

MARIANNA DANTAS VILLARES LUCAS

**AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B  
INFANTIL ATRAVÉS DE PAINEL GENÉTICO MOLECULAR: UM RELATO DE  
CASO**



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito  
para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
NOVEMBRO / 2022**

**Trabalho realizado no Laboratório de Radiações em Biologia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia A. S. Lage e coorientação da Dr<sup>a</sup> Thayana da Conceição Barbosa.**

## CIP - Catalogação na Publicação

L719a Lucas, Marianna Dantas Villares  
Avaliação prognóstica de leucemia linfoblástica aguda B infantil através de painel genético molecular: um relato de caso / Marianna Dantas Villares Lucas. -- Rio de Janeiro, 2022.  
71 f.

Orientadora: Claudia Alencar dos Santos Lage.  
Coorientadora: Thayana da Conceição Barbosa.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. LLA. 2. Reparo de DNA. 3. Neoplasia Sanguínea. 4. SNP. I. Lage, Claudia Alencar dos Santos, orient. II. Barbosa, Thayana da Conceição, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Marianna Dantas Villares Lucas**

DRE: 118090141

BANCA EXAMINADORA: Profa. Luciana Jesus da Costa (Presidente)  
 Dra. Vanessa Câmara Fernandes  
 Dra. Giuliana De Gregoriis  
 Profa. Tatiana Domitrovic (Suplente)

Título da Monografia: **“Análise prognóstica de leucemia linfoblástica aguda  
 B infantil através de painel genético molecular: um relato de caso”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/cjr-shgg-fjt>

Data e hora de início: **18 de novembro de 2022 às 10:30h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 18 de Novembro de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
____ 9,0 ____	Profa. Luciana Jesus da Costa
____ 9,0 ____	Dra. Vanessa Câmara Fernandes
____ 9,0 ____	Dra. Giuliana De Gregoriis

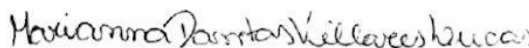
Presidente da banca:

\_\_\_\_\_  
 Profa. Luciana Jesus da Costa



Aluno:

\_\_\_\_\_  
 Marianna Dantas Villares Lucas



Orientador:

\_\_\_\_\_  
 Profa. Claudia de Alencar Santos Lage / Coorientador: Dra. Thayana da Conceição Barbosa



\_\_\_\_\_  
 Thayana da Conceição Barbosa

Coordenador  
 de TCC:

\_\_\_\_\_  
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho



**Dedico este trabalho à minha mãe Sandra, meu pai Luiz, minha avó Marlene, meu namorado Igor, minha sogra Josefa e minha irmã Ana Lucia, que estiveram ao meu lado em todos os momentos torcendo pela minha vitória. E, em memória, à minha bisavó Julia. Dedico este estudo também à família que aceitou contribuir para o avanço da pesquisa das leucemias infantis no Brasil, apesar de ter perdido um filho em idade tão precoce. Poderia ter sido um grande cientista, artista, etc... que o Brasil perdeu pela falta de apoio à pesquisa de ponta.**

## AGRADECIMENTOS

Sou grata porque a ciência resolve problemas e salva vidas. Foi difícil me graduar, num momento político histórico, em que o presidente do país luta contra a educação e a ciência e tenta, a todo custo, derrubar as universidades federais que são a maior fonte de conhecimento e produção dos melhores profissionais do Brasil. Foram várias tentativas, felizmente falhas até aqui, do governo Bolsonaro de fechar a melhor universidade federal do país. Fui pra rua manifestar porque a universidade é para todos e cá estou eu me formando.

Neste cenário dramático da história do Brasil, em meados da graduação se iniciou a pandemia do novo Coronavírus que parou o mundo. Foi então que confirmei meu amor pela ciência. Foi a ciência que salvou bilhões de vidas! Sou grata por ter saído viva da pandemia e ter as pessoas que amo ao meu lado, sou grata por me formar no ano que o governo Bolsonaro findou!

Para além desta breve declaração política, deixo minha gratidão à alguns seres essenciais na minha vida.

À Deus por não me abandonar, apesar de eu ter duvidado da presença Dele em diversos momentos de sufoco nesta trajetória.

À minha mãe Sandra que sempre me incentivou a estudar e ser independente, me levou ao curso preparatório em dias de 40°C, preparou minhas marmitas pra faculdade e pro trabalho diariamente, compreendeu quando fui rude por cansaço e estresse, me abraçou e que nunca me deixou faltar uma única caneta para estudar; ao meu pai Luiz que me apoiou no concurso do Colégio Pedro II, o qual formou não só minha base escolar, como meu caráter, além de ter me levado, semanalmente, até o laboratório, no INCA, semanalmente durante a pandemia, me poupando de pegar transporte público e me contaminar. Serei eternamente grata por meus pais sempre estarem ao meu lado e terem sido meus maiores incentivadores quando decidi ser aluna da maior e melhor universidade pública do Brasil.

À minha avó Marlene por ter sido presente na minha vida a cada batalha e conquista, nunca me deixando fora de suas preces.

À minha irmã de alma Ana Lucia, que não solta minha mão desde os 3 anos de idade, por ter estado presente cada dia da minha vida, por ter me levantado quando pensei que seria incapaz e por ter se colocado disponível 100% do tempo para me ajudar.

À minha sogra Josefa que também não me esquece em suas orações e sempre se interessou pela minha trajetória se fazendo presente e dando todo incentivo possível.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Claudia e coorientadoras Dr<sup>a</sup> Ana Sheila e Dr<sup>a</sup> Thayana que me guiaram com muita competência, carinho e paciência neste início da minha caminhada científica. À Fundação do Câncer, CAPES, PIBIC/UFRJ, CNPq, INCa que cederam espaço e/ou bolsas para o desenvolvimento do meu trabalho desde janeiro de 2019.

Por último, porém não menos importante, deixo minha gratidão ao meu amor, Igor, que me ajudou com matemática na escola e cresceu ao meu lado sempre acreditando na minha capacidade, até quando eu mesma duvidei e sempre incentivou meu sonho de ser pesquisadora, por ter me acolhido em todas as crises de ansiedade, por ter pego minha mão e me direcionado de volta ao meu foco toda vez que me dispersei. Deixo também, meus parabéns pela sua recente graduação em Matemática pela UFRRJ.

À minha família, meus mais sinceros agradecimentos e carinho!

*“Educação não transforma o mundo.  
Educação muda as pessoas. Pessoas  
transformam o mundo.”*

Paulo Freire



## RESUMO

MARIANNA DANTAS VILLARES LUCAS

### AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B INFANTIL ATRAVÉS DE PAINEL GENÉTICO MOLECULAR: UM RELATO DE CASO

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Claudia A. S. Lage

**Resumo da Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia**

**INTRODUÇÃO E OBJETIVO:** A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B pediátrica (LLA-B) é a neoplasia maligna mais comum da infância, representando 25% de todos os cânceres infantis. A presença de alterações cromossômicas, na alteração da sequência de genes implicados com a estabilidade genética e/ou no seu número de cópias (CNA) são características desse tipo de câncer, e muitas vezes correlacionadas com o prognóstico da doença. Estudos recentes mostraram que a grande maioria desses pacientes apresenta prognóstico favorável, com taxas de sobrevida global (SG) em 5 anos superiores a 90% seguindo os protocolos padrão de tratamento. Todavia, as respostas celulares aos danos causados pela quimioterapia, dependem de mecanismos de reparo do DNA que podem neutralizar esses danos, permitindo que a sobrevivência das células cancerígenas. Assim, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nas vias de reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e recombinação homóloga (HR) podem afetar o prognóstico do paciente para a doença, mas não são mapeados inicialmente no diagnóstico padrão dos pacientes. O objetivo deste estudo é o relato de um caso de B-ALL infantil de bom prognóstico inicial, mas anormalmente refratário ao tratamento quimioterapêutico.

**PACIENTE, MATERIAL E MÉTODOS:** Um menino de 12 anos foi inicialmente diagnosticado como um caso de LLA-B comum, sem anormalidades estabelecidas (LLA-B-outro), porém com evolução clínica desfavorável e óbito em menos de um ano após o diagnóstico. Para refinar a caracterização clínica deste caso, o paciente foi geneticamente analisado em termos de mutações que afetam as principais vias de reparo de danos no DNA, diferenciação linfóide, controle do ciclo celular e proliferação. O diagnóstico e o monitoramento da doença minimamente detectável foram realizados por imunofenotipagem, e inicialmente o classificaram como de bom prognóstico. Em paralelo, o DNA genômico foi então purificado e analisado para verificação de mutações nos genes de reparo de DNA APEX1, XPD, XRCC1, XRCC3 e RAD51 por sequenciamento direto, assim como para alterações no painel de genes IKAROS, envolvidos com a diferenciação linfóide.

**RESULTADOS E CONCLUSÃO:** Foram detectados SNPs em APEX1, XRCC1, XRCC3 e RAD51. Também foram detectadas deleções que afetam os genes IKZF1 (exons 2 a 7), CDKN2A (exons 2 e 4), CDKN2B (exons 1 e 2), IGHD e PAX5 (exons 2, 5, 6, 7, 8 e 10). Devido à coocorrência de deleções de IKZF1, CDKN2A/B e PAX5, na ausência de deleção de ERG, o paciente foi classificado como IKZF1-plus. Presumindo-se que disfunções de reparo de DNA podem resultar em aumento da mutagênese de fundo e aberrações cromossômicas, é possível que as múltiplas alterações no reparo do DNA da linhagem germinativa tenham contribuído para a

aquisição de deleções somáticas adicionais, levando a um resultado sombrio para o paciente. Mais estudos serão necessários para reforçar o uso do mapeamento genético dessas deficiências em mecanismos de reparo de DNA no diagnóstico das LLA-B infantis, pois podem estar na origem da ocorrência de outras alterações somáticas como as do painel IKZF1, apontando, assim, os casos de bom prognóstico inicial que podem cursar para piores desfechos.

**Palavras-chave:** LLA; Reparo de DNA; Neoplasia hematológica; SNP.

**ABSTRACT****MARIANNA DANTAS VILLARES LUCAS****PROGNOSTIC EVALUATION OF CHILDHOOD B-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA BY MOLECULAR GENETIC PANEL: A CASE REPORT****Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Claudia A. S. Lage****Abstract da Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia**

**INTRODUCTION AND OBJECTIVE:** Pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common malignancy of childhood, accounting for 25% of all infant cancers. The presence of either chromosomal alterations, in the sequence of marker genes related to genetic stability and/or in their copy number (CNA) are characteristics of this type of cancer, and often correlated with the prognosis of the disease. Recent studies have shown that most of these patients have a favorable prognosis, with 5-year overall survival rates above 90% upon following regular treatment protocols. However, cellular responses to damages caused by chemotherapy rely on DNA repair mechanisms that can counteract these damages, allowing cancer cells to thrive. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in base excision repair (BER), nucleotide excision repair (NER) and homologous recombination (HR) pathways can affect a patient's prognosis for disease, but they are not screened upon the initial genetic diagnosis of a patient. The aim of this study is to report a case of a childhood B-ALL patient with a good initial prognosis, but abnormally refractory to chemotherapy. **PATIENT, MATERIAL AND METHODS:** A 12-year-old boy was initially diagnosed with common B-ALL, without established abnormalities (ALL-B-other), but followed an unfavorable clinical course with death unexpectedly occurring in less than one year after diagnosis. To refine the clinical characterization of this case, the patient was genetically analyzed in terms of mutations that affect major pathways of DNA damage repair, lymphoid differentiation, cell cycle control, and proliferation. Diagnosis and monitoring of minimally detectable disease were performed by immunophenotyping and initially classified the patient as having a good prognosis. In parallel, the genomic DNA was purified and analyzed for mutations in the DNA repair genes APEX1, XPD, XRCC1, XRCC3 and RAD51 by direct sequencing, as well as for changes in the panel of IKAROS genes involved in lymphoid differentiation. **RESULTS AND CONCLUSION:** Extraordinarily SNPs were detected in APEX1, XRCC1, XRCC3 and RAD51. Deletions affecting the genes IKZF1 (exons 2 to 7), CDKN2A (exons 2 and 4), CDKN2B (exons 1 and 2), IGHD and PAX5 (exons 2, 5, 6, 7, 8 and 10) were also detected. Due to the co-occurrence of IKZF1, CDKN2A/B and PAX5 deletions, in the absence of ERG deletion, the patient was classified as IKZF1-plus. Assuming that DNA repair dysfunctions can result in increased background mutagenesis and chromosomal aberrations, it is possible that the bulky alterations in inherited somatic DNA repair dysfunctions contributed to the acquisition of additional somatic deletions, leading to a dismal result for the patient. More studies are needed to reinforce the use of genetic mapping of these deficiencies in DNA repair mechanisms in the diagnosis of childhood ALL-B, as they may be at the origin of the occurrence of other somatic alterations

such as those of the IKZF1 panel, thus pointing out the cases with an initial good prognosis that could lead to worse outcomes.

**Palavras-chave:** ALL; DNA Repair; Hematologic Neoplasm; SNP.

## **RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS**

As leucemias agudas infantis são as mais frequentes na população infantil no mundo. As causas genéticas são apontadas como sendo as principais na ocorrência desse tipo de câncer infantil, pois crianças não têm hábitos de risco como fumo, álcool, drogas e etc. Se bem diagnosticados, os pacientes podem se curar da doença, apresentando ausência da leucemia após 5 anos do tratamento adequado.

Nosso estudo avaliou a presença de marcadores genéticos importantes no impacto do diagnóstico e curso dessa doença em um paciente que tinha todas as chances de sobreviver à doença pelo diagnóstico padrão inicial, mas morreu depois de menos de um ano.

Assim, a análise genética detalhada pode apontar características sobre as respostas de um paciente que podem levar futuramente a um tratamento mais personalizado que pode salvar vidas das crianças afetadas pela leucemia.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Leucemias: origem, classificação e sintomatologia.....	1
1.2. As vias de Reparo de DNA.....	2
1.3. Impacto de alterações em vias de reparo de DNA na LLA-pB .....	5
2. APRESENTAÇÃO DO QUADRO CLÍNICO DO PACIENTE.....	7
3. OBJETIVO DO ESTUDO .....	8
4. JUSTIFICATIVA.....	8
5. METODOLOGIA .....	8
5.1. Ética em pesquisa: termo de consentimento .....	10
5.2. Diagnóstico imuno-molecular do paciente .....	11
5.3. Extração de DNA.....	8
5.4. Rastreamento de alterações por sequenciamento.....	9
6. RESULTADOS .....	10
7. DISCUSSÃO.....	21
8. CONCLUSÕES.....	22
9. REFERÊNCIAS.....	22

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Leucemias: origem, classificação e sintomatologia

Leucemia é um termo que se refere às neoplasias que acometem as células sanguíneas nucleadas. A etiologia das transformações leucêmicas tem por base alterações que atingem precursores nucleados que podem ser causadas por múltiplos fatores, como, por exemplo: altas doses de radiações ionizantes, fatores genéticos, imunológicos e virais, exposição a agentes físicos e/ou químicos, tratamento quimioterápico anterior, alimentação, fumo e uso de drogas ilícitas.

Uma vez alteradas, estas células ficam instáveis e são capazes de se multiplicar mais que as células normais na medula óssea, tecido responsável pela produção de células hematológicas localizadas no interior dos ossos e, dessa forma, as células neoplásicas se tornam, gradativamente, mais numerosas, em relação às células normais e, assim, não exercem mais suas funções de metabolismo, inibição por contato e divisão celular adequadamente, podendo, assim, originar uma leucemia (INCA, 2021).

Existem diversos tipos de leucemias, as quais são classificadas quanto à velocidade da evolução da neoplasia (crônica ou aguda, sendo que a crônica se agrava de forma lenta e, a aguda avança rapidamente), e a linhagem de células afetada: linfóide ou mieloide. Portanto, existem quatro subtipos básicos de leucemias: as leucemias mieloides crônicas (LMC), as leucemias mieloides agudas (LMA), as leucemias linfóides crônicas (LLC) e as leucemias linfóides agudas (LLA).

