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa023>
- Kennedy, R., & D'Andrea, A. (2006). DNA Repair Pathways in Clinical Practice: Lessons From Pediatric Cancer Susceptibility Syndromes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24, 3799–3808. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.4171>
- Kim, S. T., Lee, S.-J., Lee, J., Park, S. H., Park, J. O., Lim, H. Y., Kang, W. K., & Park, Y. S. (2017). The Impact of Microsatellite Instability Status and Sidedness of the Primary Tumor on the Effect of Cetuximab-Containing Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Cancer*, 8(14), 2809–2815. <https://doi.org/10.7150/jca.18286>
- Krokan, H. E., & Bjørås, M. (2013). Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a012583.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>

- Laporte, G. A., Leguisamo, N. M., Kalil, A. N., & Saffi, J. (2018). Clinical importance of DNA repair in sporadic colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *126*, 168–185.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.03.017>
- Li, Z., Pearlman, A. H., & Hsieh, P. (2016). DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair*, *38*, 94–101.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.019>
- Malakorn, S., Ouchi, A., Hu, C.-Y., Sandhu, L., Dasari, A., You, Y.-Q. N., Kopetz, E. S., Ellis, L. M., & Chang, G. J. (2021). Tumor Sidedness, Recurrence, and Survival After Curative Resection of Localized Colon Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, *20*(1), e53–e60.
<https://doi.org/10.1016/j.clcc.2020.08.007>
- Marteijn, J. A., Lans, H., Vermeulen, W., & Hoeijmakers, J. H. J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(7), 465–481.
<https://doi.org/10.1038/nrm3822>
- Mokone-Fatunla, D. H., Koto, M. Z., Becker, J. H. R., Bondo, M., & Mundawarara, S. (2019). Laterality of breast cancer at Dr George Mukhari Academic Hospital. *South African Journal of Surgery. Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Chirurgie*, *57*(3), 56.
- Muthye, V., & Lavrov, D. V. (2021). Multiple Losses of MSH1, Gain of mtMutS, and Other Changes in the MutS Family of DNA Repair Proteins in Animals. *Genome Biology and Evolution*, *13*(9), evab191.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evab191>

- Nawa, T., Kato, J., Kawamoto, H., Okada, H., Yamamoto, H., Kohno, H., Endo, H., & Shiratori, Y. (2008). Differences between right- and left-sided colon cancer in patient characteristics, cancer morphology and histology. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *23*(3), 418–423. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04923.x>
- Norris, A. L., Roberts, N. J., Jones, S., Wheelan, S. J., Papadopoulos, N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Hruban, R. H., Klein, A. P., & Eshleman, J. R. (2015). Familial and sporadic pancreatic cancer share the same molecular pathogenesis. *Familial Cancer*, *14*(1), 95–103. <https://doi.org/10.1007/s10689-014-9755-y>
- Olave, M. C., & Graham, R. P. (2022). Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important. *Genes, Chromosomes and Cancer*, *61*(6), 314–321. <https://doi.org/10.1002/gcc.23015>
- Ozcan, M., Janikovits, J., von Knebel Doeberitz, M., & Kloor, M. (2018). Complex pattern of immune evasion in MSI colorectal cancer. *Oncot Immunology*, *7*(7), e1445453. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1445453>
- Pan, M., Jiang, C., Tse, P., Achacoso, N., Alexeeff, S., Solorzano, A. V., Chung, E., Hu, W., Truong, T.-G., Arora, A., Sundaresan, T., Suga, J. M., Thomas, S., & Habel, L. A. (2022). TP53 Gain-of-Function and Non-Gain-of-Function Mutations Are Differentially Associated With Sidedness-Dependent Prognosis in Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *40*(2), 171–179. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02014>

