

MARCADORES PREDITIVOS E PROGNÓSTICOS PARA MEDICINA PERSONALIZADA DO CÂNCER COLORETAL

PREDICTIVE AND PROGNOSTIC BIOMARKERS FOR PERSONALIZED MEDICINE OF COLORECTAL CANCER

Amanda Vilefort de Melo¹; Rafaela Marcelle Pacheco Silva¹; Warne Pedro Andrade², Letícia da Conceição Braga³

^{1,3}Instituto Metodista Izabela Hendrix. Rua da Bahia, 2020 – Lourdes 30160-012 Belo Horizonte – MG. ²Núcleo Hematologia e Oncologia leticia.braga@izabelahendrix.metodista.br.

RESUMO

O câncer colo-retal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo sendo responsável, em 2012, por 694.000 mortes em todo o mundo. Apesar dos avanços ocorridos no tratamento do CCR nos últimos anos, a taxa de mortalidade permanece alta, por esse motivo tem se buscado marcadores moleculares que possam auxiliar na individualização do tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes. O presente estudo teve por objetivo realizar meta-análise nas bases de dados PUBMED, COCHRANE LIBRARY e CLINICAL TRIALS, no período entre 2008 a 2018, a fim identificar marcadores preditivos e prognósticos descritos para o CCR. Foi adotada uma estratégia de busca baseada em descritores em inglês, vinculados aos operadores booleanos (AND/OR). Foram incluídos 16 estudos para a realização da meta-análise proposta. A análise, envolvendo 9.114 pacientes com CCR, revelou seis marcadores [deficiência de MMR (dMMR) e expressão das proteínas VEGF-D, TOPO2a+/EGFR-/TP170-, maspin nuclear e Ciclina nuclear D1a e a variante DPYD c.1129-5923 C>G/ hapB3] como preditivos e 10 marcadores [TP53 mutante, KRAS mutante, expressão do miR-326, expressão das proteínas CatS, ERCC-1, SMAD 4 em tumores com MSI, da Proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1), mutação V600E em BRAF combinada com mutação em KRAS em tumores com proficiência de MMR (pMMR) e expressão do mRNA de LGR5 e de GUCY2C] como prognósticos. Observou-se que a expressão da proteína VEGF-D (RR: 2.35 [1,80-3,08]) foi o melhor marcador preditivo identificado para CCR e a expressão do mRNA do gene GUCY2C (RR: 44.35 [28,75-68,42]) foi o melhor marcador prognóstico. Apesar das melhorias encorajadoras no tratamento e do desfecho clínico dos pacientes com CCR nas últimas duas décadas, apenas o KRAS entrou recentemente na prática clínica como um marcador preditivo de resposta à terapia com o anticorpo anti-EGFR. No entanto, o presente estudo ressalta que, a validação clínica de novos marcadores para o CCR é necessária à prática médica e poderá estratificar os pacientes com CCR com grande resolução permitindo otimizar os tratamentos.

Palavras-chave: marcadores moleculares, marcadores preditivos, marcadores prognósticos, 5- FU, câncer colo-retal.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the third cancer type in the world. In 2012, it was responsible for 694,000 deaths worldwide. Despite advances in the treatment of CRC, the mortality rate remains high. For this reason, molecular markers approaches could help personalized treatment and increase quality of life and life extension of patients. This study aimed to perform a metaanalysis of the molecular markers in CRC patients. Using english descriptors, linked to Boolean operators (AND / OR), 16 studies, published between 2008 and 2018, were selected from searches of PUBMED, COCHRANE LIBRARY and CLINICAL TRIALS. Our metaanalysis involved 9,114 patients with CRC identified six molecular markers [MMR deficiency (dMMR), TOPO2a+/EGFR-/TP170-, nuclear maspin and Nuclear Cyclin D1a protein expression and DPYD c.1129-5923 C> G / hapB3 variant] as predictive and 10 markers [*TP53* mutant, *KRAS* mutant, expression of miR-326, protein VEGF-D, CatS, ERCC-1, SMAD 4 in MSI and Protein-1 monocyte chemotactic (MCP-1), BRAF V600E/*KRAS* mutant in tumors with MMR proficiency (pMMR), *LGR5* and *GUCY2C* mRNA expression] as prognosis markers. VEGF-D expression (OR: 2.35 [1.80-3.08]) was the best predictive marker while *GUCY2C* gene expression was the best CRC prognosis marker (OR: 44.35 [28.75-68.42]). Despite the improvements in CRC treatment and patient outcome at last two decades, only *KRAS* were introduced clinically as a predictive marker of anti-EGFR therapy. Therefore, clinical validation of new biomarkers is necessary in order to stratify CRC patients at a higher resolution, allowing for optimized treatment.

Keywords: Molecular markers, Predictive markers, prognostic markers, 5-FU, Colorectal cancer.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum no mundo, sendo que 70% das ocorrências dessa neoplasia são esporádicas⁽¹⁾. Segundo dados da World Health Organization (WHO)⁽²⁾, em 2018, no mundo, o número de mortes por CCR foi de 1,8 milhões de mortes onde os países menos desenvolvidos responderam por 70% dessas mortes. Para o Brasil, foi estimado nos anos de 2018-2019 17.380 casos novos de CCR, com risco estimado de 16,83 casos novos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres. Ainda segundo dados do INCA, em 2015, 8.163 óbitos foram provocados por CCR em homens e 8.533 em mulheres⁽³⁾.

O CCR é uma neoplasia heterogênea, que surge a partir de mutações em genes específicos chamados oncogenes e genes supressores de tumor e pode ser classificado em carcinomas esporádicos ou de história familiar. Evidências atuais demonstraram que o CCR tem seu processo de tumorigênese iniciado com a mutação no gene polipose adenomatosa coli (APC), um gene supressor de tumor que tem como função normal a regulação negativa da via WNT, através do direcionamento da β -catenina para a degradação proteossômica, sendo assim o principal gene dessa via. Mutações nesse gene causam uma síndrome de câncer hereditário, conhecida como polipose adenomatosa familiar (PAF)^{1,3}, bem como tumores esporádicos que não estão relacionados à predisposição genética ou à história familiar da doença.

O processo de tumorigênese se inicia com a via WNT, que tem um papel fundamental na diferenciação de células-tronco e no crescimento celular, favorecendo o aparecimento do tumor. Além disso, as alterações nessa via estão associadas a uma adesão celular reduzida e, portanto, favorece a migração e a metástase⁽⁵⁾. Outras vias sinalizadoras da carcinogênese para diferentes tipos de câncer também são descritas no CCR, tais como as vias MAPK e PI3K, envolvidas na proliferação e sobrevivência celular, o que confere vantagens proliferativas às células tumorais. As principais mutações descritas nessas vias são nos genes Proto-oncogene KRAS (KRAS), Proto-oncogene B-Raf/serina / treonina quinase (BRAF) e fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase subunidade alfa catalítica (PI3K)⁽⁶⁾. A via TGF- β , por sua vez, possui papel imprescindível em processos celulares fundamentais, como diferenciação, crescimento ou apoptose, tendo como um dos principais genes o Membro 4 da família SMAD (SMAD4)⁽⁷⁾. Todas essas vias conferem vantagem na tumorigênese e determinam a progressão da doença e a resposta ao tratamento⁽⁴⁾.