Ademais, destaca-se que a linhagem mieloide pode originar os mieloblastos, que posteriormente se diferenciam em granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos), plaquetas e células vermelhas, e a linhagem linfóide pode originar os linfoblastos que se diferenciam em linfócitos B e T e células *natural killer* (NK). Essa diferenciação também é quesito classificatório para os diferentes tipos de leucemias.

A sintomatologia das leucemias é diretamente ligada à insuficiência da medula óssea em produzir células ativas, envolvendo síndrome anêmica (fraqueza, palidez cutânea e taquicardia), trombocitopenia (sangramento gengival, petéquias, hematomas e outras manifestações hemorrágicas), leucopenia, neutropenia, além de perda de apetite, dificuldade de respiração, dores ósseas e artralgia (VIZCAÍNO *et al.*, 2016). Anemia, trombocitopenia e febre são presentes em  $\frac{2}{3}$  dos pacientes e o diagnóstico pode ser concluído com a presença simultânea de hepatoesplenomegalia, adenopatias ou leucocitose (GUERRA *et al.*, 2015).

O foco deste estudo é a caracterização de um paciente portador de leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-pB). O diagnóstico de LLA-pB é confirmado por testes padronizados em laboratório clínico, e, de acordo com as características morfológicas das células avaliadas microscopicamente, a leucemia tem seu risco de malignidade classificada segundo os critérios segundo o protocolo *French, American-British* (FAB), como L1 – baixo risco, L2 – risco intermediário, e L3 – alto risco, bem como pela análise de hemograma completo e do mielograma. A análise padrão consiste, assim, na contagem sanguínea completa (CBC, do inglês *Complete Blood Count*), com posterior análise citogenética, quando possível, em busca de possíveis alterações cromossômicas como quebras, rearranjos, deleções ou pela presença de translocações t(9, 22), que consiste na união entre uma parte do promotor presente no cromossomo 9 com um gene tirorina-quinase no cromossomo 22 (fusão *BCR-ABL1*), leva à ativação constitutiva de proliferação celular na LLA-pB. Além disso, a imunofenotipagem por citometria de fluxo, que se baseia em antígenos e marcadores de superfície, pode determinar a linhagem celular afetada, sendo o padrão ouro de diagnóstico (MOREIRA *et al.*, 2018).

As estratégias terapêuticas para a LLA-pB dependem da classificação de risco, idade no momento do diagnóstico, presença ou ausências de alterações cromossômicas, velocidade que reduz a CBC e o quão baixa é a CBC no momento da análise. As opções de tratamento são, portanto, quimioterapia, radioterapia, quimioterapia com transplante de medula óssea e imunoterapia (PQD, 2021).

No âmbito epidemiológico, um estudo feito na período de 2017 a 2020, analisou o perfil epidemiológico das leucemia no município do Rio de Janeiro e, contando com 8.667 pacientes frente aos 4 subtipos de leucemia, constatou que 57,52% é do sexo masculino, a maior porcentagem (14,58%) de internações é entre 5 e 9 anos de idade, além de mostrar que a faixa etária de menor mortalidade é de crianças e adolescentes (SADGRUSCHI *et al.*, 2021).

## **1.2. As vias de Reparo de DNA**

Agentes endógenos e exógenos podem provocar alterações no DNA genômico, tais como: lesões de fita simples, lesões de fita dupla, oxidação ou alquilação de bases, ligação entre bases de mesma fita, ligação proteína-DNA, erro de pareamento de nucleotídeos, entre outros. Por esta razão, a manutenção da integridade genômica se faz essencial para a proteção do organismo e manutenção de sua sobrevivência. Esses mecanismos são essenciais para a manutenção da integridade da informação genética. As vias de reparo de DNA por excisão de bases (do inglês *Base Excision Repair*, BER), reparo por excisão de nucleotídeos (do inglês *Nucleotide Excision Repair*, NER) e reparo por recombinação homóloga (do inglês



*Homologous Recombination Repair*, HRR), as quais são responsáveis, respectivamente, pela correção de danos monoméricos em uma base, ligações das bases entre si ou com compostos xenobióticos, lesões produzidas pelo efeito de radiação UV, e quebras da molécula de de DNA.

Para corrigir tal quantidade de danos espontâneos, mecanismos moleculares se especializaram ao longo da evolução biológica para garantir sua eliminação e, protegerem o organismo, impedindo mutações prejudiciais. Contudo, os mecanismos de reparo de DNA não são completamente eficientes.

A via *BER* é a mais atuante frente a lesões espontâneas, como desaminação, oxidação e alquilação, as quais são reconhecidas por glicosilases de DNA que, por sua vez, as eliminam da sequência a partir da hidrólise da ligação N-glicosídica entre a base danificada e o resíduo fosfodiéster, gerando um espaço para inserção da base mais adequada, sendo esta correção possível para uma ou mais bases pareadas erroneamente (SLIWINSKI *et al.*, 2005). O pareamento ideal entre as bases nitrogenadas (adenina-timina e citosina-guanina) é essencial para que os processos de transcrição e tradução ocorram de forma que gerem proteínas funcionais.

Neste trabalho, foram estudados os papéis das funções *APE1* e *XRCC1* atuantes da via de BER. A *APE1* é uma enzima com função de reconhecimento de pareamento incorreto e consequente extração do erro, que é sinal para recrutamento de um complexo proteico que prepara a molécula de DNA para receber a base nitrogenada correta (WHITAKER *et al.*, 2018). Já a *XRCC1*, segundo o estudo de Tang e colaboradores (2021), é uma proteína cujo papel não é completamente compreendido, porém sabe-se que sua atuação se dá no complexo proteico responsável pela troca da base inadequada pela correta, além de aumentar a processividade da molécula após correção por BER (Figura 1).

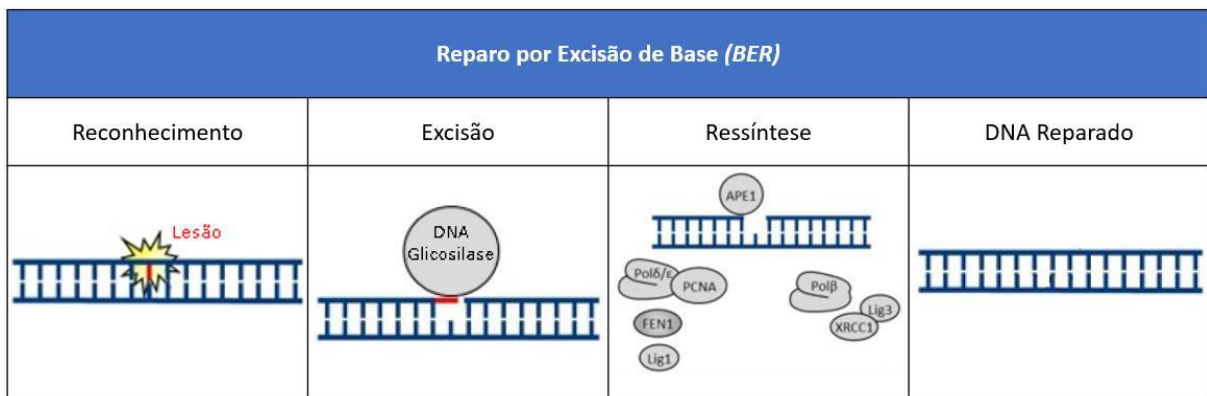


Figura 1. Esquema ilustrando as fases da via de reparo por excisão de bases (BER). DNA glicosilase reconhece a lesão, recruta *APE1* que por conseguinte, recruta um grupo de proteínas para remoção da base incorreta e inserção da base adequada.

A via *NER* (*Nucleotide Excision Repair*) é a principal responsável pela reparação das lesões ocasionadas por radiação UV, mutagênicos ambientais e agentes exógenos cancerígenos, sendo no geral, mutações que causam distorção da molécula de DNA, como ligações entre 2 guaninas ou timina com citosina, por exemplo (SONOHARA, *et al.*, 2022). Defeitos congênitos em *NER* já são associados ao envelhecimento precoce e predisposição a neoplasias (EDIFIZI, *et al.*, 2015).

Os genes envolvidos na via de *NER* que foram estudados nessa pesquisa foram *XPA*, *XRCC1* (presente também na via de *BER*) e *ERCC1*. Segundo o trabalho de Pulzová e sua equipe (2020), o gene *XPA* é um regulador chave na via, com ação de verificação do reparo e recrutamento de outras proteínas. *XPA* reconhece distorções, mas não as lesões em si, dessa maneira, sinaliza a falha ligando-se à fita dupla ou simples de DNA. O *XPB*, por sua vez, é o responsável pela incisão no local da lesão, sendo uma helicase que abre a estrutura de dupla fita de DNA para possibilitar a reparação (XIAO *et al.*, 2017). Já o *XRCC1*, associado à uma ligase, sela o fechamento da fita corrigida (IYAMA *et al.*, 2013) (Figura 2).

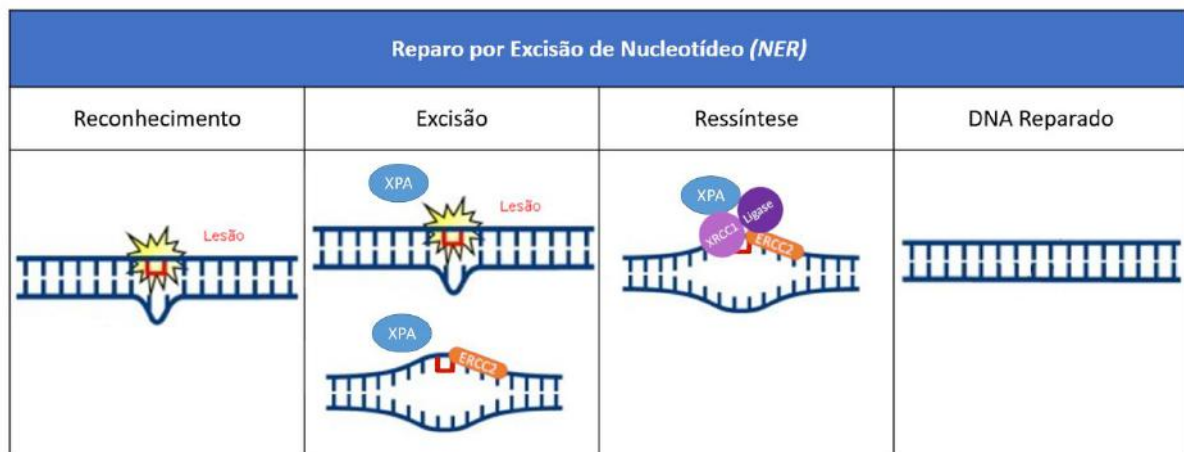


Figura 2. Esquema da via de reparo por excisão de nucleotídeos (*NER*). Há reconhecimento da distorção por *XPA* que indica presença de lesão para recrutamento da helicase *ERCC2* (*XPB*), o que possibilita ação de *XRCC1* associado a uma ligase que realiza a correção e fechamento da

A via de *HRR* (*Homologous Recombination Repair*) é a principal reparadora de lesões por quebras de fita dupla e ligações cruzadas nas fitas de DNA, geralmente ocasionadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) ou alterações de bases, utilizando a homologia entre as cromátides irmãs para ajustar a falha, ressintetizado a área acometida (HODGSON, *et al.*, 2018).

Os genes *RAD51* e *XRCC2* são membros chaves da via de *HRR* aqui analisados. Sendo a *RAD51*, a principal proteína da via, atuando na troca de segmentos de fita de DNA incorretos pelos segmentos homólogos à região, com potencial reparador de alta fidelidade. A *XRCC2*, é uma proteína semelhante à *RAD51*, e tem função de recrutar *RAD51* para execução do ajuste

necessário, existindo estudos que apresentam atraso da atividade de *RAD51*, na ausência de *XRCC2* (TAMBINI, *et al.*, 2010) (Figura 3).

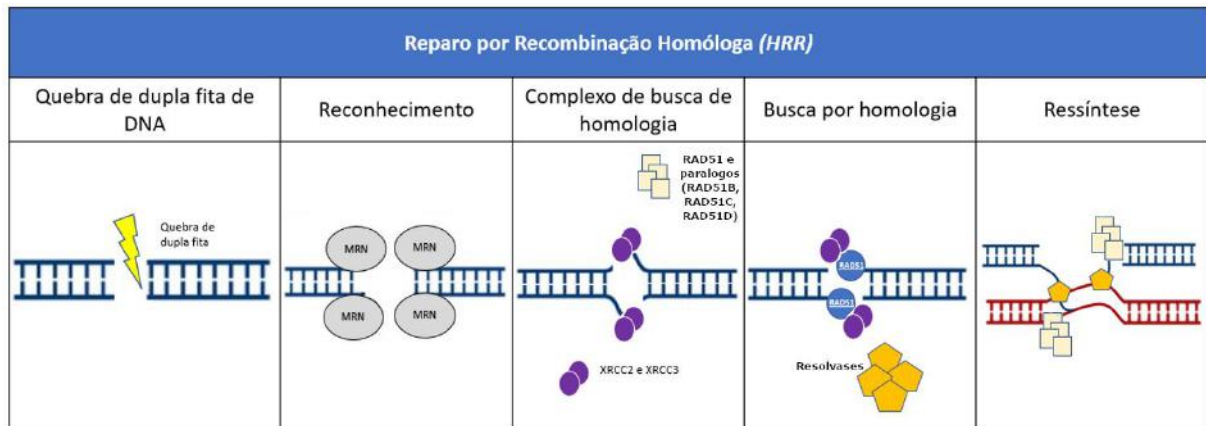


Figura 3. Esquema da via de reparo por recombinação homóloga (HRR). A *XRCC2* indica a falha para *RAD51* que é responsável, juntamente com a família de *RAD51*, pelo reparo buscando pela homologia na cromátide irmã. Imagem autoral.

### 1.3. Impacto de alterações em vias de reparo de DNA na LLA-pB

Como apresentado no subcapítulo anterior, as vias de reparo de DNA têm importância fundamental para manutenção da funcionalidade do organismo, corrigindo suas possíveis lesões originadas por razões endógenas e/ou exógenas. No entanto, defeitos dessas vias de reparo de DNA podem ocorrer e resultar em impactos negativos.

Mutações em genes envolvidos nos sistemas de reparo de DNA, podem gerar ganho ou perda de função. As vias de *BER* e *NER* são as principais reparadoras de lesões não volumosas e volumosas, respectivamente. Defeitos na via de *NER*, sabidamente, podem causar algumas síndromes, como a Xeroderma Pigmentosum (XP) que é a doença mais estudada ligada à *NER*, a qual reduz as correções frente às fotolesões causadas pela radiação UV e aumenta, por exemplo, a frequência de tumores de pele (LEE, *et al.*, 2019).

Estudos demonstram que muitos tipos de cânceres são desencadeados a partir de falhas dos diferentes sistemas de reparo de DNA. Exemplificando, o câncer de mama pode se desenvolver a partir de mutações nos genes *BRCA1/2*, os quais atuam nas vias de *HRR* e *NER*.

Contudo, existe outro ponto de vista, a partir do qual pode-se destacar o ganho de função, visto que o reparo de DNA protege as células frente a lesões de diversas origens possíveis, podendo incluir os danos causados por agentes quimioterápicos, por exemplo. Assim, os danos causados pela terapêutica, que teriam o objetivo de induzir a morte da célula cancerosa, são eliminados e a célula se mantém viva e se proliferando, portanto, estes defeitos estão fortemente associados com resistência tumoral.

No contexto da LLA-pB, existem estudos de painéis de biomarcadores moleculares correlacionados ao desenvolvimento da neoplasia e resistência às estratégias terapêuticas, destacando que estudos sobre marcadores moleculares auxiliam a compreensão da trajetória da neoplasia, além de fornecer suporte de aspectos genéticos moleculares que implicam no diagnóstico, prognóstico e tratamento.