- Passardi, A., Canale, M., Valgiusti, M., & Ulivi, P. (2017). Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6), E1324. <https://doi.org/10.3390/ijms18061324>
- Peake, J. D., & Noguchi, E. (2022). Fanconi anemia: Current insights regarding epidemiology, cancer, and DNA repair. *Human Genetics*, *141*(12), 1811–1836. <https://doi.org/10.1007/s00439-022-02462-9>
- Petrelli, F., Tomasello, G., Borgonovo, K., Ghidini, M., Turati, L., Dalleria, P., Passalacqua, R., Sgroi, G., & Barni, S. (2017). Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncology*, *3*(2), 211–219. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.4227>
- PhD, Bourré, L. , (2020). *DNA Damage Response (DDR)*. Retrieved February 21, 2023, from <https://blog.crownbio.com/dna-damage-response>
- Qiu, R., Sakato, M., Sacho, E. J., Wilkins, H., Zhang, X., Modrich, P., Hingorani, M. M., Erie, D. A., & Weninger, K. R. (2015). MutL traps MutS at a DNA mismatch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(35), 10914–10919. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505655112>
- Rebersek, M. (2020). Consensus Molecular Subtypes (CMS) in Metastatic Colorectal Cancer—Personalized Medicine Decision. *Radiology and Oncology*, *54*(3), 272–277. <https://doi.org/10.2478/raon-2020-0031>
- Reilly, N. M., Novara, L., Di Nicolantonio, F., & Bardelli, A. (2019). Exploiting DNA repair defects in colorectal cancer. *Molecular Oncology*, *13*(4), 681–700. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12467>

Roychoudhuri, R., Putcha, V., & Møller, H. (2006). Cancer and Laterality: A Study of The Five Major Paired Organs (UK). *Cancer Causes & Control*, 17(5), 655–662. <https://doi.org/10.1007/s10552-005-0615-9>

Sargent, D. J., Marsoni, S., Monges, G., Thibodeau, S. N., Labianca, R., Hamilton, S. R., French, A. J., Kabat, B., Foster, N. R., Torri, V., Ribic, C., Grothey, A., Moore, M., Zaniboni, A., Seitz, J.-F., Sinicrope, F., & Gallinger, S. (2010). Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(20), 3219–3226. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.1825>

Sasaki, K., Andreatos, N., Margonis, G. A., He, J., Weiss, M., Johnston, F., Wolfgang, C., Antoniou, E., Pikoulis, E., & Pawlik, T. M. (2016). The prognostic implications of primary colorectal tumor location on recurrence and overall survival in patients undergoing resection for colorectal liver metastasis. *Journal of Surgical Oncology*, 114(7), 803–809. <https://doi.org/10.1002/jso.24425>

Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(11), 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>

Shilkin, E. S., Boldinova, E. O., Stolyarenko, A. D., Goncharova, R. I., Chuprov-Netochin, R. N., Khairullin, R. F., Smal, M. P., & Makarova, A. V. (2020). Translesion DNA Synthesis and Carcinogenesis. *Biochemistry. Biokhimiia*,

85(4), 425–435. <https://doi.org/10.1134/S0006297920040033>

Silvestri, R., & Landi, S. (2019). DNA polymerases in the risk and prognosis of colorectal and pancreatic cancers. *Mutagenesis*, 34(5–6), 363–374. <https://doi.org/10.1093/mutage/gez031>

Stintzing, S., Wirapati, P., Lenz, H.-J., Neureiter, D., Fischer von Weikersthal, L., Decker, T., Kiani, A., Kaiser, F., Al-Batran, S., Heintges, T., Lerchenmüller, C., Kahl, C., Seipelt, G., Kullmann, F., Moehler, M., Scheithauer, W., Held, S., Modest, D. P., Jung, A., ... Heinemann, V. (2019). Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial. *Annals of Oncology*, 30(11), 1796–1803. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz387>

Sugai, T., Habano, W., Jiao, Y.-F., Tsukahara, M., Takeda, Y., Otsuka, K., & Nakamura, S. (2006). Analysis of Molecular Alterations in Left- and Right-Sided Colorectal Carcinomas Reveals Distinct Pathways of Carcinogenesis. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 8(2), 193–201. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.050052>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Takasu, C., Nishi, M., Yoshikawa, K., Tokunaga, T., Kashihara, H., Yoshimoto, T., & Shimada, M. (2020). Impact of sidedness of colorectal cancer on

tumor immunity. *PLOS ONE*, 15(10), e0240408.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240408>

Testa, U., Pelosi, E., & Castelli, G. (2018). Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Medical Sciences*, 6(2), 31.