Nos últimos anos, ocorreram grandes avanços no tratamento do CCR. Entretanto, a mortalidade dessa doença permanece alta, com 40 a 50% dos pacientes evoluindo ao óbito⁽⁶⁾. O estágio da doença, permanece como principal fator prognóstico. Para pacientes com CCR diagnosticado em estágio localizado, a

sobrevida livre da doença (SLD) em cinco anos de 90%, enquanto para diagnósticos em estágios mais avançados, a SLD em cinco anos é de menos de 10%⁽⁸⁾. Além disso, o CCR geralmente está associado a uma perda da qualidade de vida dos pacientes afetados, o que poderá estar relacionada às consequências diretas da doença e/ou do tratamento⁽⁶⁾.

Devido a esses fatores, a busca de marcadores moleculares que possam auxiliar na individualização do tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes é extremamente relevante. Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares, os marcadores preditivos e prognósticos, são os principais marcadores utilizados para esse propósito. Marcadores preditivos são utilizados para definir a correspondência de terapias direcionadas que sejam mais eficazes e para prevenção da toxicidade de terapias sistêmicas, enquanto que, os marcadores prognósticos identificam mutações somáticas que podem levar a uma piora nas taxas de sobrevida dos pacientes e aumentar o risco de metastases e quimioresistência⁽⁹⁾. O presente estudo tem como objetivo realizar o levantamento dos principais marcadores moleculares preditivos e/ou prognósticos descritos na literatura para CCR e também realizar uma meta-análise para elucidar qual o melhor marcador preditivo e prognóstico para o CCR.

MATERIAIS E MÉTODOS

ESTRATÉGIA DE BUSCA

Este estudo trata-se de uma revisão sistemática seguida de meta-análise, elaborada com bases em artigos científicos sobre marcadores moleculares para o CCR, retirados da base de dados do PUBMED, COCHRANE LIBRARY, no período entre 2008 a 2018. Como estratégia de busca foi adotada a procura, por artigos em inglês, usando os descritores mencionados abaixo, com o auxílio de aspas para identificação de palavras compostas e vinculados aos operadores booleanos (AND/OR). As aplicações na busca ocorreram da seguinte forma: (i) “molecular markers” or “predictive markers” and “colorectal cancer”; (ii)

“molecular markers” or “prognosis markers” and “colorectal cancer”; (iii) “molecular markers” and “colon cancer”; (iv) “molecular markers” and “prognosis markers” or “predictive markers” and “colorectal cancer”; (v) “prognosis markers” or “predictive markers” and “colon cancer” ; (vi) “molecular markers” and “colorectal cancer” or “colon cancer”.

A busca também incluiu estudos clínicos disponíveis na base de dados do clinical trials, no mesmo período, que abordassem sobre marcadores moleculares preditivos e prognósticos para o CCR. A estratégia de busca para os estudos clínicos foi a mesma adotada para a busca de artigos, porém um número menor de descritores foi utilizado, porque o buscador da base possui um limitador de palavras. As aplicações ocorreram da seguinte forma: (i) “Molecular markers” or 5-FU and “colorectal cancer”; (ii) 5-FU and “colorectal cancer”; (iii) “colorectal cancer” and “molecular markers”.

Para fins de agrupamento dos artigos e estudos clínicos que compõem este trabalho, após a exportação nas bases de dados, foi feita uma análise manual dos mesmos, que serviu como base para a eliminação de estudos clínicos e artigos que se encaixavam nos critérios de exclusão e artigos duplicados.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão desse estudo foram: artigos completos publicados nos últimos 10 anos em inglês, apresentando estudos clínicos transversais ou caso controle em fase de recrutamento ou concluídos associados a pacientes com CCR, em qualquer estágio da doença, tratado com 5- Fluorouracil (5-FU).

Os critérios de exclusão foram: artigos do tipo revisões narrativa, sistemática ou meta-análise), diretrizes clínicas, artigos em outros idiomas, sem associação com CCR, que não abordassem marcadores moleculares preditivos e/ou prognósticos e publicações anteriores à 2008.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a seleção dos estudos e identificação das possíveis variáveis, os resultados foram inseridos no programa REVMAN 5 (versão 5.3.5) disponível em [http://www.community.cochrane.org/](http://www.community.cochrane.org/>.). Foram utilizados os seguintes parâmetros

para identificação dos marcadores preditivos: presença de mutação e/ou no nível de expressão da proteína e/ou mRNA do gene alvo, que resultaram em benefício da terapia. Para os marcadores prognósticos foram considerados a presença de mutação e/ou no nível de expressão da proteína ou mRNA do gene alvo que resultaram em melhores taxas de sobrevida global (SG), SLD e tempo de recorrência do tumor (ITT). Foi aplicada análise estatística randômica de proporção univariada, com intervalo de confiança de 95% (IC95%) para estimar os marcadores moleculares (preditivos e prognósticos) mais eficientes identificados.

RESULTADOS

A busca inicial por artigos e estudos clínicos nas bases de dados, utilizando os descritores apresentados na metodologia, identificaram 512 artigos e 115 estudos clínicos. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão na forma de filtros, foram excluídos 489 artigos e 107 estudos clínicos em virtude de duplicidade, falta de enquadramento ao tema proposto pelo trabalho e pelo tipo de estudo realizado. 23 artigos e oito estudos clínicos foram selecionados para uma análise manual e leitura integral. Após esta análise, outros 10 artigos e cinco estudos clínicos foram excluídos por não se tratarem de estudos transversais e caso controle ou não se enquadarem no tema proposto. Assim, foram selecionados 13 artigos e três estudos clínicos como elegíveis para a revisão sistemática e meta-análise (Figura 1, Tabela 1).

Os 13 artigos e três estudos clínicos elegíveis foram publicados nos últimos 10 anos sendo realizados em diversos países dos seguintes continentes: América, Europa e Ásia. Em três artigos não foi possível determinar em qual localidade os estudos foram conduzidos. Ao todo 16 marcadores, 10 marcadores prognósticos e seis marcadores preditivos para o CCR, foram identificados. Nas análises dos marcadores moleculares identificados foram avaliadas mutações somáticas, alterações no perfil de metilação do DNA e nos níveis de expressão de mRNA,

microRNAs (miRNAs) e proteínas associadas ao CCR. O método mais utilizado para a descoberta dos marcadores foi imunohistoquímica (Tab. 1).

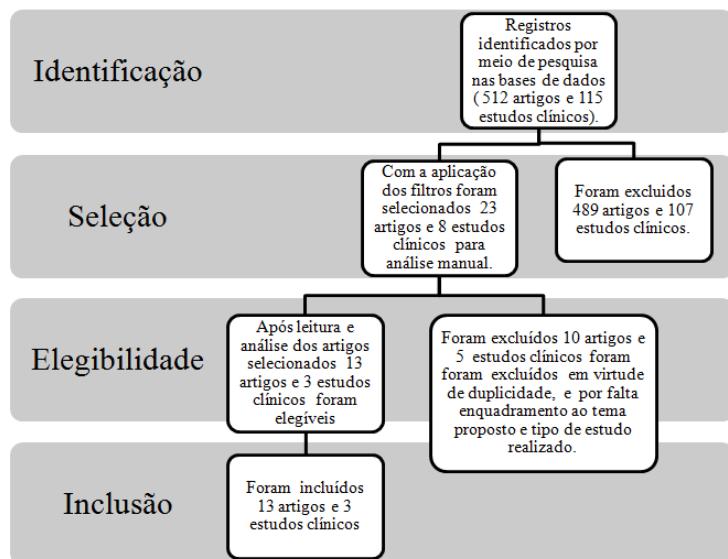


Figura 1: Fluxograma de artigos e estudos clínicos elegíveis.