## 2. APRESENTAÇÃO DO QUADRO CLÍNICO DO PACIENTE

Paciente infantil de 12 anos de idade do sexo masculino, sem anormalidades genéticas conhecidas que sugerissem predisposição ao surgimento da LLA-pB. O paciente foi diagnosticado em junho de 2019, sob a hipótese de síndrome mielodisplásica, hipoplasia eritróide ou hemoglobinúria paroxística noturna. A avaliação clínica evidenciou leucemia linfoblástica aguda. A imunofenotipagem por citometria de fluxo evidenciou 40% de células linfoblásticas típicas. As células blásticas patológicas nunca foram detectadas em líquido cefalorraquidiano.

Iniciou tratamento seguindo protocolo denominado BFM AEIOP de 2013 e apresentou as seguintes avaliações: No 8º dia de tratamento (D8) foi bom respondedor com <1000 de leucometria, D15 com 18% de células blásticas, D33 4% de células blásticas e no momento TP2 do tratamento, 21% de células blásticas, sendo classificado como alto risco. Obteve remissão completa antes da fase 3 do protocolo para alto risco.

No estágio seguinte, foi identificada progressão da doença, com doença residual mínima (DRM) de 3,2% e rápida evolução para 55% de blastos. Iniciou-se um protocolo de recidiva (Flag-Ida), porém, houve recuperação de 84% dos blastos. Outra estratégia terapêutica foi a administração de anti-CD19 (Blinatumomab) por 28 dias. Quaisquer sintomas de liberação de interleucina e recuperação de blastos foram observados. A partir de então, nenhum outro momento sem evidência de doença foi obtido e impossibilitando o transplante haploidêntico paterno agendado previamente. Foi iniciado um protocolo paliativo R11 com equipe multidisciplinar. O paciente evoluiu com hepatoesplenomegalia dolorosa, cloroma na pálpebra esquerda. . Desta forma, foi ministrado Dexametasona, transfusões de sangue (3 por semana) e morfina. Em Maio/2020 o paciente faleceu em sua casa, na presença de parentes próximos e sem sofrimento.

### **3. OBJETIVO DO ESTUDO**

Identificar o impacto de mutações em genes relacionados às principais vias de reparo de DNA (BER, NER e HRR), no desenvolvimento da doença e na ausência de resposta às abordagens terapêuticas em um paciente portador de LLA-pB.

### **4. JUSTIFICATIVA**

A leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras é o foco deste estudo, sabendo-se que este é o câncer mais comum entre jovens e crianças, correspondendo a cerca de 25% de todos os cânceres da infância (YU, et al., 2020). Destacando ainda que 85% das leucemias na infância são de linhagem B (Bhojwani D, et al., 2015).

Contudo, apesar da taxa de sobrevivência global (SG), frente a diversos tratamentos para a neoplasia, seja de 90% (PUI, et al., 2018) o caso em questão seguiu na contramão, tendo uma evolução conturbada e negativa da doença, sem apresentar resposta aos tratamentos empregados e chegou a óbito menos de um ano após o diagnóstico.

O estudo é direcionado no sentido de analisar a agressividade divergente da normalidade da LLA-pB neste paciente pediátrico e sob a ótica do reparo de DNA, um dos processos chave da sobrevivência celular.

### **5. METODOLOGIA**

#### **5.1. Extração de DNA**

O DNA do paciente selecionado para o estudo foi extraído a partir de amostra de medula óssea com o uso do kit de extração de DNA genômico humano da Invitrogen PureLink® (Thermo Fisher Scientific), o qual permite a extração de alto rendimento e pureza (Figura 7). O kit possui colunas para retenção do material genético e filtragem dos resíduos celulares para separação, tampão de lise para liberar o material genético das células, além de otimizar a atividade da proteinase K que atua desnaturando as proteínas que são diretamente associadas à molécula de DNA, um tampão que permite adsorção da molécula à coluna, tampões de lavagem e de eluição. Por fim, quantificação de material genômico realizada por NanoDrop (Thermo Fisher).

Primeiro, a amostra foi preparada com 200 µl de buffer de captura e submetida à centrifugação por 30 segundos para adsorver o DNA à membrana de sílica da coluna. Em seguida, foi adicionado 100 µl de buffer de lavagem para remoção de contaminantes

provenientes de restos de membranas celulares, organelas e sais, submetido a 1 minuto de centrifugação. Por fim, foi acrescentado 25 µl de tampão de eluição para retirar o DNA da membrana de sílica e garantir integridade molecular para armazenamento.

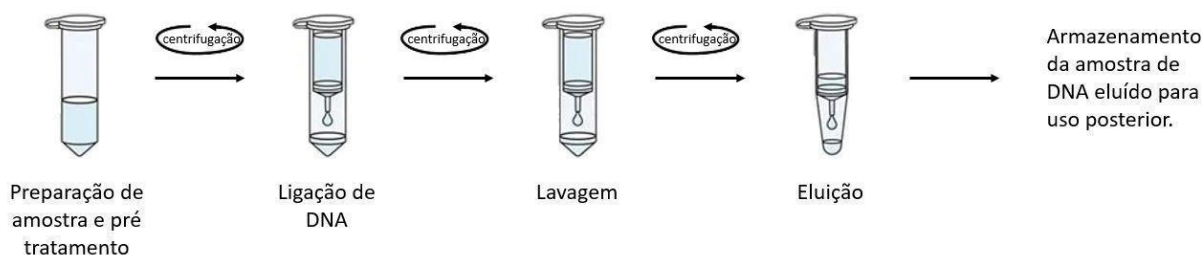


Figura 4. Esquema de purificação de DNA com o Kit PureLink® ThermoFisher Scientific

## 5.2. Rastreamento de alterações por sequenciamento

O rastreamento de mutações nos genes *APEX1*, *XPD*, *RAD51*, *XPA*, *XRCC1* e *XRCC3* foi realizado por PCR seguido de sequenciamento, utilizando iniciadores desenhados in-house e distribuídos ao longo dos genes de interesse. Nos anexos II a VII e na figura 8A foram descritas as condições de ciclagem aplicadas a cada grupo de iniciadores. Utilizamos uma condição de ciclagem convencional para alguns iniciadores (Condição 1) e a estratégia de PCR Touchdown para aumentar a sensibilidade e especificidade de alguns iniciadores, utilizamos a estratégia de PCR *touchdown* (Condição 2). Na estratégia Touchdown a etapa de anelamento é realizada em duas etapas distintas: a primeira consiste em 20 ciclos com redução de 0,5°C da temperatura de anelamento a cada ciclo e em uma segunda etapa que consiste em uma ciclagem convencional (KORBIE; MATTICK, 2008). As reações foram realizadas utilizando 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTP, 0,2mM dos primers, Tampão 1x e 1U de Taq Platinum.

O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ e posteriormente purificado, utilizando o Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band purification kit (GE Healthcare) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Figura 5B). Após a purificação, os produtos foram quantificados utilizando o Nanodrop. Com base no tamanho dos amplicons visualizados, foi calculado o volume de produto de PCR necessário para realizar a reação de sequenciamento utilizando 20ng da amostra.

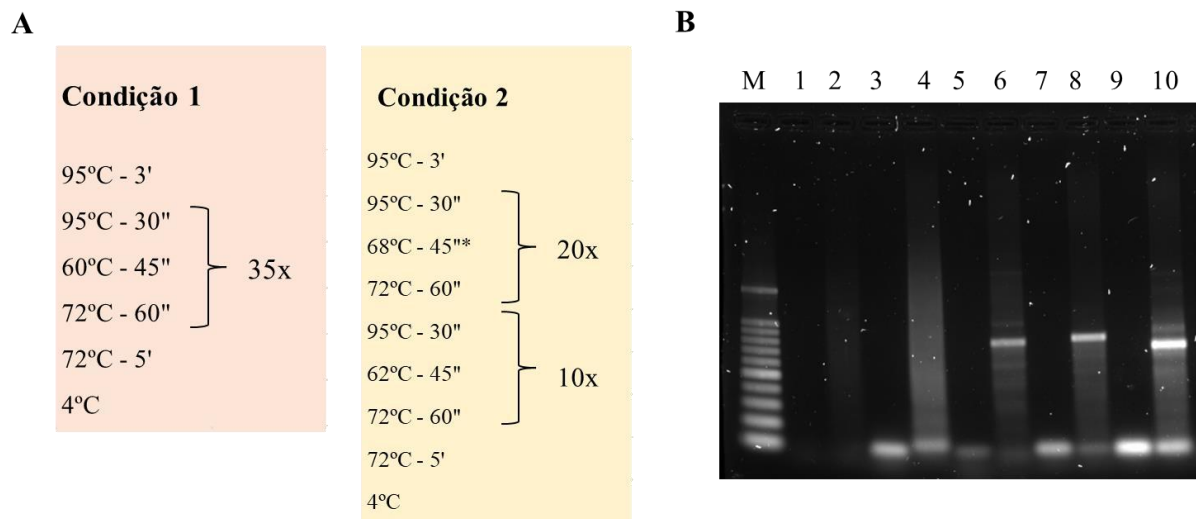


Figura 5. A. Ciclagens utilizadas para amplificação de genes por PCR. B. Visualização da amplificação de regiões do gene *RAD51* exemplificando o processo de avaliação das regiões estudadas. Poços 1, 3, 5, 7 e 9: Controle negativo da reação; Poços 2, 4, 6, 8 e 10: Amplificação das reações 40, 41, 42 e 43 de *RAD51* respectivamente. M, Marcador molecular de 100pb.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando 20 ng do produto de PCR purificado juntamente com 0,5 $\mu$ M de cada iniciador, 1 $\mu$ L de Ready Reaction kit (Applied Biosystems) e 1,5 $\mu$ L de Bigdye sequencing buffer 5x (Applied Biosystems). Além das amostras a serem avaliadas, foi adicionado um DNA sintético fornecido pelo fabricante (PGEM), a fim de avaliar a qualidade do sequenciamento realizado. A reação de sequenciamento bem como a eletroforese capilar foram realizadas na plataforma de sequenciamento de DNA do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) de acordo com protocolo padrão. As seqüências obtidas foram analisadas através do programa *Bioedit e Mutation Surveyor* utilizando como referências para alinhamento as seqüências: ENSG00000100823.7 de *APEX1*, ENSG00000104884.10 do gene *XPD*, ENSG00000051180.12 de *RAD51*, ENSG00000136936.6 de *XPA*, ENSG00000073050.7 de *XRCC1* e ENSG00000126215.9 de *XRCC3*. Todas as seqüências utilizadas como referência são da versão Grch37/hg19 do genoma humano.

## 6. RESULTADOS

Alguns resultados foram obtidos previamente, como o diagnóstico imuno-molecular e determinação de perfil IKZF1-plus.

### 6.1. Ética em pesquisa: termo de consentimento

Pesquisas que envolvem seres humanos precisam ser realizadas de forma ética, respeitando os direitos humanos. Para tanto, foi disponibilizado um termo de consentimento (ANEXO I) a ser lido e assinado pelos responsáveis legais do paciente infantil, garantindo a



concordância dos mesmos em participar da pesquisa, autorizando o uso das amostras biológicas humanas extraídas do paciente para fins de pesquisa clínica.

O termo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), pela Plataforma Brasil, em 16/10/2016, sob número 106582/2016 e aprovado pelo CAAE 60967316.7.00005259, pelo CEP INCA em 02/03/2019 e CEP IPPMG 05/07/2019. O Hospital da Lagoa como não possui um CEP, segue com Hospital Universitário Pedro Ernesto, houve dispensa da obrigatoriedade do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), visto que foram utilizados dados secundários e nos resultados não são apresentados campos que permitam identificação do paciente.

## 6.2. Diagnóstico imuno-molecular do paciente

O diagnóstico e acompanhamento da doença foram realizados por imunofenotipagem pelo Laboratório de Patologia Clínica da UERJ. A avaliação imunofenotípica de células da medula óssea do paciente no momento do diagnóstico revelou um fenótipo compatível com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B precursoras (LLA-pB) com base na positividade dos seguintes marcadores: CD34, HLA-DR, CD10, CD66c, CD19, CD79a citoplasmático, TdT nuclear, CD22 e CD20 (Figura 4).

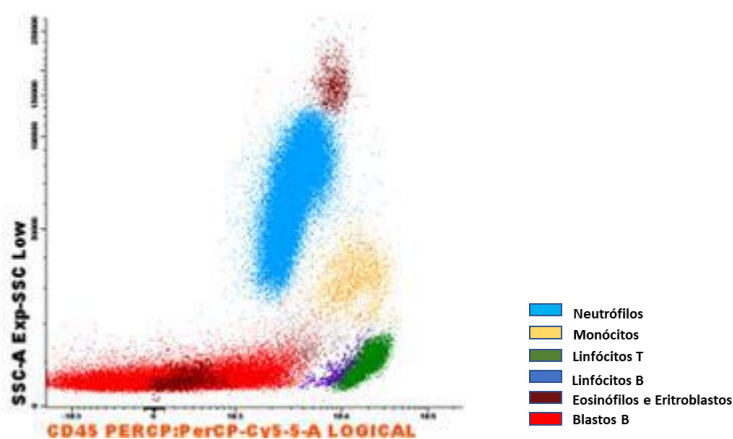


Figura 6. Representação gráfica de todas as subpopulações celulares na amostra de sangue periférico do paciente no momento do diagnóstico. A população em vermelho representa as células patológicas, responsáveis por 40% da celularidade total.

Ao longo de todo o tratamento o paciente teve a progressão da doença monitorada pelo exame de DRM (doença residual mensurável) por citometria. O paciente passou por 3 frentes de tratamento, porém não foi alcançada a remissão da doença em níveis que permitissem o transplante haploidêntico previsto como última alternativa (Figura 5). O paciente foi então encaminhado para cuidados paliativos e veio a óbito 11 meses após o diagnóstico.

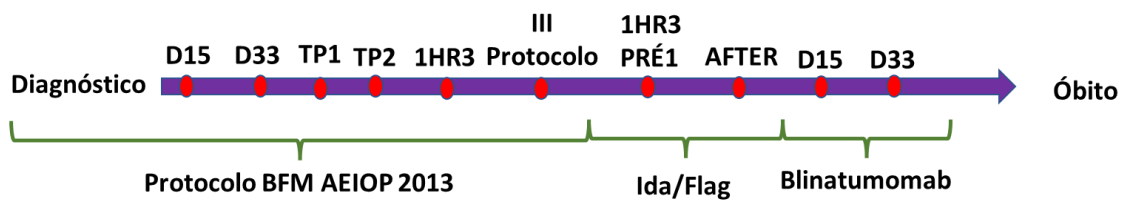


Figura 7. Representação temporal dos diferentes protocolos terapêuticos recebidos pelo paciente e seus respectivos pontos de monitoramento de resposta.

O rastreamento de mutações ao longo dos genes *APEX1*, *XPB*, *RAD51*, *XPA*, *XRCC1*, *XRCC3*, foi realizado com sucesso nas regiões destacadas na figura 9. A análise das sequências obtidas permitiu a identificação de SNPs e indels adicionais que encontram-se detalhadas nas tabelas 1 a 5. Uma análise crítica das regiões avaliadas que não foram amplificadas, porém não foram eficazmente sequências indicou que a maioria destas regiões eram regiões repetitivas e ricas em CG, fato este que dificulta o processo de sequenciamento.

Quanto aos exames de citogenética convencional como a avaliação molecular das fusões gênicas recorrentes em LLA-pB (*ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, *BCR::ABL1* e *KMT2A::AFF1*) indicaram que o paciente apresentava um perfil característico do subgrupo “B-other” por não apresentar nenhuma alteração primária. Adicionalmente, foi realizada a caracterização de alterações adicionais através da técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) na Divisão de Pesquisa Clínica do INCA. Através dos kits P335-C1 e P202-C1, foram identificadas deleções nos genes *IKZF1* (exons 2 a 7), *CDKN2A* (exons 2 e 4), *CDKN2B* (exons 1 e 2), *IGHD* e *PAX5* (exons 2, 5, 6, 7, 8 e 10). Devido à concomitância de deleções em *IKZF1*, *CDKN2A/B* e *PAX5*, e a ausência de deleção no gene *ERG*, este paciente foi classificado como *IKZF1*-plus (Figura 6).