<https://doi.org/10.3390/medsci6020031>

van der Sijp, M. P. L., Bastiaannet, E., Mesker, W. E., van der Geest, L. G. M., Breugom, A. J., Steup, W. H., Marinelli, A. W. K. S., Tseng, L. N. L.,

Tollenaar, R. A. E. M., van de Velde, C. J. H., & Dekker, J. W. T. (2016).

Differences between colon and rectal cancer in complications, short-term survival and recurrences. *International Journal of Colorectal Disease*, 31(10), 1683–1691.

<https://doi.org/10.1007/s00384-016-2633-3>

Vatandoust, S., Price, T. J., & Karapetis, C. S. (2015). Colorectal cancer:

Metastases to a single organ. *World Journal of Gastroenterology*,

21(41), 11767–11776. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11767>

Wang, W., Xu, J., Chong, J., & Wang, D. (2018). Structural basis of DNA lesion recognition for eukaryotic transcription-coupled nucleotide excision

repair. *DNA Repair*, 71, 43–55.

<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.006>

Wright, W. D., Shah, S. S., & Heyer, W.-D. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*,

293(27), 10524–10535.

<https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372>

Yamada, Y., Mabuchi, S., Kawahara, N., & Kawaguchi, R. (2021). Prognostic

significance of tumor laterality in advanced ovarian cancer. *Obstetrics & Gynecology Science*, 64(6), 524–531.

<https://doi.org/10.5468/ogs.21176>

Yamamoto, H., & Hirasawa, A. (2022). Homologous Recombination Deficiencies and Hereditary Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijms23010348>

Yang, W., & Gao, Y. (2018). Translesion and Repair DNA Polymerases: Diverse Structure and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 239–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012405>

Zeinalian, M., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Salehi, R., & Emami, M. H. (2018). Clinical Aspects of Microsatellite Instability Testing in Colorectal Cancer. *Advanced Biomedical Research*, 7, 28.

https://doi.org/10.4103/abr.abr_185_16

Zeng, H., Nanayakkara, G. K., Shao, Y., Fu, H., Sun, Y., Cueto, R., Yang, W. Y., Yang, Q., Sheng, H., Wu, N., Wang, L., Yang, W., Chen, H., Shao, L., Sun, J., Qin, X., Park, J. Y., Drosatos, K., Choi, E. T., ... Yang, X. (2018). DNA Checkpoint and Repair Factors Are Nuclear Sensors for Intracellular Organelle Stresses—Inflammations and Cancers Can Have High Genomic Risks. *Frontiers in Physiology*, 9.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00516>

Zhang, X., Yin, M., & Hu, J. (2022). Nucleotide excision repair: A versatile and smart toolkit. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 54(6), 807–819.

<https://doi.org/10.3724/abbs.2022054>

Zhang, Y., Chen, F., Chandrashekar, D. S., Varambally, S., & Creighton, C. J.

(2022). Proteogenomic characterization of 2002 human cancers reveals pan-cancer molecular subtypes and associated pathways. *Nature Communications*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30342-3>

Zhao, S., Tadesse, S., & Kidane, D. (2021). Significance of base excision repair to human health. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 364, 163–193. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.05.002>

Apêndice

Minicurrículo do autor:

Juliano de Oliveira Silveira

Biomédico CRBM-5 5560

Mestre em Biologia Celular e Molecular

Especialista em Análises Clínicas e Vigilância Sanitária

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Funcionário público - Especialista em Saúde da Secretaria Estadual de Saúde
- LACEN-RS, Porto Alegre, Brasil.