A casuística avaliada na meta-análise foi composta de 9.114 pacientes com CCR, sendo que o número de mulheres 4.100 (45%) e o número de homens 5.014 (55%). A média de idade dos pacientes foi maior que 50 anos em 87% dos estudos. Dessa população, cerca de 4.010 pacientes se encontravam em estágios iniciais da doença (I/II) e 5.104 pacientes estavam com o câncer em estágio avançado (III/IV).

Os resultados da meta-análise mostraram que a média de RR entre os estudos que foi 0,91 (0,45-1,86). O melhor marcador preditivo encontrado para o CCR foi a expressão da proteína VEGF-D, proposto no estudo clínico de Tabernero et al (2015) ⁽¹⁵⁾ (RR: 2,35; IC95% 1,80-3,08) (Tab. 2). Sendo que 3/6 estudos considerado o RR foi maior que 1, o que significa que nesses estudos os marcadores levaram a um maior efeito benefício da quimioterapia nos pacientes que apresentaram o marcador do estudo (Fig. 2).

Tabela 1- Características gerais dos estudos avaliados na revisão sistemática e meta-análise.

Autores	Número de casos	Marcador estudado	M	Método utilizado	RR
Alex et al ⁽¹⁰⁾	762	MMR deficiente	PE	1 e 7	0.33
Han et al ⁽¹¹⁾	953	Expressão de TOPO2a, EGFR e TP170	PE	7 e 10	1.02
Hestetun et al ⁽¹²⁾	425	Expressão de Nuclear maspin	PE	7	0.30
Lee et al ⁽¹³⁾	1953	Expressão de DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3	PE	8	1.47
Myklebust et al ⁽¹⁴⁾	412	Ciclina Dla e Dlb	PE	7	1.21
Tabernero et al ⁽¹⁵⁾	1072	Expressão de VEGF-D	PE	6 e 7	2.35
Gormley et al ⁽¹⁶⁾	560	Expressão de CatS	PO	7	4.50
Kandioler et al ⁽¹⁷⁾	572	Mutação do TP53	PO	1	3.14
Kjersem et al ⁽¹⁸⁾	24	Expressão do miR-326	PO	10	0.31
Mejia et al ⁽¹⁹⁾	360	Expressão do mRNA GUCY2C	PO	3	44.35
Parekh et al ⁽²⁰⁾	376	Expressão de ERCC-1	PO	2	1.07
Roth et al ⁽²¹⁾	3278	Expressão de SMAD 4 em relação tumores com MSI	PO	1, 2 e 7	0.01
Sinicroppe et al ⁽²²⁾	2720	Mutação do BRAF, KRAS e MMR	PO	1, 3 e 5	0.72
Smith et al ⁽²³⁾	1076	Mutação do KRAS	PO	4	1.01
Stanisavljevic et al ⁽²⁴⁾	412	Expressão do mRNA LGR5	PO	9	1.18
Watanabe et al ⁽²⁵⁾	101	Expressão de Proteína-1 quimiotática de monócitos	PO	7	0.51

Tipo de marcador (M): Preditivo (PE) e Prognóstico (PO); Método utilizado: (1) sequenciamento de DNA, (2) PCR quantitativa em tempo real, (3) RT-PCR, (4) PCR-ARMS, (5) PCR metilação específica, (6) imunoblotting, (7) imunohistoquímica, (8) spectrometria de massa (MALDI-TOF), (9) hibridização in situ, (10) análise da expressão de mRNA; RR: Risco Relativo.

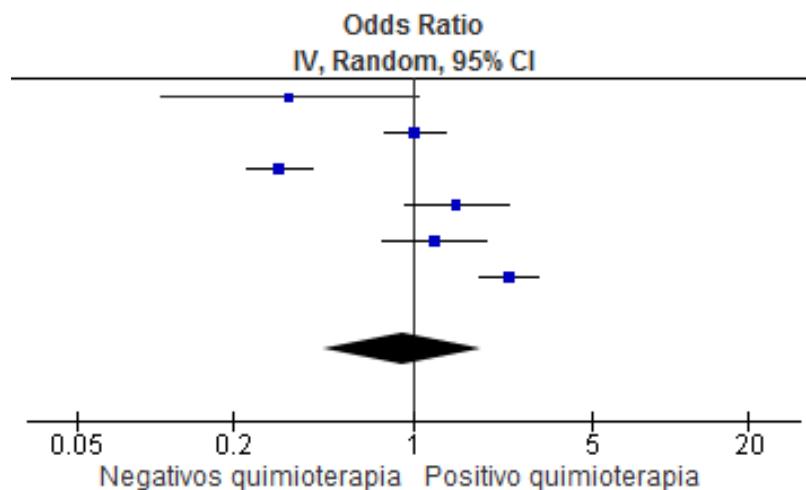


Figura 2 - “Forest Plot” relacionando os marcadores preditivos e o seu benefício para a quimioterapia.

A Tabela 3 apresenta a análise a partir dos estudos com marcadores prognósticos. A média de RR obtida foi 1,02 (0,31-3,37). O melhor marcador prognóstico identificado para o CCR foi a expressão do mRNA do gene *GUCY2C* descrito por Meija et al⁽¹⁹⁾ (RR: 44,35 IC95% 28,75-68,42). Observa ainda que, na maioria dos estudos considerados (6/10), RR foi próximo ou maior que 1, o que significa que esses marcadores foram capazes de identificar grupos de pacientes com maiores taxas de sobrevida (Figura 3).

Tabela 2 – Risco Relativo obtido para os marcadores preditivos evidenciados em cada estudo.

Estudo ou subgrupo	Marcação positiva		Marcação Negativa		Peso	RR (95% CI)				
	Eventos	Total	Eventos	Total						
Alex et al 2016 ⁽¹⁰⁾	4	34	24	84	12.4%	0.33 [0.11, 1.05]				
Han et al 2016 ⁽¹¹⁾	150	453	148	453	17.9%	1.02 [0.77, 1.35]				
Hestetun et al 2015 ⁽¹²⁾	135	380	245	380	17.8%	0.30 [0.23, 0.41]				
Lee et al 2016 ⁽¹³⁾	46	638	32	638	17.0%	1.47 [0.92, 2.34]				
Myklebust et al 2012 ⁽¹⁴⁾	76	145	69	145	17.0%	1.21 [0.77, 1.92]				
Tabernero et al 2015 ⁽¹⁵⁾	270	446	176	446	17.9%	2.35 [1.80, 3.08]				
Total (95% CI)	2096		2146		100.0%	0.91 [0.45, 1.86]				
Total de Eventos	681		694							
Heterogeneidade: $\tau^2 = 0.72$; $\chi^2 = 107.71$, $df = 5$ ($P < 0.00001$); $I^2 = 95\%$										
Teste para efeito global: $Z = 0.26$ ($P = 0.80$)										