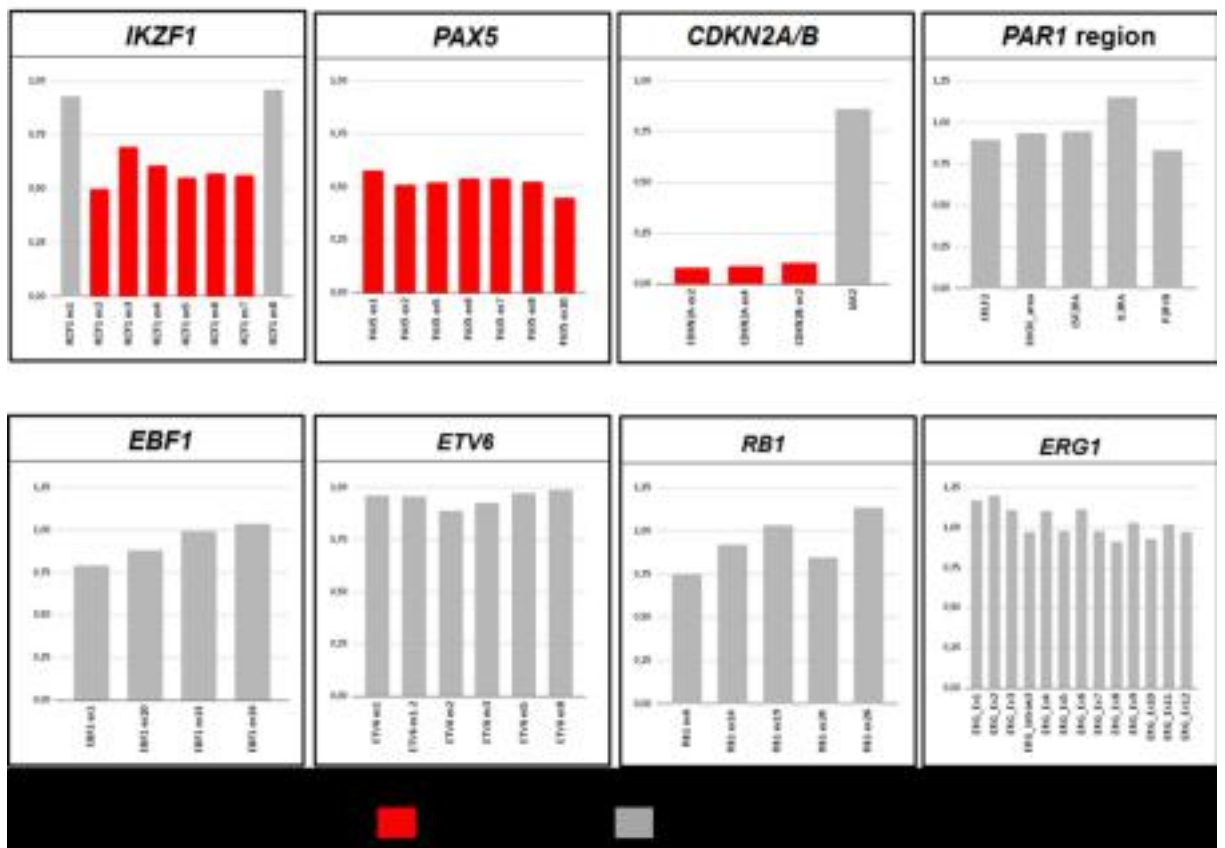


Figura 8. Gráficos ilustrando as alterações adicionais avaliadas por MLPA. As barras de cada gráfico indicam os valores de peak ratio obtidos para cada região do gene avaliado. Valores de peak ratio abaixo de 0,75 são indicativos de deleções e valores

O rastreamento de mutações ao longo dos genes APEX1, XPD, RAD51, XPA, XRCC1, XRCC3, foi realizado com sucesso nas regiões destacadas na figura 9. A análise das sequências obtidas permitiu a identificação de SNPs e indels adicionais que encontram-se detalhadas nas tabelas 1 a 5. Uma análise crítica das regiões avaliadas que não foram amplificadas, porém não foram eficazmente sequências indicou que a maioria destas regiões eram regiões repetitivas e ricas em GC, o que dificulta o processo de sequenciamento.

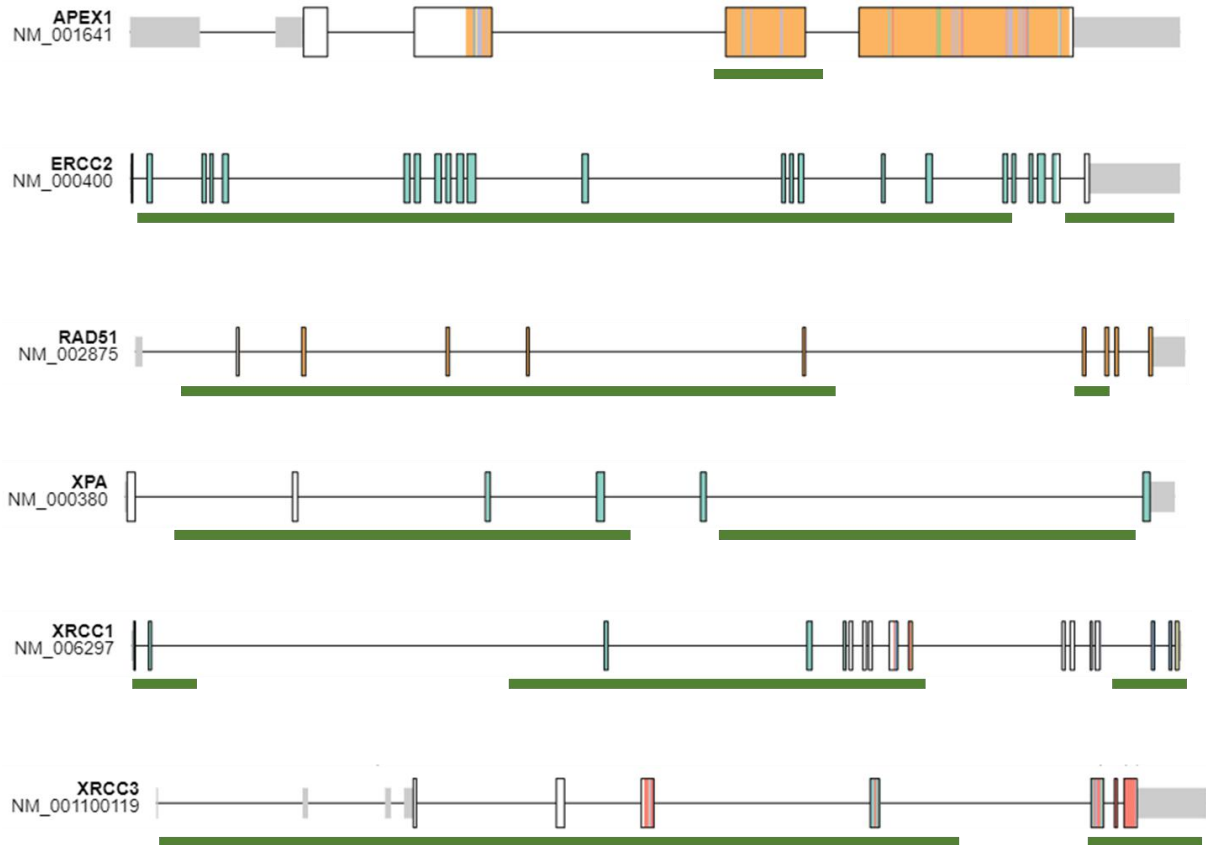


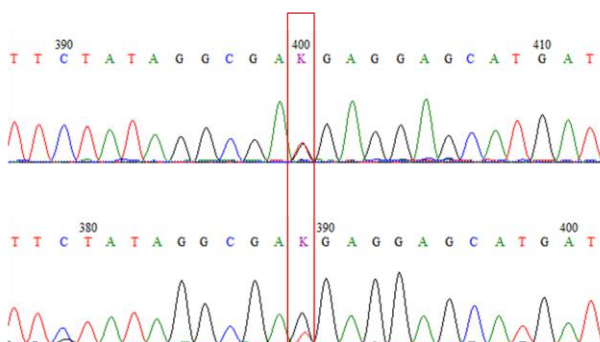
Figura 9. Desenho esquemático dos genes analisados destacando as regiões que foram amplificadas e sequenciadas com sucesso (retângulos em verde).

Foi realizada uma busca ativa dos SNPs e indels identificados nas bases de dados *National Library of Medicine (NIH)*, *Ensembl*, *Pecan* e *Haploreg* para consultar a frequência já descrita destas alterações em indivíduos saudáveis de diferentes populações, como também para avaliar a consequência funcional dessas alterações. Entre os SNPs identificados em XPD, observamos que rs238404, rs238414 e rs1799783 foram descritos relacionados com desenvolvimento de câncer de pulmão em tabagistas (BUCH, et al., 2011; SAKODA, et al., 2012); rs238415 relacionado com cânceres de endométrio (DOHERTY, et al., 2011), ovário (PEETHAMBARAM, et al., 2011) e esôfago (ZHANG, et al., 2014) e, por fim, rs238416 ligado à cânceres de mama (ZOLECK, et al., 2016) e pulmão (SAKODA, et al., 2012). Nenhuma das alterações encontradas se relacionam com malignidades hematopoiéticas (tabela 1). Observamos que todas as mutações detectadas em *XRCC3* e *RAD51* localizam-se em região intrônica e nenhuma delas foi previamente descrita no contexto de câncer (tabelas 2 e 3). Por outro lado, o sequenciamento do gene *XPA* (tabela 4), apresenta mutações em íntrons, sendo rs2808667 relacionada a câncer de pulmão em tabagistas (SAKODA, et al., 2012) e câncer de endométrio (DOHERTY, et al., 2012).

Finalmente, a tabela 5 aponta alterações do gene *XRCC2*, no qual rs2307187 (SAK, et al., 2007) e rs2854501 (LI, et al., 2012) estão associados ao câncer de bexiga, rs2854506 ao câncer de pulmão (BUCH, et al., 2012), rs3213356 câncer de mama (SEIBOLD, et al., 2015), rs762507 neoplasias de pulmão (BUCH, et al., 2012), cabeça e pescoço (VAEZI, et al., 2011), rs2293036 também câncer de pulmão (KIM, et al., 2010), rs2307191 câncer de cabeça e pescoço (VAEZI, et al., 2011), rs1799782 é o SNP envolvido em mais tipos de neoplasias como mama (ÖZGÖZ, et al., 2017), colorretal (PUERTA-GARCÍA, et al., 2020), pâncreas (CHEN, et al., 2017), pulmão (PÉREZ-RAMÍREZ, et al., 2018), esofago (TIAN, et al., 2019), glias (AL-KHAT, et al., 2020), incluindo também leucemia mielóide crônica em pacientes indianos (DHANGAR, et al., 2019), dentre outras neoplasias, por fim, rs25486 com cânceres de mama e pulmão.

Foi possível definir o genótipo de 4 dos 6 SNPs associados à leucemia em estudo prévio do nosso grupo. O paciente caracterizado neste estudo apresenta genótipo homocigoto mutante para os SNPs rs1130409 (Asp148Glu) em *APEX1* e rs25487 (Arg399Gln) em *XRCC1* (Figura 10). Embora o eletroferograma da fita senso do éxon 10 de *XRCC1* não tenha apresentado uma boa resolução, foi possível identificar a presença da mutação em ambos os alelos. Por outro lado, foi observado genótipo homocigoto selvagem para os SNPs rs13181 em *XPD* e rs861539 em *XRCC3*.

***APEX1* (éxon 5) - rs1130409**  
Asp148Glu (T>G)  
homocigoto mutante



***XRCC1* (éxon 10) - CM015158 ou rs25487**  
Arg399Gln (A>G)  
homocigoto mutante

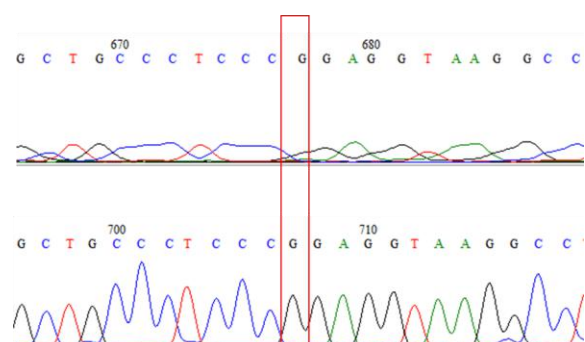


Figura 10. Eletroferograma destacando a região em que os SNPs rs1130409 (Asp148Glu) em *APEX1* e rs25487 (Arg399Gln) em *XRCC1* foram encontrados.

**Tabela 1.** Descrição do rastreamento realizado no gene *XPD*

Reação	Cobertura	Região da alteração	Tipo da alteração	Nomenclatura	Frequência da alteração*
2	Intron 2	-	-	Sem alteração	-
3	Intron 2- Intron 5	Intron 4	SNP	rs1799783 (C>T) em homozigose	0,40
6	Intron 5	Intron 5	SNP	rs3916806(T>C); rs3916808(T>G) em heterozigose	0,37 ; 0,45
7	Intron 5	Intron 5	indel	rs113512533 (indelTA) ou rs61410783 (indel) em homozigose	<0,001 ; 0,34
8	Intron 5	Intron 5	SNP	rs238408 (G>C)	0,37
9	Intron 5 – exon 8	Intron 7	SNP	rs238404 (T>A)	Não identificado
10	Exon 8 – Intron 11	Intron 10	Inserção	rs1568541837 (insC) em homozigose	<0,001
11	Intron 11	-	-	Sem alteração	-
13	Intron 11	Intron 11	SNP	rs238403 (T>C) em homozigose	0,65
15	Intron 12	Intron 12	Deleção	rs3916828 (GCCACCATGTCTGGCC >-) em heterozigose	Não identificado
18	Intron 12	Intron 12	SNP	rs238411 (G>A) em homozigose	0,40
19	Intron 12 – Intron 15	-	-	Sem alteração	-
20	Intron 15	Intron 15	SNP	rs106433 (C>T); rs3916862 (A>G)	0,70 ; 0,02
21	Intron 15 – Intron 16	Intron 15	indel	rs35665496 indelTTTTTTTT	0,45
22	Intron 16	Intron 16	indel	rs3916865 (indelCT)	0,42
23	Intron 16 – Intron 17	Intron 17	SNP	rs238413 (A>G); rs238414 (G>A) em homozigose	0,01 ; 0,40
24	Intron 17- Intron 18	Intron 17	SNP	rs238415 (G>C); rs238416 (A>G) em heterozigose	0,40 ; 0,65
27	Intron 22 – 3'UTR	-	-	Sem alteração	-

\*Frequência da alteração na população global consultada na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**Tabela 2.** Descrição do rastreamento realizado no gene *XRCC3*

Reação	Cobertura da reação	Região da alteração	Tipo da alteração	Nomenclatura	Frequência da alteração*
1	5'UTR – Intron 1	-	-	Sem alteração	-
2	Intron 1 – Intron 2	Intron 1	indel	rs374609724 (insCA) em heterozigose	<0,001
3	Intron 2	-	-	Sem alteração	-
4	Intron 2	Intron 2	SNP	rs113810186 (G>A) em homozigose	0,01
6	Exon 2 – Intron 3	-	-	Sem alteração	-
7	Intron 3 – Intron 4	-	-	Sem alteração	-
11	Intron 4	Intron 4	SNP	rs861532 (A>C) em homozigose	0,07
12	Intron 4	-	-	Sem alteração	-
14	Intron 5	Intron 5	indel	rs201647595 (insA) em heterozigose	<0,01
16	Intron 5	-	-	Sem alteração	-
17	Intron 5 – Exon 5	-	-	Sem alteração	-
19	3'UTR	-	-	Sem alteração	-

\*Frequência da alteração na população global consultada na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**Tabela 3.** Descrição do rastreamento realizado no gene *RAD51*

Reação	Cobertura da reação	Região da alteração	Tipo da alteração	Nomenclatura	Frequência da alteração*
5	Intron 1	-	-	Sem alteração	-
6	Exon 1	Intron 2	SNP	rs3101861 (G>C) em heterozigose	0,3
7	Intron 2	Intron 2	SNP	rs45510396(G>C) em heterozigose	0,004
8	Intron 2	-	-	Sem alteração	-
9	Exon 3 – Intron 3	-	-	Sem alteração	-
10	Intron 3	-	-	Sem alteração	-
11	Intron 3	-	-	Sem alteração	-
12	Intron 3	Intron 3	SNP	rs45504895 (T>C) em heterozigose	0,1
13	Intron 3	-	-	Sem alteração	-
14	Intron 3	Intron 3	SNP	rs114849710 C>G) em heterozigose	0,001
15	Intron 3	Intron 3	-	Sem alteração	-
16	Intron 3- Exon 4	-	-	Sem alteração	-
17	Intron 4	-	-	Sem alteração	-
18	Intron 4	Intron 4	SNP	rs7182231 (T>C) em homozigose	0,3
20	Intron 4- Intron 5	-	-	Sem alteração	-
24	Intron 5	-	-	Sem alteração	-
34	Intron 5	-	-	Sem alteração	-
36	Intron 6	Intron 6	SNP	rs2412548 (T>C) em heterozigose	0,5
38	Intron 6	-	-	Sem alteração	-
39	Intron 6	Intron 6	SNP	rs45624334 (G>C); rs2441549 (C>T) em heterozigose	0,01
48	Exon 6- Exon 7	-	-	Sem alteração	-

\*Frequência da alteração na população global consultada na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI).