AGOSTO 2022 - PRESENTE

Funcionário público - Técnico de laboratório da Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

OUTUBRO 2021 - AGOSTO 2022

Analista Clínico do Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa de
Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

ABRIL 2020 - OUTUBRO 2021

EDUCAÇÃO

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio
Grande do Sul, Brasil - ***Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular - Doutorado***

Orientadora: Dra. Jenifer Saffi

AGOSTO 2018 - PRESENTE

- **New York University Shanghai, Shanghai, China** - *Estágio Científico no JS Kang Lab.* High-content image analysis of drug combination effects on cancer cells.

Orientador: Dr. Jungseog Kang

MAIO 2019 - AGOSTO 2019

Centro Universitário Internacional (UNINTER), Porto Alegre, Rio Grande do
Sul, Brasil - ***Vigilância Sanitária - Pós Graduação Lato Sensu***

ABRIL 2018 - MAIO 2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Mestrado**

Orientadora: Dr. Karen Haag

MARÇO 2015 - JUNHO 2017

- **Illinois Institute of Technology, Chicago, IL, EUA** - *Estágio Científico no Pombert Lab. Computational genomics: Assembly, annotation and comparative genomics.*

Orientador: Dr. Jean François Pombert

JANEIRO 2016 - MARÇO 2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - **Bacharelado em Biomedicina**

Orientador: Dr. Hugo Verli

MARÇO 2010 - DEZEMBRO 2014

- **Missouri State University, Springfield, MO, EUA** - *Intercâmbio como bolsista do programa Ciência Sem Fronteiras*

AGOSTO 2012 - MAIO 2013

- **New York University, New York City, NY, EUA** - *Intercâmbio como bolsista do programa Ciência Sem Fronteiras*

MAIO 2013 - AGOSTO 2013

DESENVOLVIMENTO PROFISSIONAL

Instabilidade Genômica e Ferramentas Para Seu Estudo, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil - **Disciplina. Docente Ensino Superior.**

MARÇO - MAIO 2019

Winter Institute in Statistical Genetics, New York University Abu Dhabi, Abu Dhabi, Emirados Árabes Unidos - **Workshop. Aluno.**

JANEIRO 2019

Experiência Beta 2018, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil - **Encontro Nacional do Cientista Beta. Avaliador de projetos.**

DEZEMBRO 2018

1º Seminário de Internacionalização da UFCSPA, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil - **Participante.**

OUTUBRO 2018

Experiência Beta 2017, UNISINOS, São Leopoldo, Brasil - **Encontro Nacional do Cientista Beta. Avaliador de projetos.**

DEZEMBRO 2017

X-Meeting, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil - **Reunião Científica de Bioinformática.** Silveira JO, Pombert JF, Haag K. **“Buscando elementos genômicos de reprodução sexual em um patógeno microsporídeo.”** - Apresentador de pôster.

OUTUBRO 2016

The Genomics Bootcamp Workshop, UFRGS, Porto Alegre, Brasil - **Workshop de genômica computacional. Aluno.**

AGOSTO 2015

Sétima Escola de Modelagem Molecular de Sistemas Biológicos, Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), Petrópolis, Brasil - **Workshop e Encontro Científico. Atendente e Apresentador.** Silveira JO, Ligabue-Braun R, Verli H. **“Ativação de Ureases: Inferências Evolucionárias via Filogenia e Análise de Desordem Estrutural.”** - Apresentador de pôster.

AGOSTO 2014

Evolução, Filogenética e Análise Filogenética, UFRGS, Porto Alegre, Brasil - **Curso Teórico e Prático. Aluno.**

JULHO 2014

PRÊMIOS

Undergraduate Research Day - Missouri State University, Springfield, MO, EUA
- Primeiro lugar na categoria Química. “Analysis of Conformational Change in DNA Double Helix by 8-oxo-G Single Base Modifications” - Orientador: Dr. Gary Meints

MAIO 2013