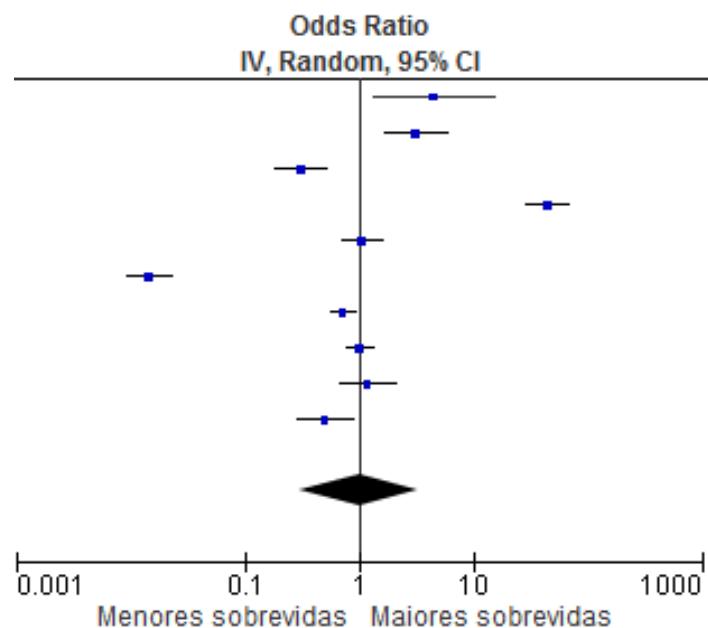


Figura 3 - “Forest Plot” relacionando os marcadores prognósticos com as maiores taxas de sobrevida.

Tabela 3 – Odds Ratio obtido para os marcadores prognósticos evidenciados em cada estudo.

Estudo ou subgrupo	Marcação positiva		Marcação Negativa		Peso	RR (95% CI)				
	Eventos	Total	Eventos	Total						
Gormley et al 2011 ⁽¹⁶⁾	11	17	11	38	9.3	4.50 [1.33, 15.20]				
Kandioler et al 2015 ⁽¹⁷⁾	119	143	49	80	10.0%	3.14 [1.67, 5.88]				
Kjersem et al 2014 ⁽¹⁸⁾	44	123	79	123	10.0%	0.31 [0.18, 0.52]				
Mejia et al 2009 ⁽¹⁹⁾	313	360	47	360	10.1%	44.35 [28.75, 68.42]				
Parekh et al 2016 ⁽²⁰⁾	67	188	64	188	10.1%	1.07 [0.70, 1.64]				
Roth et al 2012 ⁽²¹⁾	44	408	364	408	10.1%	0.01 [0.01, 0.02]				
Sinicroppe et al 2015 ⁽²²⁾	138	437	265	680	10.2%	0.72 [0.56, 0.93]				
Smith et al 2010 ⁽²³⁾	204	358	285	502	10.2%	1.01 [0.77, 1.33]				
Stanisavljevic et al 2016 ⁽²⁴⁾	40	66	108	191	10.0%	1.18 [0.67, 2.09]				
Watanabe et al 2008 ⁽²⁵⁾	42	101	59	101	10.0%	0.51 [0.29, 0.89]				
Total (95% CI)	2201		2671		100.0%	1.02 [0.37, 3.37]				
Total de eventos	1022		1331							
Heterogeneidade: $\tau^2 = 3.65$; $\chi^2 = 690.43$, $df = 9$ ($P < 0.00001$); $I^2 = 99\%$										
Teste para efeito global: $Z = 0.03$ ($P = 0.98$)										

DISCUSSÃO

Vários alvos moleculares veem sendo estudados como marcadores preditivos e prognósticos para o CCR⁽⁹⁾. O presente estudo revelou por meio de uma meta-análise, envolvendo 9.114 pacientes com CCR, seis marcadores como preditivos e 10 prognósticos. Os marcadores preditivos foram: dMMR e expressão das proteínas Ciclina Nuclear D1a, Maspin Nuclear, TOPO2a+/EGFR-/TP170-, VEGF-D e a variante DPYD c.1129-5923 C>G/ hapB3 (Tab. 1). Observou-se que a expressão da proteína VEGF-D (RR: 2,35; IC95% 1,80-3,08) foi o melhor marcador preditivo.

O reparo de reparo de mal pareamento do DNA ou “mismatch repair” (MMR) é responsável pela manutenção da estabilidade do genoma. De modo que, mutações em genes desta via causam deficiência do MMR (dMMR), o que resulta em um fenômeno conhecido como instabilidade de microssatélite (MSI)⁽¹⁰⁾. A MSI é um importante biomarcador no CCR, com implicações cruciais no diagnóstico, prognóstico e, mais recentemente, na predição terapêutica. O teste de dMMR/MSI é recomendado durante a triagem para a síndrome de Lynch, uma doença hereditária autossômica dominante que é caracterizada por mutações germinativas nos genes MMR e associada a um risco aumentado de vários tipos de câncer, incluindo CCR⁽²⁶⁾. Além disso, o estado MSI-high (MSI-H) tem sido associado a um melhor prognóstico dos pacientes com CCR⁽²⁷⁾.

Além disso, usando dados de ensaios clínicos randomizados que incluíram pacientes com dMMR CCR e uso de terapia baseada em 5-FU comparados com o grupo controle, composto de pacientes com dMMR CCR que somente receberam tratamento cirúrgico, permitiu definir que o *status* de MMR pode fornecer uma metodologia sensível para estratificação de pacientes com CCR para terapia adjuvante baseada em 5-FU, uma vez que a SLD apresentados pelo primeiro grupo foi significativamente mais promissores que no grupo controle⁽²⁸⁾. Além disso, Alex et al⁽¹⁰⁾ demonstraram que o *status* dMMR em pacientes com CCR metastático

determinava a resistência (menor resposta ao tratamento) à quimioterapia baseada em oxaliplatina enquanto que pacientes pMMR eram mais sensíveis.

A Ciclina Dependente de Quinase (CDK) é um complexo heterodimérico composto de uma subunidade catalítica, a CDK e uma subunidade reguladora chamada ciclina que são responsáveis pelas transições do ciclo celular. Das várias famílias de CDKs e ciclinas, a superexpressão de ciclina D1 é mais frequentemente associada a malignidade humana e possui um papel como um sensor mitogênico para a máquina do ciclo celular⁽²⁹⁾.

Outro estudo identificou a interação entre ciclina nuclear D1 e proteínas de reparo do DNA. Os autores demonstraram que o recrutamento da ciclina D1a, mas não da ciclina D1b, para a cromatina é suficiente para que a resposta ao dano no DNA (DDR) seja iniciada, o que indicou que o silenciamento endógeno de ciclina D1, em células de CCR tratadas com 5-FU, reduz a DDR em resposta ao tratamento⁽³⁰⁾. Devido a esse papel, Myklebust et al⁽¹⁴⁾ estudaram o papel da ciclina D1 como marcador molecular do CCR, eles descobriram que alta expressão da ciclina D1 prediz resposta favorável para terapia adjuvante com 5-FU em pacientes com CCR.