**Tabela 4.** Descrição do rastreamento realizado no gene *XPA*

<b>Reação</b>	<b>Cobertura da reação</b>	<b>Região da alteração</b>	<b>Tipo da alteração</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Frequência da alteração*</b>
4	Intron 1	-	-	Sem alteração	-
9	Intron 2	-	-	Sem alteração	-
10	Intron 2	-	-	Sem alteração	-
12	Intron 3	-	-	Sem alteração	-
13	Intron 3	-	-	Sem alteração	-
14	Intron 3	-	-	Sem alteração	-
15	Intron 4	-	-	Sem alteração	-
17	Intron 5	-	-	Sem alteração	-
18	Intron 5	-	-	Sem alteração	-
22	Intron 5	Intron 5	SNP	rs2808667 (T>C) em homozigose	0,93
23	Intron 5	-	-	Sem alteração	-
24	Intron 5	Intron 5	SNP	rs1962592 (G>T) em homozigose	0,18
29	Intron 5	-	-	Sem alteração	-

\*Frequência da alteração na população global consultada na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**Tabela 5.** Descrição do rastreamento realizado no gene *XRCC1*

Reação	Cobertura da reação	Região da alteração	Tipo da alteração	Nomenclatura	Frequência da alteração*
1	região promotora	região promotora	SNP	rs2307187 (G>A) em homozigose	0,02
2	Intron 1	-	-	Sem alteração	-
3	Intron 2	Intron 2	indel	rs3213250 (indelTTTTA) em heterozigose	0,06
4	Intron 2	Intron 2	SNP	rs3213251	0,02
5	Intron 2	Intron 2	SNP	rs2854506 (A>G) em heterozigose	0,20
7	Intron 2	-	-	Sem alteração	-
18	Intron 2	Intron 2	SNP	rs762506 (T>C)	0,18
20	Intron 2	Intron 2	SNP	rs3213316 (G>A); rs3213321 (G>T) em heterozigose	0,03 ; 0,01
22	Intron 2	-	-	Sem alteração	-
25	Intron 3	-	-	Sem alteração	-
27	Intron 3	Intron 3	SNP	rs2022062 (T>C); <b>19:44060893 (G&gt;A) nova mutação</b>	0,35
28	Intron 3	Intron 3	SNP	rs2854500 (A>G) em homozigose	0,15
29	Intron 3	Intron 3	SNP	rs2854501 (A>G) em homozigose	0,70
30	Intron 3	Intron 3	SNP	rs3213348 (T>C) em homozigose	0,03
31	Intron 3	-	-	Sem alteração	-
32	Intron 4	Intron 4	indel; SNP	rs11386899 (insG); rs3213356 (C>T); rs762507 (T>C); rs2293036 (G>A) em homozigose	<0,001;0,57;0,65; 0,07
33		éxon 6	SNP	rs2307191 (G>A); rs1799782 (G>A; Arg194Trp) em homozigose	0,05;0,06
34	Intron 8	Intron 8	SNP	rs3213363 (G>A) em homozigose	0,25
35	Intron 9	Intron 9; éxon 10	SNP	rs25485 (A>G); rs25486 (C>T); rs25487 (T>C; Gln399Arg) em homozigose	0,38 ; 0,68 ; 0,65
36	Intron 10	Intron 10	indel	rs936586702 (delT)	<0,001
38	Intron 10	Intron 10	inserção	rs3213377 (insGTCTC) em heterozigose	0,06
44	Intron 14	Intron 14	SNP	rs25478(G>T) em homozigose	0,07
45	Intron 15	-	-	Sem alteração	-

47	Intron16	éxon 16	inserção	rs368976870 (insAG) em homozigose	Não identificado
48	Intron 16	éxon 16;17	inserção	rs368976870 (insAG); rs3547 (T>C; Gln632Gln) em homozigose	Não identificado ; 0,65

\*Frequência da alteração na população global consultada na base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI).

## 7. DISCUSSÃO

A leucemia linfoblástica aguda é a malignidade mais comum na infância e corresponde a mais de 80% dos casos de leucemia aguda. Apesar da importância e ocorrência, a etiologia ainda não é totalmente compreendida, embora haja a hipótese de que eventos que antecedem translocações e fusão gênica estejam na base do surgimento da doença (Ziegelberger et al., 2011).

Já se sabe que as variações individuais na capacidade de reparo existem e que podem estar associadas a presença de neoplasias. Neste estudo procurou-se avaliar se alterações polimórficas recorrentes em genes envolvidos na via de reparo de DNA poderiam ter impacto na ocorrência de um paciente apresentando LLA-pB de mau prognóstico. A função exercida pela proteína XPD, resultantes de polimorfismos na sequência do gene correspondente, tem sido avaliadas em estudos prévios quanto à susceptibilidade ao desenvolvimento de diversas neoplasias. Um estudo de meta-análise realizado por Wang e colaboradores em 2008 revelou uma associação entre o alelo polimórfico para *XPD* Lys751Gln e o risco aumentado não somente para LLA, mas também para neoplasias de pulmão e de esôfago.

Uma revisão brasileira recente tem mostrado que dentre os polimorfismos mais frequentemente estudados em genes envolvidos na via de reparo de DNA e que apresentaram correlação estatisticamente positiva com o risco aumentado para as leucemias agudas (tanto linfóides quanto mielóides) estão os genes *XRCCI* seguido de *XPD* (Brisson et al., 2015).

Com relação ao gene *XRCCI* Joseph e colaboradores (2005) verificaram a existência de risco aumentado para LLA em pacientes infantis homozigóticos para o alelo variante (*XRCCI* Gln399Gln).

A importância de compreender o papel do reparo de DNA se dá na nossa necessidade de saber como variedades individuais podem impactar na resposta aos danos gerados no genoma pelo uso contínuo de drogas cito e genotóxicas e como isso é capaz de modular a resposta prognóstica do paciente. Acredita-se que a presença de múltiplos polimorfismos contribuam para a instabilidade genômica de base, gerando conseqüentemente possibilidade para a ocorrência de novas mutações.

Já se estima que o futuro das terapias propostas para a LLA-pB (com o uso dos imunoterápicos, como: blinatumomab, inotuzumabe e até mesmo as células *CAR-T - chimeric antigen receptor - T*) tenham papel mais efetivo nas doenças refratárias aos protocolos de primeira linha e que esse conhecimento sobre genética básica nos permita entender quais drogas poderiam ser até mesmo eliminadas dos protocolos (Toksvang *et al.*, 2022).

## 8. CONCLUSÕES

- O rastreamento de mutações ao longo dos genes *APEX1*, *XPD*, *RAD51*, *XPA*, *XRCC1*, *XRCC3*, foi realizado com sucesso;
- Dos polimorfismos inicialmente investigados, o paciente deste estudo apresentou genótipo homozigoto mutante para os SNPs rs1130409 (*Asp148Glu*) em *APEX1* e rs25487 (*Arg399Gln*) em *XRCC1*, porém SNPs em *XRCC3* e *RAD51* também foram detectados;
- Por apresentar deleções nos genes *IKZF1* (exons 2 ao 7), *CDNK2A* (exons 2 ao 4), *CDKN2B* (exons 1 ao 2), *IGHD* e *PAX5* (exons 2, 5, 6, 7, 8, e 10), na ausência de deleção no gene *ERG* o paciente foi denominado *IKZF1-plus*;
- Ao todo foi identificado um total de 59 alterações, entre elas 1 mutação nova no caso em questão.

## 9. REFERÊNCIAS

- AL-KHATI, Sohaib M; ABDO, Nour; KEWAN, Tariq Zuheir. The Impact of the Genetic Polymorphism in DNA Repair Pathways on Increased Risk of Glioblastoma Multiforme in the Arab Jordanian Population: a case-control study. *The Application Of Clinical Genetics*, [S.L.], v. 13, p. 115-126, jun. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7295542/>>. Acesso em: 26 out. 2022.
- BARBOSA, Thayana Conceição; TERRA-GRANADO, Eugenia; MAGALHÃES, Isis M Quezado; NEVES, Gustavo Ribeiro; GADELHA, Andrea; FILHO, Gilson Espinola Guedes; SOUZA, Marcelo Santos; MELARAGNO, Renato; EMERENCIANO, Mariana, POMBO-DE-OLIVEIRA, Maria S. Frequência de anormalidades no número de cópias em genes comuns associados aos subtipos citogenéticos de leucemia linfoblástica aguda precursora de células B em crianças brasileiras. *Cancer genetics*, v. 208, n. 10, p. 492–501, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26277549/>>.

Brisson, Gisele D et al. “Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review.” *Ecancermedicalscience* vol. 9 539. 14 May. 2015,

doi:10.3332/ecancer.2015.539  
Brisson, Gisele D et al. “Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review.” *Ecancermedicalscience* vol. 9 539. 14 May. 2015, doi:10.3332/ecancer.2015.539

BHOJWANI, Deepa; YANG, Jun J.; PUI, Ching-Hon. Biologia da Leucemia Linfoblástica Aguda da Infância. **Clínicas pediátricas da América do Norte**, v. 62, n. 1, p. 47–60, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4250840/>>.

BORZÉKOVÁ PULZOVÁ, L.; WARD, T. A.; CHOVANEC, M. XPA: Proteína de reparação de DNA de importância clínica significativa. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, v. 21, n. 6, p. 2182, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235701/>>.

BUCH, Shama C.; DIERGAARDE, Brenda; NUKUI, Tomoko; DAY, Roger S.; SIEGFRIED, Jill M.; ROMKES, Marjorie; WEISSFELD, Joel L.. Genetic variability in DNA repair and cell cycle control pathway genes and risk of smoking-related lung cancer. *Molecular Carcinogenesis*, [S.L.], v. 51, n. 1, p. 11-20, 4 out. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21976407/>>. Acesso em: 15 out. 2022.

BUCH, Shama C.; DIERGAARDE, Brenda; WEISSFELD, Joel L. Genetic variability in DNA repair and cell cycle control pathway genes and risk of smoking-related lung cancer. *Molecular carcinogenesis*, v. 51 Suppl 1, n. S1, p. E11-20, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3289753/>>. Acesso em: 26 out. 2022.

BULLERWELL, C. E.; ROBICHAUD, P. P.; DEPREZ, P.; JOY, A. P.; WAJNBERG, G.; D'SOUZA, D.; CHACKO, S.; FOURNIER, S.; CRAPOULET, N.; BARNETT, D. A.; LEWIS, S. M.; OUELLETTE, R. J. EBF1 impulsiona a expressão genética da célula B marca, permitindo a interação do PAX5 com o complexo de metiltransferase MLL H3K4. **Relatórios Científicos**, v. 11, n. 1. p. 1537, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33452395/>>.

*Cancer Epidemiology*. v. 38, p. 479–89, 2014.

CHEN, Jun; WANG, Hong; LI, Zhiming. Association between Polymorphisms of X-Ray Repair Cross Complementing Group 1 Gene and Pancreatic Cancer Risk: a systematic review

with meta-analysis. *Pathology & Oncology Research*, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 897-904, 28 dez. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29285737/>>. Acesso em: 18 out. 2022.

CHEN, X.; YU, X.; SHEN, E. Superexpressão do CDKN2B está envolvida em prognóstico de câncer gástrico ruim. *Jornal de Bioquímica Celular*, v. 120, n. 12, p. 19825–19831, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31297846/>>.

DAVID, S.; O'SHEA, V.; KUNDU, S. Reparo por excisão de base de danos oxidativos no DNA. *Nature*, v. 447, p. 941–950, 2007. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature05978>>.

DHANGAR, Somprakash; SHANBHAG, Vinay; SHANMUKHAIHAH, Chandrakala; VUNDINTI, Babu Rao. Lack of association between functional polymorphism of DNA repair genes (XRCC1, XPD) and clinical response in Indian chronic myeloid leukemia patients. *Molecular Biology Reports*, [S.L.], v. 46, n. 5, p. 4997-5003, 8 jul. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-019-04950-0>>. Acesso em: 17 out. 2022.

DOHERTY, J. A; WEISS, Noel S; CHEN, Chu. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and endometrial cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, v. 20, n. 9, p. 1873–1882, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3169742/>>. Acesso em: 26 out. 2022.

DESTERKE, C., BENNACEUR-GRISCELLI, A.; TURHAN, A. G. A desregulação EGR1 define um programa inflamatório e leucético na trajetória celular de células-tronco hematopoiéticas (HSC). *Pesquisa e terapia com células-tronco*, v. 12, n. 1, p. 419, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34294125/>>.

EDIFIZI, D.; SCHUMACHER, B. Instabilidade do Genoma no Desenvolvimento e Envelhecimento: Insights do Reparo de Excisão de Nucleotídeos em Humanos, Ratos e Vermes. *Biomoléculas*, v. 5, n. 3, p. 1855-69, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26287260/>>.

GU, Zhaohui; CHURCHMAN, Michelle L.; ROBERTS, Kathryn G. *et al.* Subtipos orientados por PAX5 de leucemia linfoblástica aguda B-progenitor. *Genética da Natureza*,

v. 51, p. 296–307, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41588-018-0315-5>>.

HODGSON, D. R.; DOUGHERTY, B. A.; LAI, Z.; Fielding, A., GRINSTED, L.; SPENCER, S.; O'CONNOR, M. J.; HO, T. W.; ROBERTSON, J. D.; LANCHBURY, J. S.; TIMMS, K. M.; GUTIN, A.; ORR, M.; JONES, H.; GILKS, B.; WOMACK, C.; GOURLEY, C.; LEDERMANN, J.; BARRETT, J. C. Biomarcadores candidatos da sensibilidade inibidora parp em câncer de ovário além dos genes BRCA. **Jornal Britânico do Câncer**, v. 119, n. 11, p. 1401–1409, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6265286/>>.

HOFFMAN, R.; BENZ, E. J.; SHANTTIL, S. J.; FURIE, B.; COHEN, H. J.; SILBERSTEIN, L. E.; MCGLAVE, P. **Hematology Basic Principles and Practice**, 4ª Ed. Editora Elsevier, p. 200-213, 2005.

HOWLADER, N. et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®) – Health Professional Version. **National Cancer Institute (US)**, 2017.

ILIAKIS, George; MURMANN, Tamara; SONI, Aashish. As vias alternativas de reparo de junção de extremidade são o backup final para o reparo de junção de extremidade clássica não homóloga e recombinação homóloga revogada: Implicações para a formação de translocações cromossômicas. **Pesquisa de Mutação/Toxicologia Genética e Mutagênese Ambiental**, v. 793, p. 166–175, 2015. Disponível em: <[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571815001795?casa\\_token=QPuZTD4WFE0AAAAA:uSC7i3AT6hxwxZwULG\\_FRZ3CIv\\_GRjr2BF65FeQ9Zd9Rc-j1fkG13-Hxrq-9R66pNvr3-Udoc0bf](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571815001795?casa_token=QPuZTD4WFE0AAAAA:uSC7i3AT6hxwxZwULG_FRZ3CIv_GRjr2BF65FeQ9Zd9Rc-j1fkG13-Hxrq-9R66pNvr3-Udoc0bf)>.

Joseph, Thomas et al. “DNA repair gene XRCC1 polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia.” *Cancer letters* vol. 217,1 (2005): 17-24.  
doi:10.1016/j.canlet.2004.06.055

JUNG, M.; SCHIECK, M.; HOFMANN, W.; TAUSCHER, M.; LENTES, J.; BERGMANN, A.; STELTER, M.; MÖRICKE, A.; ALTEN, J.; SCHELEGELBERGER, B.; SCHRAPPE, M.; ZIMMERMAN, M.; STANULLA, M.; CARIO, G.; STEINEMANN, D. Frequência e impacto prognóstico de PAX5 p.P80R em pacientes com leucemia linfoblástica aguda pediátrica tratada em um protocolo de leucemia linfoblástica aguda AIEOP-BFM. **Genes**

**Cromossomos & Câncer**. v. 59, n. 11, p. 667–671, 2020. Disponível em:  
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32592278/>>.

KOLECK, Theresa A.; BENDER, Catherine M.; SEREIKA, Susan M.; BRUFISKY, Adam M.; LEMBERSKY, Barry C.; MCAULIFFE, Priscilla F.; PUHALLA, Shannon L.; RASTOGI, Priya; CONLEY, Yvette P.. Polymorphisms in DNA repair and oxidative stress genes associated with pre-treatment cognitive function in breast cancer survivors: an exploratory study. Springerplus, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 422, 9 abr. 2016. Disponível em:  
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27099827/>>. Acesso em: 19 out. 2022.

KIM, In-Suk; LEE, Gyeong-Won; KIM, Dong Chul; KIM, Hoon-Gu; KIM, Sunjoo; OH, Sung Yong; KIM, Sung-Hyun; KWON, Hyuk-Chan. Polymorphisms and Haplotypes in the XRCC1 Gene and the Risk of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. Journal Of Thoracic Oncology, [S.L.], v. 5, n. 12, p. 1912-1921, dez. 2010. Elsevier BV. Disponível em:  
<[https://www.jto.org/article/S1556-0864\(15\)31862-1/fulltext](https://www.jto.org/article/S1556-0864(15)31862-1/fulltext)>. Acesso em: 31 out. 2022.

LEE, Tae-Hee; KANG, Tae-Hong. Oxidação do DNA e Vias de Reparo por Excisão. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, 2019.

LEUCEMIA. INCA, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>>.

LI, Pengchao; ZHANG, Xiaolei; YIN, Changjun. Pharmacogenetic association between XRCC1 polymorphisms and improved outcomes in bladder cancer patients following intravesical instillation of epirubicin. International journal of clinical and experimental medicine, v. 8, n. 7, p. 11167–11173, 2015. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4565302/>>. Acesso em: 23 out. 2022.

MANGS, A. H.; MORRIS, B. J. Região Pseudoautosômica Humana (PAR): Origem, Função e Futuro. **Genômica atual**, v. 8, n. 2, p. 129–136, 2007. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2435358/>>.

MEZEI, G. *et al.* Epidemiology of Childhood Leukemia in the Presence and Absence of Down Syndrome.

MOREIRA, Larissa Aparecida; BATISTA, Sílvia Caroline; SILVA, Joyce Beira Miranda da. Diagnóstico de leucemias linfóides agudas: uma revisão. **Revista Saúde em Foco**, n. 10, p.



279–287, 2018. Disponível em: <[https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/06/038\\_leucemia.pdf](https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2018/06/038_leucemia.pdf)>.

MORIYAMA, Takaya; METZGER, Monika; WU, Gang; NISHII, Rina; QIAN, Maoxiang; DEVIDAS, Meenakshi; YANG, Wenjian; QUINN, Emily; GASTIER-FOSTER, Julie; RAETZ, Elizabeth; LARSEN, Eric C.; MARTIN, Paul L.; BOWMAN, W. Paul; WINICK, Naomi J.; KOMADA, Yoshihiro; MARDIS, Elaine R.; FULTON, Robert; PUI, Ching-Hon; EVANS, William E.; ZHANG, Jinghui; HUNGER, Stephen P.; RELLING, Mary V.; NICHOLS, Kim E.; LOH, Mignon; YANG, Jun J. *Sangue*, v. 126, n. 23, 2015. Disponível em: <[https://ashpublications.org/blood/article/126/23/695/136371/Germline-Genetic-Variation-in-ETV6-and?utm\\_source=TrendMD&utm\\_medium=cpc&utm\\_campaign=Blood\\_TrendMD\\_0](https://ashpublications.org/blood/article/126/23/695/136371/Germline-Genetic-Variation-in-ETV6-and?utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=Blood_TrendMD_0)>

NISHII, Rina; BASKIN-DOERFLER, Rebekah; WENTAO, Yang; NINAD, Oak; ZHAO, Xujie; YANG, Wenjian; HOSHITSUKI, Keito; BLOOM, Mackenzie; VERVIST, Katherine; BURNS, Melissa; LI, Zhenhua; LIN, Ting-Nien; QIAN, Maoxiang; MORIYAMA, Takaya; GASTIER-FOSTER, Julie M.; RABIN, Karen R.;

ÖZGÖZ, Asuman; ÖZTÜRK, Kuyaş Hekimler; YÜKSELTÜRK, Ayşegül; ŞAMLİ, Hale; BAŞKAN, Zuhar; İÇDUYGU, Fadime Mutlu; BACAĞSIZ, Mehmet. Genetic Variations of DNA Repair Genes in Breast Cancer. *Pathology & Oncology Research*, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 107-114, 5 out. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28983784/>>. Acesso em: 19 out. 2022.

PEETHAMBARAM, P. et al. Polymorphisms in ABCB1 and ERCC2 associated with ovarian cancer outcome. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, v. 2, n. 2, p. 185–195, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21686133/>>. Acesso em: 20 out. 2022.

PÉREZ-RAMÍREZ, Cristina; CAÑADAS-GARRE, Marisa; ALNATSHA, Ahmed; VILLAR, Eduardo; VALDIVIA-BAUTISTA, Javier; FAUS-DÁDER, María José; CALLEJA-HERNÁNDEZ, Miguel Ángel. Pharmacogenetics of platinum-based chemotherapy: impact of dna repair and folate metabolism gene polymorphisms on prognosis of non-small cell lung cancer patients. *The Pharmacogenomics Journal*, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 164-177, 17 abr. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29662106/>>. Acesso em: 22 out. 2022.

PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version, 2021.

PIETERS, Rob; GROOT-KRUSEMAN, Hester de; VELDEN, Vincent Van der; FIOCCO, Marta; BERG, Henk van den; BONT, Evelien de; EGELER, Maarten; HOOGERBRUGGE, Peter; KASPERS, Gertjan; SHOOT, Ellen Van der; HASS, Valerie De; DONGEN, Jacques Van. Redução terapêutica bem-sucedida e intensificação para leucemia linfoblástica aguda infantil com base no monitoramento mínimo de doenças residuais: estudo ALL10 do Grupo de Oncologia Infantil Holandesa. **Revista de Oncologia Clínica**, v. 34, n. 22, p. 2591–2601, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27269950/>>.

PUERTA-GARCÍA, E.; URBANO-PÉREZ, D.; CARRASCO-CAMPOS, M.I.; PÉREZ-RAMÍREZ, C.; SEGURA-PÉREZ, A.; CALLEJA-HERNÁNDEZ; CAÑADAS-GARRE, M.. Effect of DPYD, MTHFR, ABCB1, XRCC1, ERCC1 and GSTP1 on chemotherapy related toxicity in colorectal carcinoma. *Surgical Oncology*, [S.L.], v. 35, p. 388-398, dez. 2020.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960740420303996?via%3Dihub>>.

Acesso em: 21 out. 2022.

PUI, Ching-Hon; YANG, Jun J.; BHAKTA, Nickhill; RODRIGUEZ- GALINDO, Carlos. **The Lancet Saúde da Criança e do Adolescente**, v. 2, n. 6, p. 440–454, 2018. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lanchi/article/PIIS2352-4642\(18\)30066-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanchi/article/PIIS2352-4642(18)30066-X/fulltext)>.

RAETEZ, Elizabeth; MULLIGHAN, Charles; PUI, Ching-Hon; YEOH, Allen Eng-Juh Yeoh; ZHANG, Jinghui; METZGER, Monika L.; KLCO, Jeffery M.; HUNGER, Stephen P.; NEWMAN, Scott; WU, Gang; LOH, Mignon L.; NICHOLS, Kim E.; YANG, Jun J. Base molecular da predisposição mediada por ETV6 para leucemia linfoblástica aguda na infância. *Sangue*, v. 137, n. 3, p. 364–373, 2021. Disponível em:

<<https://ashpublications.org/blood/article-abstract/137/3/364/461432/Molecular-basis-of-ETV6-mediated-predisposition-to?redirectedFrom=fulltext>>.

RAMAMOORTHY, S.; KOMETANI, K.; HERMAN, J. S. *et al.* EBF1 e Pax5 protegem a transformação leucêmica limitando a sinalização de IL-7, expressão de Myc e metabolismo de folato. **Desenvolvimento de Genes**, n. 34, p. 1503–1519, 2020. Disponível em:

<<http://genesdev.cshlp.org/content/34/21-22/1503.full.pdf>>.

ROBERTS, M. R.; SHIELDS, P. G.; AMBROSONE, C. B.; NIE, J.; MARIAN, C.; KRISHNAN, S. S.; GOERLITZ, D. S.; MODALI, R.; SEDDON, M.; LEHMAN, T.. Single-nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and association with breast cancer risk in the web study. *Carcinogenesis*, [S.L.], v. 32, n. 8, p. 1223-1230, 27 maio 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21622940/>>. Acesso em: 31 out. 2022.

ROSALES-RODRÍGUEZ, B.; NÚÑEZ-ENRÍQUEZ, J. C.; MEJÍA-ARANGURÉ, J. M. *et al.* Impacto prognóstico de alterações no número de cópias somáticas na leucemia linfoblástica aguda da linha B infantil. **Relatórios Atuais de Oncologia**, v. 23, n. 2, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11912-020-00998-5>>.

RUSSELL, Lisa J. *et al.* A expressão desregulada do gene do receptor de citocinas, CRLF2, está envolvida na transformação linfóide na leucemia linfoblástica aguda precursora de células B. **Sangue**, v. 114, n. 13, p. 2688–2698, 2009. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/114/13/2688/26369/Deregulated-expression-of-cytokine-receptor-gene>>.

SAKODA, L. C. *et al.* Germ line variation in nucleotide excision repair genes and lung cancer risk in smokers. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, v. 3, n. 1, p. 1–17, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22493747/>>. Acesso em: 17 out. 2022

SADIGURSCHI, G.; FRIGOTTO, K. G.; GARCIA, G. S. B.; RISCAROLLI, E. B.; APOLONARIO, L. E. V.; TIAGO, C. F. D. S.; SANTOS, T. L. D.; VALVIESSA, V. R. A. Perfil epidemiológico dos pacientes internados por leucemia no município do Rio de Janeiro. **Hematologia, Transfusão e Terapia Celular**, v. 43, n. 1, p. S171, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2531137921004387>>.

SAK, Sei Chung; BARRETT, Jennifer H; KILTIE, Anne E . DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and bladder cancer risk. *BMC genetics*, v. 8, n. 1, p. 13, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1865553/>>. Acesso em: 28 out. 2022.

SAKODA, Lori C; LOOMIS, Melissa M; CHEN, Chu. Germ line variation in nucleotide excision repair genes and lung cancer risk in smokers. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, v. 3, n. 1, p. 1–17, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3316453/>>. Acesso em: 27 out. 2022.

SCHWAB, C. J.; MORRISON, H.; RYAN, S. L.; YIGITTOP, H.; SCHOUTEN, J. P.; HARRISON, C. J. Avaliação da amplificação da sonda dependente da ligadura multiplex como um método para a detecção de anormalidades de número de cópias em leucemia linfoblástica aguda precursora de células B. **Genes Cromossomos & Câncer**, v. 49, n. 12, p. 1104–1113, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20815030/>>.

SEIBOLD, Petra; SCHMEZER, Peter; POPANDA, Odilia. A polymorphism in the base excision repair gene PARP2 is associated with differential prognosis by chemotherapy among postmenopausal breast cancer patients. **BMC cancer**, v. 15, n. 1, p. 978, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4682235/>>. Acesso em: 25 out. 2022.

SLIWIŃSKI, T.; BŁASIAK, J. Reparo de excisão base. **Avanços em Bioquímica**, v. 51, n. 2, p. 120–129, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16209349/>>.

SOMASUNDARAM, R.; JENSEN, C. T.; TINGVALL-GUSTAFSSON, J.; ÅHSBERG, J.; OKUYAMA, K.; PRASAD, M.; HAGMAN, J. R.; WANG, X.; SONEJI, S.; STRID, T.; UNGERBÄCK, J.; SIGVARDSSON, M. EBF1 e PAX5 controlam a expansão de células pró-B através da regulação oposta do gene Myc. **Sangue**, v. 137, n. 22, p. 3037-3049, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33619557/>>.

SONOHARA, Y.; TAKATSUKA, R.; MASUTANI, C.; IWAI, S.; KURAOKA, I. O acetaldeído induz lesões de DNA mutagênico reparáveis por NER. **Carcinogênese**, v. 43, n. 1, p. 52–59, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34546339/>>.

STANULLA, M.; DAGDAN, E.; CARIO, G.; SCHRAPPE, M.; ZIMMERMANN, M. *et al.* IKZF1plus Define um Novo Perfil de Prognóstico Paupérrimo Dependente de Doença Residual Mínimo em Leucemia Linfoblástica Aguda Precursora de Células B Pediátricas. **Revista de Oncologia Clínica**, v. 36, n. 12, 2018.

STILLER, C. A., CHESSELLS, J. M., FITCHETT, M. Neurofibromatosis e leucemia infantil/linfoma: um estudo ukccsg baseado na população. **Frei J Câncer**, v. 70, n. 5, p. 969-72, 1994.

TAMBINI, C. E.; SPINK, K. G.; ROSS, C. J.; HILL, M. A.; THACKER, John. A importância do XRCC2 na reparação de danos de DNA relacionados ao RAD51. **Reparo de DNA**, v. 9, n. 5, p. 517-525, 2010. Disponível em: <[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786410000352?casa\\_token=zXxx7F](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786410000352?casa_token=zXxx7F)>

Wg7V8AAAAA:X0uefbhbd9T3Tm2WK4esQth9LN1yzmVdxx452N82y8f-GXSn0L79jEQXfOyleFe-MyAnwNFfuT3\_>.

TANG, Q; ÇAĞLAYAN, M. A proteína do andaime XRCC1 estabiliza a formação de pol $\beta$ /gap DNA e complexos de DNA ligase III $\alpha$ /nick no reparo da excisão base. **O jornal da química biológica**, v. 297, n. 3, p. 101025, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34339737/>>.

TAYLOR, A. M., METCALFE, J. A., THICK, J. *et al.* Leucemia e linfoma em ataxia telangiectasia. **Sangue**, v. 87, n. 2, p. 423-38, 1996.