Hestetun et al⁽¹²⁾ demonstraram que a baixa expressão de Maspin Nuclear em pacientes com CCR primário foi capaz de predizer o benefício da quimioterapia adjuvante 5-FU combinada com levamisol (5-FU /Lev). Maspin Nuclear é um membro da superfamília inibidora da serina-protease (SERPIN) e exerce atividades de supressor tumoral, inibindo a formação de tumores, migração de células cancerosas, invasão, metástase e angiogênese em CCR. Contudo, seu papel parece contraditório. Outros estudos descrevem que Maspin Nuclear pode exercer funções diferentes dependendo do tipo de tumor e associando esse marcador à fatores prognósticos adversos^{31,32}.

Topoisomerase são enzimas encarregadas de exercer sua função durante vários processos de metabolismo do DNA, incluindo controle da transcrição, replicação, recombinação e segregação de cromossomos durante a divisão celular⁽³³⁾, sua expressão é dependente do ciclo celular com pico expressão na fase

G2/M do ciclo celular e declínio para o mínimo no final da mitose⁽³⁴⁾. De modo que, essa enzima pode ser considerada como marcador preditivo, porque sua amplificação no gene TOPO2a leva à superexpressão da proteína TOPO2a e, por fim, a uma melhor resposta aos quimioterápicos, enquanto que a deleções em *TOPO2a* resultam em redução da expressão da proteína TOPO2a e, assim, induz quimiorresistência primária aos medicamentos anticancerígenos inibidores TOPO2a⁽³⁵⁾. Por outro lado, o receptor EGFR, um receptor tirosina quinase, é responsável pela transdução de sinal que modula a proliferação, sobrevivência, adesão, migração e diferenciação celular⁽³⁶⁾.

Assim, durante a carcinogênese, os ligantes desse receptor atuam como potentes fatores pró-angiogénicos⁽³⁷⁾. A proteína TP170, é a maior subunidade putativa de IF3 e pode regular positivamente a ribonucleótido redutase M2, promovendo crescimento e proliferação celular. Elevados níveis de TP170 tem sido descrito em cânceres da mama, do colo do útero, do esôfago e do pulmão, sugerindo que essa proteína pode ter um importante papel na transformação maligna e no controle do crescimento celular⁽³⁸⁾. Han et al⁽¹¹⁾ demonstraram que a associação da expressão a superexpressão de TOPO2a, subexpressão de EGFR e de TP170 (TOPO2a+/EGFR-/TP170-) pode ser um potencial marcador preditivo de resposta quimioterápica a combinação entre 5FU, ácido folínico e oxaliplatina (FOLFOX). Eles avaliaram os desfechos clínicos de 902 pacientes com CCR de alto risco no estágio III com e sem o uso de FOLFOX e observaram aumento da sobrevida no grupo com uso de FOLFOX.

A variante DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3 tem tradicionalmente sido associado à estudos farmacogenéticos relacionados a 5-FU. O gene DPYD codifica a enzima desidrogenase diidropirimidina (DPD), que atua no catabolismo de 5-FU. DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3 codifica uma enzima com atividade limitada. Segundo o estudo de Lee et al⁽¹³⁾, DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3 tem valor preditivo para toxicidade grave à quimioterapia baseada em 5-FU em pacientes com CCR. Os autores descrevem ainda outras três variantes do gene DPYD, DPYD*2A (c.1905 + 1 G> A; rs3918290), D949V (c.2846 A>T;

rs67376798) e I560S (c.1679 T> G, DPYD*13, rs55886062) como funcionalmente deletérias, afetando a atividade de DPYD e correlacionando com a toxicidade grave de 5-FU⁽¹³⁾.

A expressão de VEGF-D (fator de crescimento endotelial vascular D) foi identificado como melhor marcador preditivo encontrado nessa revisão, onde pacientes que possuem elevados níveis da expressão da proteína VEGF-D tem 2.35 chances maior de responder a terapia-alvo com ramucirumab que pacientes que não possuem. As terapias-alvo são produtos da medicina de precisão que visam um tratamento individualizado. Alguns alvos, no entanto, podem estar presentes em menos de 5 a 10% da população de pacientes, o que determina que pacientes precisam ser triados para tornar-se elegível para o tratamento⁽⁹⁾.

Este marcador foi descrito por Tabernero et al⁽¹⁵⁾ que observaram que níveis mais elevados de expressão de VEGF-D é um marcador preditivo eficaz para elegibilidade de pacientes para uso do ramucirumab. O ramucirumab é um anticorpo monoclonal IgG1 humano que se liga especificamente ao domínio extracelular do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR-2) com alta afinidade, impedindo a ligação dos ligantes agonistas VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D e, consequentemente, a ativação do VEGFR-2. O uso de ramucirumab tem mostrado resultados melhores no tratamento em comparação com outras terapias com anticorpos monoclonais por impedir a ligação de qualquer um dos ligantes e não apenas do VEGF-A⁽³⁹⁾.

Outros fatores corroboram com a identificação da expressão de VEGF-D como melhor marcador preditivo. Níveis aumentados de expressão do mRNA ou da proteína de VEGF-D foram observados em CCR em alguns estudos, mostrando uma associação entre o aumento de VEGF-D e variáveis clínico-patológicas adversas, incluindo metástase de linfonodos e redução da sobrevida do paciente⁽⁴⁰⁾. Além disso, alguns estudos mostram que a expressão de mRNA de VEGF-D é significativamente menor nos tecidos de CCR quando comparados à mucosa normal, sem correlação com metástases linfáticas⁽⁴¹⁾.

Dez marcadores prognósticos identificados neste estudo foram: *TP53* mutante, *KRAS* mutante, expressão do miR-326, expressão das proteínas CatS, ERCC-1, SMAD 4 em tumores com MSI, da Proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1), mutação V600E em *BRAF* combinada com mutação em *KRAS* em tumores com pMMR e expressão do mRNA de *LGR5* e de *GUCY2C* (Tab. 1). Observou-se que a expressão do mRNA do gene *GUCY2C* foi o melhor marcador prognóstico para CCR (RR: 44,35; IC95% 28,75-68,42), o que significa que pacientes que super expressavam *GUCY2C* tem uma chance 44,35 vezes maior de sobrevida que os pacientes que não expressavam ou possuíam baixa expressão do mRNA de *GUCY2C*.

GUCY2C (Guanilil Ciclase C) é um receptor para os hormônios guanilina e uroguanilina, pertencente a uma família de proteínas sintetizando GMP cíclico (cGMP), cuja interação com o domínio extracelular ativa o domínio catalítico citoplasmático, induzindo o acúmulo de cGMP. *GUCY2C* regula a homeostase, coordenando a proliferação, o reparo do DNA, a programação metabólica e a transição epitelio-mesenquimal, sustentando a hipótese na qual seu silenciamento contribui para a tumorigênese⁽⁴²⁾. No estudo de Meija et al⁽¹⁹⁾ descrevem que a detecção prospectiva de metástases ocultas por meio da avaliação da expressão do mRNA de *GUCY2C*, por qRT-PCR, destacando este alvo como um importante marcador prognóstico independente de risco.

Dentre os marcadores prognóstico identificados neste estudo está o gene *TP53*. A proteína codificada por esse gene, através de sua ligação com o DNA, ativa a transcrição de outros genes que controlam as principais funções celulares envolvidas na manutenção da estabilidade genômica; como indução de apoptose, reparo de DNA e regulação do ciclo celular⁽⁴³⁾. Em virtude disso, tem se atribuído um grande potencial à *TP53* como biomarcador em vários tipos de tumores.