TIAN, Jie; LIU, Caiyang; LIU, Guanchu; ZUO, Chunjian; CHEN, Huanwen. Cumulative evidence for association between genetic polymorphisms and esophageal cancer susceptibility: a review with evidence from meta-analysis and genome-wide association studies. *Cancer Medicine*, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 1289-1305, 21 fev. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30793520/>>. Acesso em: 23 out. 2022.

Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, Sobral da Costa E, Kotrová M, Novakova M, Sonneveld E, Buracchi C, Bonaccorso P, Oliveira E, Te Marvelde JG, Szczepanski T, Lhermitte L, Hrusak O, Lecrevisse Q, Grigore GE, Froňková E, Trka J, Brüggemann M, Orfao A, van Dongen JJ, van der Velden VH; EuroFlow Consortium. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017 Jan 19;129(3):347-357. doi: 10.1182/blood-2016-07-726307. Epub 2016 Nov 30. PMID: 27903527; PMCID: PMC5291958.

Toksvang, Linea N et al. “Maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia: basic science and clinical translations.” *Leukemia* vol. 36,7 (2022): 1749-1758. doi:10.1038/s41375-022-01591-4

TRATAMENTO de Leucemia Linfoblástica Aguda infantil (PDQ®): resumos de Informações sobre Câncer de PDQ. **Instituto Nacional do Câncer (EUA)**, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65763/>>.

TRATAMENTO de Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil (PDQ®): versão do paciente. **Instituto Nacional do Câncer (EUA)**, 2021. Disponível em: <[https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq#\\_1](https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq#_1)>.

VAEZI, Alec; FELDMAN, Chelsea H; NIEDERNHOFER, Laura J. ERCC1 and XRCC1 as biomarkers for lung and head and neck cancer. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, v. 4, p. 47–63, 2011. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/ercc1-and-xrcc1-as-biomarkers-for-lung-and-head-and-neck-cancer-peer-reviewed-fulltext-article-PGPM>>. Acesso em: 23 out. 2022.

VAEZI, Alec; NIEDERNHOFER, Laura J; FELDMAN, Chelsea H. ERCC1 and XRCC1 as biomarkers for lung and head and neck cancer. *Pharmacogenomics And Personalized Medicine*, [S.L.], p. 47, jul. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3513219/>>. Acesso em: 23 out. 2022.

VIZCAÍNO, M. *et al.* Guía de atención integral para la detección oportuna, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de leucemia linfocítica aguda em niños, niñas y adolescentes. *Revista Colombiana de Cancerología*, Bogotá, v. 20, n. 1, p. 17–27, jan./ju de 2016.

WANG, Fan et al. “DNA repair gene XPD polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 56 case-control studies.” *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* vol. 17,3 (2008): 507-17. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-2507

WHITAKER, A. M.; FREUDENTHAL, B. D. APE1: Um cirurgião de ácido nucleico qualificado. **Reparo de DNA (Amst)**, v. 71, p. 93-100, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30170830/>>.

XIAO, F.; PU, J.; WEN, Q.; HUANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, B.; HUANG, S.; LAN, A.; ZHANG, Y.; LI, J.; ZHAO, D.; SHEN, J.; WU, H.; HE, Y.; LI, H.; YANG, X. Associação entre o polimorfismo ERCC2 Asp312Asn e risco de câncer. **Oncotarget**, v. 8, n. 29, p. 48488–48506, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5564664/>>.

YEH, C. D.; RICHARDSON, C. D.; CORN, J. E. Avanços na edição de genomas através do controle de vias de reparação de DNA. **Biologia Celular da Natureza**, v. 21, p. 1468–1478, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41556-019-0425-z>>.

ZHANG, Yougai; WANG, Longzhi; WANG, Peng; SONG, Chunhua; WANG, Kaijuan; ZHANG, Jianying; DAI, Liping. Association of single nucleotide polymorphisms in ERCC2

gene and their haplotypes with esophageal squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*, [S.L.], v. 35, n. 5, p. 4225-4231, 4 jan. 2014. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24390613/>>. Acesso em: 26 out. 2022.

ZHAO, R.; CHOI, B. Y.; LEE, M. H.; BODE, A. M.; DONG, Z. Implicações de Alterações Genéticas e Epigenéticas do CDKN2A (p16INK4a) no Câncer. **EBioMedicine**, v. 8, p. 30–39, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4919535/>>.

Ziegelberger G, Baum C, Borkhardt A, et al. Research recommendations toward a better understanding of the causes of childhood leukemia. *Blood Cancer J* 2011;

KOLECK, Theresa A.; BENDER, Catherine M.; SEREIKA, Susan M.; BRUFISKY, Adam M.; LEMBERSKY, Barry C.; MCAULIFFE, Priscilla F.; PUHALLA, Shannon L.; RASTOGI, Priya; CONLEY, Yvette P.. Polymorphisms in DNA repair and oxidative stress genes associated with pre-treatment cognitive function in breast cancer survivors: an exploratory study. *Springerplus*, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 422, 9 abr. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27099827/>>. Acesso em: 19 out. 2022.

## Anexo I

### Termo de consentimento



Hospital Universitário Pedro Ernesto

Unidade Docente Assistencial de Hematologia

Rio de Janeiro, 24/5/2019.

*Termo de consentimento de quimioterapia, transfusão e colocação de cateteres e pesquisa clínica*

**Paciente: DAVI ANTONY DA SILVA Registro: 1946356**

**Diagnóstico: LLA**

Realizou biópsia e mielograma medula óssea, foi informada por mim, médica da hematologia, Patrícia Horn, CRM 5282446-1, que o tratamento utilizado na nossa instituição é baseado em evidências de revistas de reconhecimento e recomendações internacionais, que visa destruir as células cancerosas, mas também atinge as células normais do seu organismo. Pode ser realizado em esquema ambulatorial ou internado, medicamentos introduzidos através da veia ou do músculo, podendo causar efeitos colaterais de diferentes formas e intensidades, como: tosse, coceira, ardência, vermelhidão, falta de ar, reações alérgicas, náuseas, vômitos, falta de apetite, feridas, gosto metálico na boca, diarreia, prisão de ventre, problemas renais, hepáticos, cardíacos e pulmonares, até parada cardíaca, diminuição da audição, paladar, olfato, fraqueza, queda de cabelo, escurecimento da pele, menopausa precoce, diminuição do desejo sexual, infertilidade, baixa de imunidade, febre, sangramentos, necessidade transfusional, internação e uso de antibióticos. Algumas quimioterapias podem levar a inflamação e irritação no local da punção. Se houver saída do medicamento da veia, isso pode ocasionar lesão da pele, tipo queimadura.. Autorizo colocação de cateteres e entendo seus riscos como sangramentos e infecções.

O tratamento é imunossupressor ( tira a defesa do organismo ) e pode levar a infecções graves.

Espera-se que com este tratamento o (a) paciente venha recuperar sua saúde, impedindo que a doença evolua, diminuindo a chance de voltar, controlando dores e melhorando sua qualidade de vida.

Estou ciente de que poderei apresentar situações imprevisíveis, emergenciais, as quais serão conduzidas pela equipe médica com o objetivo de resolução.

Eu, Marcela da Conceição Gomes da Silva, estou ciente dos riscos associados à quimioterapia. Certifico que este texto foi totalmente esclarecido para mim e meus familiares; certifico que li o que foi lido para mim e todas as suas dúvidas explicadas e autorizo que os dados referentes ao tratamento sejam utilizados para fins de pesquisa com garantia de confidencialidade. Sendo assim concordo em receber este tratamento.

Data 24/5/19

Assinatura do paciente

Dra Patrícia Horn  
Hematologia HUPE/UERJ

CRM 5266407-3

*Anexo I Termo de consentimento exigido pelo Comitê de Ética em Pesquisa com assinatura de concordância da responsável legal do paciente.*



## Anexo II

Primers e parâmetros de ciclagem utilizados para estudo do gene *XPD*

<b>Gene.mix</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Tamanho do <i>amplicon</i></b>	<b>Sequência dos primers</b>
XPD.1	PCR Touchdown	786pb	atataggtggagcgagccct agtacagacggggttcacc
XPD.2	Condição 1	846pb	tgggaatccaggacccata ttcagaaccttgggcacac
XPD.3	PCR Touchdown	754pb	tgctgctgtttatcctgct gtagccactgcatgccttg
XPD.4	Condição 1	846pb	tcgtccaaccacaagtctg ctcaaactcccagctcagg
XPD.5	PCR Touchdown	771pb	tcattgtacttggctgggca ataaggctgggcacgatgg
XPD.6	Condição 1	791pb	gctaggattacaggtgcccc gtgcccagccaaaactaat
XPD.7	PCR Touchdown	804pb	aaggttccatgcgttttggc gccgagatcatgccactgta
XPD.8	Condição 1	835pb	tgagtgggggaaggatcact TTTCCCATCGACGTCCTTCC

XPD.9	Condição 1	757pb	gtgtggagaccagggttga
			TGGACACCAGGTCTGCAATC
XPD.10	PCR Touchdown	818pb	GATTGCAGACCTGGTGTCCA
			gaggacacggctctgataa
XPD.11	Condição 1	789pb	ttatgcagagccgtgtctc
			tcccagtgtctcatttga
XPD.12	Condição 1	755pb	tcacagggttcttggggg
			catggtcacgcattcacacc
XPD.13	Condição 1	837pb	tgggtgttgactgcattct
			AGAAGTCAGCAAGGTCGGT G
XPD.14	Condição 1	843pb	AGATCACCGACCTTGCTGAC
			tctgctgcctaaccattcc
XPD.15	Condição 1	771pb	tttcttctgggtgtgaacg
			gccactatgccaggcctatt
XPD.16	PCR Touchdown	805pb	cagagcgaagactccgtctc
			gaagatggggcaggacagag
XPD.17	Condição 1	784pb	gatggagatctgggcccttg
			tacttgctggtcccatgtgg
XPD.18	Condição 1	824pb	tgaccaaattggagcagcctt

			cccaaaccaggcatctgagt
XPD.19	Condição 1	836pb	actcagatgcctggttggg
			tctcaaccacctgggagat
XPD.20	Condição 1	833pb	atctcccagggtggttgaga
			cacacaaccaccatgcagtg
XPD.21	PCR Touchdown	759pb	ggcttttgagttgcctgctc
			gtaccacgggcaagaaggaa
XPD.22	Condição 1	760pb	atccctggccttagttgctc
			TCCAGCAGGAGGTTCCCATA
XPD.23	Condição 1	834pb	acagagaaggaggaggacc
			tgcgtgcctttccaatacct
XPD.24	Condição 1	814pb	aaagcactttggggtgaggt
			GTTCTCAAGGATCCCctggg
XPD.25	Condição 1	762pb	acatggtgatgtgggagtcc
			gatgagaagctggggaggtg
XPD.26	Condição 1	816pb	ACACAGAGCCGCATTCTCAA
			gtctctcctgaaaacgcca
XPD.27	PCR Touchdown	767pb	gggtgagagaagtgggggtg
			TGTAACACTTGCCCCCTCACC

XPD.28	PCR Touchdown	754pb	GGTGAGGGGGCAAGTGTTACA
			CATCTTTCCCCCTAGGTGCC
XPD.29	PCR Touchdown	840pb	ATCCTCACCTGTTCTGCGTC
			CCCTTGGAGCAAGTGTCAGA

### Anexo III

Primers e parâmetros de ciclagem utilizados para estudo do gene *XRCC3*

<b>Gene.mix</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Tamanho do <i>amplicon</i></b>	<b>Sequência dos primers</b>
XRCC3.1	PCR Touchdown	785pb	cctgctgctctgtagtctg
			cccattccagacactgatgc
XRCC3.2	PCR Touchdown	808pb	ctcaactgctgcaggaggat
			tgaggcaggagaatggtgtg
XRCC3.3	PCR Touchdown	778pb	gatctcagctcagtgaagc
			aaggatggagggtcaggaca
XRCC3.4	PCR Touchdown	804pb	tcagctacgtgaacctcagc
			agttacaggggtgcagatcc
XRCC3.5	PCR Touchdown	834pb	cagtctgcagcatttgcgt
			TGTAAGGATGCTGCTTCCCC
XRCC3.6	PCR Touchdown	829pb	TCCTTACACTTGCGGGGAAG
			tttgacacagcctcctccac
XRCC3.7	PCR Touchdown	811pb	gtggaggaggtgtgtcaaa
			aaagctgtcccacacaaagc
XRCC3.8	Condição 1	843pb	ctccctccttctcacctga
			ctgcagggacaaaaatgcct

XRCC3.9	Condição 1	828pb	tgagcttcagtgctgggtg
			gcgtgtttttgtgggtga
XRCC3.10	Condição 1	833pb	gcagcccctacataacgtca
			gattacaaggcgtgcgtac
XRCC3.11	PCR Touchdown	766pb	gtagcgcacgccttgaatc
			caatctgggctccatggtga
XRCC3.12	PCR Touchdown	846pb	gcctcctacacatcctcacc
			cgtaaaccctcatgacctat
XRCC3.13	Condição 1	752pb	atgggtcatgggggtttacg
			ctgaggtcacctgtctgagc
XRCC3.14	PCR Touchdown	752pb	ctgccctggtgagatagctg
			gagatcgagaccatcctggc
XRCC3.15	PCR Touchdown	757pb	gagacgggggttcaccatgt
			agaaggctctgtgtccacac
XRCC3.16	PCR Touchdown	804pb	gtgtggacacagagccttct
			ggatggggctgtaggttgag
XRCC3.17	PCR Touchdown	822pb	ctcaacctacagcccatcc
			CTGGTTGATGCACAGCACAG
XRCC3.18	PCR Touchdown	846pb	TGAATTTGACAGCCAGGCCT

			CAGTCTGTGGCCACCATCTT
XRCC3.19	PCR Touchdown	639pb	GGCTCCACTTTCTCATCCGA
			AGAACTGTGTTCCCAGGTGG
XRCC3.20	PCR Touchdown	563pb	TCTAGTAGTGTGGCCTGTGC
			ttactcagagcagtgcctgg

#### Anexo IV

Primers e parâmetros de ciclagem utilizados para estudo do gene *APEX1*

<b>Gene.mix</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Tamanho do <i>amplicon</i></b>	<b>Sequência dos primers</b>
APEX1.1	PCR Touchdown	850pb	CTGATCACGTGACCAGGT CC
			GCCACTGGGTGAGGTTTTC T
APEX1.2	PCR Touchdown	822pb	AGTAAGACGGCCGCAAAG AA
			GCTCCTGAAGTTCAGCTGG T
APEX1.3	PCR Touchdown	839pb	AGACTGTTTAACCCGTGCG T
			AGTAATCAAGGCGCCAAC CA
APEX1.4	PCR Touchdown	540pb	GGGGAATTACTGCAGGCT GT
			AATGTGTAGCCCCACGAA GG



## Anexo V

Primers e parâmetros de ciclagem utilizados para estudo do gene *XRCCI*

<b>Gene.mix</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Tamanho do <i>amplicon</i></b>	<b>Sequência dos primers</b>
XRCC1.1	1 <sup>a</sup> condição	784pb	GCTGAGGAGTTCGAGACCA G
			tccctcacgtctccaacc
XRCC1.2	1 <sup>a</sup> condição	827pb	AAGCCCACGACGTTGACAT
			gctgaggaaactggaacca
XRCC1.3	1 <sup>a</sup> condição	770pb	agtccaggatgaccacagga
			gggataacagagcctgcctc
XRCC1.4	1 <sup>a</sup> condição	789pb	tcagtcgctgcttacacac
			ctttggctgcagttgggag
XRCC1.5	PCR Touchdown	818pb	cacttggctttgtgctccc
			caacatttgggaggccaagg
XRCC1.6	1 <sup>a</sup> condição	802pb	ctcatgcctcagccttctga
			tctgcaactgacaactcccc
XRCC1.7	1 <sup>a</sup> condição	817pb	gaggcagttggggatcacat
			agtcccaccctgttacctca