Mutações somáticas no gene *TP53* são as alterações genéticas mais comuns encontradas no cânceres humanos, ocorrendo em cerca de metade de todos os tumores, incluindo o CCR. No estudo de Kandolier et al⁽¹⁷⁾ avaliando se e como o estado de mutação da *TP53* está ligado à eficácia variável do tratamento com 5FU

em CCR estágio III descobriram que o estado TP53 (selvagem ou mutante) é capaz de prever o efeito adjuvante 5FU na sobrevida em pacientes N1 (com uma a três metástases em linfonodos regionais), identificando assim seu valor prognóstico.

O microRNA miR-326 foi que outro marcador prognóstico identificado, cujo alvo é o mRNA da proteína associada à resistência a múltiplas drogas (MRP-1)⁽⁴⁴⁾. MRP-1 é um transportador cassette de ligação de adenosina trifosfato (ABC) que diminui o acúmulo intracelular de drogas devido ao seu efluxo ativo. O aumento da expressão desse transportador está associado à resistência a múltiplas drogas. Interessantemente, níveis elevados de expressão miR-326 estão associados a baixa SG e SLD em pacientes com CCR metatástico tratados com 5-FU/oxaliplatina⁽¹⁸⁾. Este achado ressalta a complexidade do entendimento da interação entre o miRNA e seu alvo. Segundo Kjersem et al⁽¹⁸⁾, mecanismos subjacentes podem explicar os diferentes resultados clínicos em pacientes com CCR com níveis elevados de miR-326 apresentarem bom prognóstico.

Juntamente com *TP53*, os genes *KRAS* e *BRAF* também são os genes mais comumente mutados no CCR. Diferentes mutações nesses genes estão associadas a um prognóstico ruim, especialmente naqueles tumores com MSI⁽⁴⁵⁾. Mutações em *KRAS* no códon 13 do éxon 2 estão associadas com menores taxas de sobrevida, enquanto que mutações no códon 12 do éxon 2 estão associadas a risco de metástases⁽⁴⁾ e apresentam valor prognóstico negativo em pacientes com CCR metastático que recebem tratamento com FOLFOX/XELOX⁽²³⁾. Em *BRAF*, a mutação V600E é a mais comum em diferentes tipos de cânceres e embora constitua um fator prognóstico ruim em tumores metastático, é um alvo promissor para uso de terapia-alvo, através da combinação de inibidores *BRAF* V600E específicos com outros inibidores da via MAPK/PI3K⁽⁴⁶⁾. Por outro lado, a taxa de SLD em 5 anos para pacientes com CCR, pMMR e que apresentavam mutações *BRAF* (V600E) e *KRAS* foram significativamente menores que a SLD em pacientes com CCR, pMMR e com *BRAF* e *KRAS* selvagem⁽²²⁾.

A catepsina S (CatS) foi um oncogene identificado como marcador prognóstico em vários estudos e sua regulação positiva ligada à agressividade da

doença em vários tipos de tumor. CatS promove a invasão e a neo-angiogênese por meio da degradação da matriz extracelular e da liberação de fatores de crescimento derivados da matriz que impulsionam a troca angiogênica⁽¹⁶⁾. Em glioblastoma, CatS tem valor prognóstico negativo independente do risco^(47,48). Segundo Gormley et al⁽¹⁶⁾, pacientes com CCR, tratados apenas com cirurgia e que apresentam um aumento da expressão de CatS apresentam redução da SLD, demonstrando o valor prognóstico deste alvo também para CCR.

Finalmente, *SMAD4* e *ERCC1* foram dois importantes supressores tumorais identificados neste estudo como marcador prognóstico. *SMAD4* (membro 4 da família SMAD) é fosforilada e ativada por receptores transmembrana serina-treonina quinases em resposta ao fator de crescimento TGF-beta e forma complexos homoméricos e heteroméricos com outras proteínas SMAD ativadas, que então se acumulam no núcleo e regulam a transcrição de genes alvo. A perda ou deficiência de SMAD leva evasão da apoptose e a desregulação do ciclo celular⁽⁴⁾. Roth et al⁽²¹⁾ descreveram que pacientes com CCR do subgrupo T3N1, com MSI-H, mas que não apresentavam perda de expressão de *SMAD4* apresentavam bom prognóstico.

ERCC1 tem um papel crítico na via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER). A proteína codificada por esse gene forma um heterodímero com a endonuclease XPF (também conhecida como ERCC4) e catalisa a incisão 5' no processo de excisão da lesão de DNA provocada por carcinógenos ambientais e ocupacionais que formam adutos de DNA⁽⁴⁹⁾. Pacientes tratados com oxaliplatina, que exibiam baixos níveis de mRNA *ERCC1* mostraram significativas diferenças na SG e SLD quando comparados com pacientes que exibiam altos níveis de expressão desse gene. Além disso, a expressão de *ERCC1* pode auxiliar na estratificação de pacientes com CCR estágio III/IV que se beneficiam com a quimioterapia a base de oxaliplatina⁽⁵⁰⁾.

CONCLUSÃO

Apesar dos avanços no tratamento cirúrgico e quimioterápico do CCR, esses não incorporaram de modo significativo melhoria das taxas de SG e SLD dos pacientes. Com isso, a busca por marcadores moleculares que impactariam de forma positiva essas taxas ainda é uma demanda eminente nos estudos clínicos. Nosso estudo mostra como diferentes marcadores preditivos e prognósticos podem refinar informações clínicas dos pacientes com CCR, prevendo o benefício máximo no tratamento para uma coorte de pacientes. Contudo, embora hajam resultados encorajadores obtidos com a triagem usando marcadores moleculares, ainda hoje, apenas *KRAS* entrou recentemente na prática médica como um marcador preditivo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- (1) Testa, U.; Castelli, G.; Pelosi, E. 2018. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers*, 10 (8): 248.
- (2) World Health Organization. 2018. Cancer. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>.
- (3) BRASIL. 2018. Estimativas 2018: incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>>
- (4) Mármorel, I.; Sánchez-De-Diego, C.; Dieste, A.; Cerrada, E.; Yoldi, M. 2017. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 18 (1): 197.