XRCC1.8	1ª condição	842pb	acagcaaggaggccagtatg
			ggctaagcccatgtggtaa
XRCC1.9	1ª condição	762pb	tcgatcttaccacatggggc
			gctgaggcaagagaaccact
XRCC1.10	PCR Touchdown	810pb	tgttctggctggagtgaat
			ctcaggaagctgcctcaaaa
XRCC1.11	PCR Touchdown	827pb	acagagccacaaagacctgg
			ctgacctcgtgatccacctg
XRCC1.12	PCR Touchdown	814pb	caattgcatttcattggccgg
			tgcaatctcagctcactgca
XRCC1.13	PCR Touchdown	754pb	aaaaattagccgggggtggt
			ttagttgggcatggtggcat
XRCC1.14	PCR Touchdown	786pb	tcgtgcctcagtctcctga
			aggcaggcagatcacttgag
XRCC1.15	PCR Touchdown	820pb	agtgattctctggcctcagc
			acagatggggaaactgaggc
XRCC1.16	PCR Touchdown	761pb	gacagtgtttgcagtcagg
			aggctgaggcaggagaattg

XRCC1.17	1 <sup>a</sup> condição	809pb	tggagtgcagtggtgatc
			aggccaagaacagtgtctgg
XRCC1.18	1 <sup>a</sup> condição	832pb	ccaggatcacacagcaggaa
			cctgggctcatgagatgtcc
XRCC1.19	PCR Touchdown	794pb	gttcaccatgttgccagg
			ggatcacttgaggctgggag
XRCC1.20	1 <sup>a</sup> condição	820pb	gtatgtccaccatgccttg
			caagtgtcctgcctccagt
XRCC1.21	1 <sup>a</sup> condição	760pb	ggcccaggtaccttgagag
			tcaattctgtgagggggcac
XRCC1.22	1 <sup>a</sup> condição	774pb	ggcgcgatgcattcattca
			ggaagcaggcgttagagtga
XRCC1.23	1 <sup>a</sup> condição	848pb	cctgttcctctggaggctc
			ggtaggccaagtgtcatca
XRCC1.24	PCR Touchdown	847pb	gtctcaaactcctgggctca
			gaggctgaggctggagaatc
XRCC1.25	1 <sup>a</sup> condição	850pb	cccggccctttctgtatct
			cacacagcagctcacatgtg

XRCC1.26	PCR Touchdown	758pb	gtttcactgtgtgccagg
			atcgttgtacctgggaggc
XRCC1.27	PCR Touchdown	783pb	ggagccttccttcctccat
			tcacgaggtcaggagatcga
XRCC1.28	PCR Touchdown	787pb	tctattgccaggctggagtg
			gaaaaaccaagctgaggcc
XRCC1.29	PCR Touchdown	797pb	caaatgatccgcctgcctg
			ttaatctccgggcaaggacc
XRCC1.30	1ª condição	774pb	ctgggatcagcaccatgaca
			ggaactttcccggcagagaa
XRCC1.31	1ª condição	766pb	cttccgctgactcacctgt
			ccgattcccctctgagatgc
XRCC1.32	1ª condição	767pb	ccatgggattatggggaggc
			tggetccttcctctcatga
XRCC1.33	1ª condição	822pb	gccagactcagagttagggc
			GCATAGCTAGGTCCTGCTG G
XRCC1.34	1ª condição	809pb	CCAGCAGGACCTAGCTATG C

			GCTGGCActggagaagaca
XRCC1.35	1 <sup>a</sup> condição	813pb	TGCCAGCTCCA ACTCGTAC
			ctgggaccacctgtgttctc
XRCC1.36	1 <sup>a</sup> condição	834pb	tctggaggggagtcagactg
			ttgccctgtgtaagctcag
XRCC1.37	1 <sup>a</sup> condição	806pb	ttcaggctgaacagaggcag
			cttctgttctctgaggccc
XRCC1.38	1 <sup>a</sup> condição	757pb	agaaggttgatgggggcag
			cacttcaacccttctccc
XRCC1.39	PCR Touchdown	761pb	gaggctgaggcaggagaatc
			gacacaaactgcggaagg
XRCC1.40	PCR Touchdown	727pb	ggggattggcagggtcata
			caacagtagcaggttccgt
XRCC1.41	PCR Touchdown	714pb	gctctcacttcccagaagg
			gatagagtgcagtggcgtga
XRCC1.42	PCR Touchdown	809pb	gcacatgcctgtaatcgag
			acageggactcatgtcatcc
XRCC1.43	PCR Touchdown	838pb	TCCAGCAGTGAGGAGGATG A

			agctcagtcfaatgcaaggct
XRCC1.44	PCR Touchdown	744pb	ggactcctggatcagaggga
			cctcaccctgacgtgaaaa
XRCC1.45	PCR Touchdown	815pb	tctccaggcttgttcttt
			tctcactatgtgcccagge
XRCC1.46	PCR Touchdown	701pb	tgacgtttcagcctggact
			aaacaggagtgacgaggctg
XRCC1.47	PCR Touchdown	816pb	accaaccaaccaaccaact
			CTCCTCAAAGCTGGGATCC C
XRCC1.48	PCR Touchdown	743pb	cgtcagtgctgattccctga
			aaaacctggaggaaaggca

## Anexo VI

Primers e parâmetros de ciclagem utilizados para estudo do gene *RAD51*

<b>Gene.mix</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Tamanho do <i>amplicon</i></b>	<b>Sequência dos primers</b>
RAD51.1	PCR Touchdown	773pb	tgtaaactcgcgcaggatca
			acactgttttggaatcggag
RAD51.2	PCR Touchdown	814pb	gagatcagagcgggttagcc
			acctcccaggctagatcctc
RAD51.3	PCR Touchdown	838pb	gaggatctagcctgggaggt
			cagcctgaccaacatggaga
RAD51.4	PCR Touchdown	792pb	tggtcaggctggtcttgaac
			gagaggttggtcaacaggca
RAD51.5	PCR Touchdown	756pb	tgctgttgaccaacctctc
			GAAATGGGTTGTGGGCCAAA
RAD51.6	Condição 1	840pb	AGAAAGCTTTGGCCCACAAC
			ccaggccgctataattcca
RAD51.7	Condição 1	775pb	tgggaattatagcggcctgg
			gagcactatcttggcctgtca
RAD51.8	Condição 1	775pb	tgacaggccaagatagtctc

			TTAGCTCCTTCTTTGGCGCA
RAD51.9	Condição 1	817pb	ttcattgcagCAGTGTGGC
			ggaggggtgcagtagaccaag
RAD51.10	PCR Touchdown	759pb	tggagtgcaatagcgtgatct
			gcagagccaaaattgcacca
RAD51.11	Condição 1	766pb	tttgaggcagagtgtcgct
			accagcctggccaattcata
RAD51.12	Condição 1	773pb	atccttcagagtcctggga
			accactgcactccaacgtaa
RAD51.13	Condição 1	790pb	cctccaactcctggctcaaa
			tcaactgaatctgggaggcg
RAD51.14	Condição 1	760pb	cgctcccagattcaagtga
			tcaaccgcagactgtatccc
RAD51.15	Condição 1	762pb	tggggaagtagccatggaga
			TGCCTCAGCctgggaaaaat
RAD51.16	PCR Touchdown	751pb	cacccggccgatctataat
			tcacagcaacctccgtcttc
RAD51.17	Condição 1	766pb	atcacctgaggctgggagt



			ggatggcttgagctcaggat
RAD51.18	Condição 1	790pb	gagtcggggcatcactcatt
			agtgatggatcaggaggt
RAD51.19	Condição 1	781pb	agtagctgcaatgacaggca
			gtgacacagtgagacctgt
RAD51.20	Condição 1	837pb	acctggccttatttcagct
			aggaaaaggcctgtagcaa
RAD51.21	PCR Touchdown	850pb	gagctgtgggctatagct
			gcccagccaaactctgatc
RAD51.22	Condição 1	819pb	cccagcctccatcttctc
			cttgaccaggctggaatgc
RAD51.23	PCR Touchdown	771pb	gaggcaggagaatcgcttga
			atctcccactttgcttcc
RAD51.24	PCR Touchdown	826pb	ttgggaagccaaagtggga
			ctccacctccaagtagctg
RAD51.25	Condição 1	792pb	cagctactgggaggtggag
			cccatggcagaagtgggtat
RAD51.26	Condição 1	819pb	tgccatggaccaactcttc

			gccaacacagcaagaccttg
RAD51.27	Condição 1	773pb	tgccaccaacacagctaata
			ccccctcagctctttctcc
RAD51.28	Condição 1	831pb	ggaagaaagagctgaggggg
			tggaactcctgggtcaagc
RAD51.29	Condição 1	751pb	tgctgaaccaggagtcc
			ggacaagctcccaggtaag
RAD51.30	Condição 1	811pb	agcatgcaatccatcccat
			atcactgaaacctgggaggc
RAD51.31	PCR Touchdown	835pb	tgatatcgctcactgcacc
			cgggttcaaggattctcct
RAD51.32	PCR Touchdown	762pb	gtggtgcatgcctgaaatcc
			caccacacctggccagtaata
RAD51.33	PCR Touchdown	779pb	attactggccagggtgtgtg
			tctccaaggcaaagggaata
RAD51.34	PCR Touchdown	753pb	gcagtccagttctgacagga
			gcactttggaagtcaaggc
RAD51.35	PCR Touchdown	801pb	gtgatccacctgccttgact

			gcagggcctctgatacatgt
RAD51.36	Condição 1	811pb	acatgtatcagaggcctgc
			ccacagtacctggccaagaa
RAD51.37	Condição 1	840pb	gcatggcaaaacctgtctc
			gctggaaatggaactgctgg
RAD51.38	Condição 1	801pb	ccagcagttccattccagc
			attcatgctgctgtgcaacc
RAD51.39	Condição 1	762pb	gggagactggggagtgttg
			ttgcaaagagaccaccgttg
RAD51.40	Condição 1	763pb	caacggtggtctctttgcaa
			aggcaggtccaactgagt
RAD51.41	Condição 1	799pb	actcaagttgaacctgcct
			aggttgaggcaggagaatgg
RAD51.42	PCR Touchdown	812pb	ttacaggcacaccaccaa
			ggaggccttgacatttca
RAD51.43	PCR Touchdown	825pb	aattttgccgtgccctgtt
			agccaatatcacgccactgt
RAD51.44	PCR Touchdown	783pb	agtctaggttaggccagga

			cctctgtgcttaggetccag
RAD51.45	PCR Touchdown	786pb	gaggcggacttgcaatgag
			acactgatatggctgggcg
RAD51.46	PCR Touchdown	778pb	ccaaccggctacatttgt
			tcataatccgccaccttgg
RAD51.47	PCR Touchdown	753pb	ggggtttggcatgttgacc
			TGCTTGATAAAGGAGCTGGG T
RAD51.48	PCR Touchdown	842pb	TCAACACAGACCACCAGACC
			GAAACCTGGCCAAGTGCATC
RAD51.49	PCR Touchdown	771pb	CCGCCCTTTACAGAACAGAC T
			ttctggcctcaaaccatcc
RAD51.50	PCR Touchdown	782pb	ctttgggaggccaaggtgat
			agacacagaccaaagcacca
RAD51.51	PCR Touchdown	686pb	ggacaatccactgagagggg
			AGAAGGGTCAGGTCTCTCCA
RAD51.52	PCR Touchdown	733pb	TGGAGAGACCTGACCCTTCT
			gcaacagaaactgatcacc

## Anexo VII

Primers e parâmetros de ciclagem utilizados para estudo do gene *XPA*

<b>Gene.mix</b>	<b>Parâmetros</b>	<b>Tamanho do <i>amplicon</i></b>	<b>Sequência dos primers</b>
XPA.1	Condição 1	796pb	CAGGCGCTCTCACTCAGAAA ACGGGAAGCTCATGAGAAGC
XPA.2	Condição 1	763pb	CTCAGCTGTCCCGGAAAGAG GTCTGACTCTAGCGTGCCTC
XPA.3	Condição 1	780pb	GAGGCACGCTAGAGTCAGAC TCCCCTTCTCTGGCCTCAAT
XPA.4	Condição 1	795pb	ATTGAGGCCAGAGAAGGGGA TCCAAACGGCCAAAAGCAC
XPA.5	Condição 1	800pb	GTGCTTTTTGGCCGTTTGGA TGAAGCCTCCTCCTGTGTCA
XPA.6	PCR Touchdown	750pb	TTGACACAGGAGGAGGCTTC TCAAAGCAGAGCAACCACCT
XPA.7	Condição 1	811pb	AGGTGGTTGCTCTGCTTTGA GAGGCTGAGGCAGGAGAATC
XPA.8	PCR Touchdown	814pb	AGGAGGTAAGGGAAGGCAGT

			TCAATTAGCTGGGTGACGGG
XPA.9	Condição 1	824pb	TCATGGGCACAAGCGATTCT
			CGGCCCTCTTCCACTTTTA
XPA.10	Condição 1	819pb	TAAAAGTGGAAGAGGGGCCG
			GGGCTGTGTTTCCTTTCTGGA
XPA.11	PCR Touchdown	839pb	TGTGAGAAGCCACCATTGCT
			GAACCATCGGCATCCTTCCT
XPA.12	Condição 1	778pb	ACCCAGCCCTAATGATCCCT
			TCTCCCCATCTCGAGGTCTT
XPA.13	Condição 1	829pb	AAGACCTCGAGATGGGGAGA
			GGACCTTGCAAGCAATGGTG
XPA.14	Condição 1	850pb	CACCATTGCTTGCAAGGTCC
			CAGAAGGCTGAGGTGGAAGG
XPA.15	Condição 1	800pb	GGCCCTGTTTCCTTACCCTC
			CTGAGACATCACGTTTTCCGC
XPA.16	PCR Touchdown	797pb	GCGGAAAACGTGATGTCTCAG
			TCCTGTCGGACTTCCTTTGC
XPA.17	Condição 1	750pb	GCAAAGGAAGTCCGACAGGA

			CCTGGCACATAGCTGACACT
XPA.18	Condição 1	735pb	AGTGTCAGCTATGTGCCAGG
			ACAAAGCCATGAATGTGTGCC
XPA.19	Condição 1	775pb	GCGAAAGGGAGGACAGAGTG
			CACACTGACCTCTCTGCACA
XPA.20	Condição 1	811pb	TGTGCAGAGAGGTCAGTGTG
			CCAGCTGAACGTTCCCATCT
XPA.21	PCR Touchdown	838pb	AGATGGGAACG TTCAGCTGG
			CCTACGCAGTACTGAAGGCC
XPA.22	Condição 1	711pb	GGCCAATGGAACTAGGAGGT
			GGGTTTCACTCTTGTTGCC
XPA.23	Condição 1	817pb	GGGCAACAAGAGTGAAACCC
			GAAGGGGATTCTACTGGGCA
XPA.24	Condição 1	789pb	GCCCAGTAGAATCCCCTTCA
			ACTGGTTCTAGCAAGCACCA
XPA.25	Condição 1	745pb	GCTGGTTGGATGCAGGGTAT
			GACATAAGGCTGGGCATGGT
XPA.26	PCR Touchdown	764pb	TATTGGCCAAGCTGGTCTCG

			CCTGAGCCTGGGAGTTCAAG
XPA.27	Condição 1	713pb	ACTGCAGGCTCAAACCTCCTC
			TCTGGAATGCCCTCCTTCCT
XPA.28	PCR Touchdown	742pb	GGCATCTGTGGAGTTCTGGT
			ACTGTGAAGCCAGGACACTG
XPA.29	Condição 1	747pb	CAGTGTCTGGCTTCACAGT
			TCGTCTCCCTTTTCCACACG
XPA.30	Condição 1	705pb	AGCAGTAAGAAGCAGCGTGT
			CCCACAATAGAGGCCCCAAG