- (5) Sebio, A.; Kahn, M.; Lenz, H-J. 2014. The potential of targeting Wnt/b-catenin in colon cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, 18 (6), 611-615.
- (6) Kuipers, E. J.; Grady, W. M.; Lieberman, D.; Seufferlein, T, Sung J. J.; Boelens, P. G.; Van De Velde C.J.; Watanabe T. 2015. Colorectal Cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 1:15065. DOI: 10.1038/nrdp.2015.65.
- (7) Abraha, A. M; Ketema, E. B. 2016. Apoptotic pathways as a therapeutic target for colorectal cancer treatment. *World J Gastrointest Oncol*. 8 (8): 583- 591.
- (8) Brenner, H.; Chen, C. 2018. The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *British Journal of Cancer*; 119, (7): 785-792. DOI: 10.1038/s41416-018-0264-x.
- (9) Kalia, M. 2015. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism clinical and experimental*, 64 (3 Suppl 1): 16- 21. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.10.027.
- (10) Alex A. K.; Siqueira S.; Coudry R.; Santos J.; Alves M.; Hoff P. M.; Riechelmann R. P. 2016. Response to chemotherapy and prognosis in metastatic colorectal cancer with DNA deficient mismatch repair. *Clinical Colorectal Cancer*, 16 (3): 228-239. DOI: 10.1016/j.clcc.2016.11.001.
- (11) Han, Y.; Lu, S.; Yu, F.; Liu, X.; Sun, H.; Wang, J.; Zhu, X.; Lu, H.; Yue, H.; Wang, J.; Lin, J.; Zhou, C.; Tang, H.; Peng, Z. 2016. A comparative analysis and guidance for individualized chemotherapy of stage II and III colorectal cancer patients based on pathological markers. *Scientific Reports*, 6: 37240. DOI: 10.1038 / srep37240
- (12) Hestetun K. E., Brydøy H., Myklebust M. P., Dahl S. 2015. Nuclear maspin expression as a predictive marker for fluorouracil treatment response in colon cancer. *Acta Oncologica*, 54 (4): 470–479.
- (13) Lee, A. M.; Alberts, S. R.; Sargent, D. J.; Sinicrope, F. A.; Berenberg, J. L.; Grothey, A. F.; Polite, B. N.; Chan, E. T.; Gill, S. F.; Kahlenberg, M. S.; Nair, S. G.; Shields, A. F.; Goldberg, R. M.; Diasio. R. B. 2016. Association between DPYD c.1129-5923 C>G/hapB3 and severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in stage III colon cancer patients: NCCTG N0147 (Alliance). *Pharmacogenet Genomics*, 26 (3): 133–137.
- (14) Myklebust, M. P.; LI, Z.; Tran, T. H.; Rui, H.; Knudsen, E. S.; Elsaleh H.; Fluge, O.; Vonen, B.; Myrvold, H. E.; Leh, S.; Tveit, K. M.; Pestell, R. G.; Dahl, O. 2012. Expression of cyclin D1a and D1b as predictive factors for treatment response in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 107 (10): 1684-1691.

- (15) Tabernero, J.; Yoshino, T.; Cohn, A. L.; Obermannova, R.; Bodoky, G.; Garcia-Carbonero, R.; Ciuleanu, T. E.; Portnoy, D. C.; Van Cutsem, E.; Grothey, A.; Prausová, J.; Garcia-Alfonso, P.; Yamazaki, K.; Clingan, P. R.; Lonardi, S.; Kim, T. W.; Simms, L.; Chang, S. C.; Nasrullah, F. 2015. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 16 (5):499-508. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70127-0.
- (16) Gormley, J. A.; Hegarty, S. M.; O'grady, A.; Stevenson, M. R.; Burden, R. E. Barrett, H. L.; Scott, C. J.; Johnston, J. A.; Wilson, R. H.; Kay, E. W.; Johnston, P. G.; Olwill, S. A. 2011. The role of Cathepsin S as a marker of prognosis and predictor of chemotherapy benefit in adjuvant CRC: a pilot study. *British Journal of Cancer*, 105 (10): 1487 – 1494.
- (17) Kandolier, D.; Mittlböck, M.; Kappel, S.; Puhalla, H.; Herbst, F.; LANGNER, C.; Wolf, B.; Tschmelitsch, J.; Schiperser, W.; Steger, G.; Hofbauer, F.; Samonigg, H.; Gnant, M.; Teleky, B.; Kührer, I. 2015. TP53 Mutational Status and Prediction of Benefit from Adjuvant 5- Fluorouracil in Stage III Colon Cancer Patients. *EBioMedicine*, 2 (8): 825–830. DOI: 10.1016 / j.ebiom.2015.06.003
- (18) Kjersem, J.B; Ikdahl, T.; Lingjaerde, O. C.; Guren, T.; Tveit, K. M.; Kure E. H. 2014. Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin based treatment. *Molecular Oncology*, 8 (1): 59-67. DOI: 10.1016/j.molonc.2013.09.001.
- (19) Mejia, A.; Schulz, S.; Hyslop, T.; Weinberg, D. S.; Waldman, S. A. 2009. GUCY2C reverse transcriptase PCR to stage pN0 colorectal cancer patients. *Expert Rev Mol Diagn*, 9, (8): 777–785. DOI: 10.1586 / er.09.67
- (20) Parekh, S.; Ziegenhain, C.; Vieth, B.; Enard, W.; Hellmann, I. 2016. The impact of amplification on differential expression analyses by RNA-seq. *Scientific Reports*, 6: 25533. DOI: 10.1038/srep25533.
- (21) Roth, A. D.; Delorenzi, H.; Tejpar, S.; Yan, P.; Klingbiel, D.; Fiocca, R.; D'ario, L.; Cisar, G.; Labianca, R.; Cunningham, D.; Nordlinger, B.; BOSMAN, F.; Van Cutsem, E. 2012. Integrated Analysis of Molecular and Clinical Prognostic Factors in Stage II/III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 104 (21): 1635–1646. DOI: 10.1093 / jnci / djs427
- (22) Sinicrope, F. A; Shi, Q.; Smyrk, T. C.; Thibodeau, S. N.; Dienstmann, R.; Guinney, J.; Bot, B. M.; Tejpar, S.; Delorenzi, M.; Goldberg, R. M.; Mahoney, M.; Sargent, D. J.; Alberts, S. R. 2015. Molecular Markers Identify Subtypes of Stage

III Colon Cancer Associated with Patient Outcomes. *Gastroenterology*, 148 (1): 88–99. DOI: 10.1053 / j.gastro.2014.09.041

- (23) Smith, G.; Limite, R.; Wolf, H.; Steele, R. J.; Carey, F. A.; Wolf, C. R. 2010. Activating K-Ras mutations outwith ‘hotspot’ codons in sporadic colorectal tumours – implications for personalised cancer medicine. *British Journal of Cancer*, 102 (4): 693–703. DOI: 10.1038 / sj.bjc.6605534
- (24) Stanisavljević, L.; Myklebust, M. P.; Leh, S.; Dahl, O. 2016. LGR5 and CD133 as prognostic and predictive markers for fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Acta oncologica*, 55 (12): 1425-1433.
- (25) Watanabe, H.; Miki, C.; Okugawa, Y.; Toiyama, Y.; Inoue, Y.; Kusunoki, M. 2008. Decreased Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Predicts Poor Prognosis Following Curative Resection of Colorectal Cancer. *Diseases Colon Rectum*, 51 (12): 1867-1870. DOI: 10.1007 / s10350-008-9380-7
- (26) Zeinalian, M.; Hashemzadeh-Chaleshtori, M.; Salehi, R.; Emami, M. H. 2018. Clinical Aspects of Microsatellite Instability Testing in Colorectal Cancer. *Adv Biomed Res*, 7:28. DOI: 10.4103 / abr.abr_185_16
- (27) Battaglin F.; Naseem, H.; Lenz, H. J.; Salem, M. E. 2018. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol*, 16 (11): 735-745.
- (28) 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. *J Clin Oncol*, 28, (20): 3219-26. DOI: 10.1200/JCO.2009.27
- (29) Diehl, J. A. 2002. Cycling to Cancer with Cyclin D1. *Cancer Biology Therapy*, 1 (3): 226-231.
- (30) Li, Z.; Jiao, X.; Wang, C.; Shirley, L.A.; Elsaleh, H.; Dahl, O.; Wang, M.; Soutoglou, E.; Knudsen, E. S.; Pestell, R. G. 2010. Alternative cyclin D1 splice forms differentially regulate the DNA damage response. *Cancer Res*, 7, (2): 8802–8811. DOI: 10.1158 / 0008-5472.
- (31) Berardi, R.; Morgese, F.; Onofri, A.; Mazzanti, P.; Pistelli, M.; Ballatore, Z.; Savini, A.; De Lisa, M.; Caramanti, M.; Rinaldi, S.; Pagliarella, S.; Santoni, M.; Pierantoni, C.; Cascinu, S. 2013. Role of maspin in cancer. *Clinical and Translational Medicine*, 2 (1): 8. DOI: 10.1186/2001-1326-2-8.

- (32) Bodenstine, T.M.; Seftor, R. E.; Khalkhali-ELLIS, Z.; Seftor, E. A.; Pemberton, P. A.; Hendrix, M. J. 2012. Maspin: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Metastasis*, 31 (3-4): 529 – 51. DOI: 10.1007 / s10555-012-9361-0
- (33) Bergant, K.; Janezic, M.; Perdih, A. 2018. Bioassays and In Silico Methods in the Identification of Human DNA Topoisomerase II α Inhibitors. *Curr Med Chem*, 25 (28): 3286-3318.
- (34) Järvinen, T.A.; Liu, E. T. 2003. HER-2/neu and Topoisomerase II α – Simultaneous Drug Targets in Cancer. *Combinatorial Chemistry High Throughput Screening*, 6 (5): 455-70. DOI: 10.2174 / 0929867325666180306165725
- (35) Järvinen, T. A. H.; Tanner, M.; Rantanen, V.; Bärlund, M.; Borg, A.; Grénman, S.; Isola, J. 2000. Amplification and Deletion of Topoisomerase II α Associate with ErbB-2 Amplification and Affect Sensitivity to Topoisomerase II Inhibitor Doxorubicin in Breast Cancer. *Am. J. Pathol.*, 156 (3): 839-847.
- (36) Yarden, Y. 2001. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer*, 37 (4): 3-8
- (37) De Luca, A.; Carotenuto, U. M.; Rachiglio, U. M.; Gallo, H.; Maiello, M.R.; Aldinucci, D.; Pinto, A.; Normanno, N. 2008. The Role of the EGFR Signaling in Tumor Microenvironment. *J. Cell. Physiol*, 214 (3): 559-67. DOI: 10.1002 / jcp.21260
- (38) Dong, Z.; Liu, L. H.; Han, B.; Pincheira, R.; Zhang, J. T. 2004. Role of eIF3 p170 in controlling synthesis of ribonucleotide reductase M2 and cell growth. *Oncogene*, 23 (21): 3790-801. DOI: 10.1038 / sj.onc.1207465
- (39) Spratlin, J. L.; Cohen, R. B.; Eadens, M. L.; Gore, L.; Camidge, D. R.; Diab, S.; Leong, S.; Obryant, C.; Chow, L. Q.; Serkova, N. J.; Meropol, N. J.; LEWIS, N. L.; Chórico, E. G.; Fox, F.; Youssoufian, H.; Rowinsky, E. K.; Eckhardt, S. G. 2010. Phase I pharmacologic and biologic study of ramucirumab (IMC-1121B), a fully human immunoglobulin G1 monoclonal antibody targeting the vascular endothelial growth factor receptor- 2. *J Clin Oncol*, 28 (5): 780-787. DOI: 10.1200 / JCO.2009
- (40) Funaki, H.; Nishimura, L.; Harada, S.; Ninomiya, I.; Terada, I.; Fushida, S.; Tani, T.; Fujimura, T.; Kayahara, H.; Shimizu, K.; Ohta, T.; Miwa, K. 2003. Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma. *Oncology*, 64 (4): 416-422.

- (41) Royston D.; Jackson D.G. 2009. Mechanisms of lymphatic metastasis in human colorectal adenocarcinoma. *J Pathol*, 217 (5): 608–619. DOI: 10.1002 / path.2517.
- (42) Li, P.; Lin J.E.; Chervoneva, I.; Schulz, S.; Waldman, S. A.; Pitari, G. M. 2007. Homeostatic control of the crypt-villus axis by the bacterial enterotoxin receptor guanylyl cyclase C restricts the proliferating compartment in intestine. *Am J Pathol*, 171 (6): 1847–1858.
- (43) Pilat, N.; Grünberger, T.; L, F.; Mittlböck, M.; Perisanidis, B.; Kappel, S.; Wolf, B.; Starlinger, P.; Kührer, I.; Mühlbacher, F.; Kandioler, D. 2015. Assessing the TP53 marker type in patients treated with or without neoadjuvant chemotherapy for resectable colorectal liver metastases: A p53 Research Group study. *EJSO*, 41 (5): 683-689. DOI: 10.1016/j.ejso.2015.02.003
- (44) Liang, Z.; Wu, H.; Xia, J.; Li, Y.; Zhang, Y.; Huang, K.; Wagar, N.; Yoon, Y.; Cho, H. T.; Scala, S.; Shim, H. 2010. Involvement of MiR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1. *Biochem. Pharmacol*, 79 (6): 817- 824. DOI: 10.1016 / j.bcp.2009.10.017.
- (45) Goldstein, J.; Tran, B.; Ensemble, J.; Gibbs, P.; Wong, H. L.; Wong, S. F.; Vilar, E.; Gravata, J.; Broaddus, R.; Kopetz, S.; Desai, J.; Overman, M. J. 2014. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol*, 25 (5): 1032– 1038. DOI: 10.1093/annonc/mdu100.
- (46) Morkel, M.; Riemer, P.; Blaker, H.; Sers, C. 2015. Similar but different: Distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget*, 6 (25): 20785-800.
- (47) Xu, J.; Li, D.; Ke, Z.; Liu, P.; Maubach, L.; Zhuo, L. 2009. Cathepsin S is aberrantly overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Mol Med Report*, 2 (5): 713–718. DOI: 10.3892/mmr_00000161
- (48) Flannery, T.; Mcquaid, S; Mcgoohan, C.; Mcconnell, R. S.; MCgregor, G.; Mirakhur, M.; Hamilton, P.; Diamante, J.; Cran, G.; Walker, B.; Scott, C.; Martin, L.; Ellison, D.; Patel, C.; Nicholson, C.; Mendelow, D.; McCormick, D.; Johnston, P. G. 2006. Cathepsin S expression: an independent prognostic factor in glioblastoma tumours- A pilot study. *Int J Cancer*, 119 (4): 854–860.
- (49) Urun, Y. 2017. ERCC1 as a prognostic factor for survival in patients with advanced urothelial cancer treated with platinum based chemotherapy: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 120: 120–126. DOI: 10.1016 / j.critrevonc.2017.10.012.

- (50) Kassem, A. B.; Salem, S. E.; Abdelrahim, M. E.; Disse, A. S.; Salahuddin, A.; Hussein, M. M.; Bahnassy, A. A. 2017. ERCC1 and ERCC2 as predictive biomarkers to oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal cancer patients from Egypt. *Exp Mol Pathol.* 102 (1): 78-85. DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.01.006.