

LIGIA PEREIRA CASTRO

Caracterização genotípica de pacientes brasileiros  
com deficiência em processos de reparo de DNA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para  
obtenção de Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2016

LIGIA PEREIRA CASTRO

Caracterização genotípica de pacientes brasileiros com  
deficiência em processos de reparo de DNA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção  
de Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

Co-Orientação: Dra. Veridiana Munford

Versão original

São Paulo

2016

**CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**  
**Serviço de Biblioteca e informação Biomédica**  
**do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)**

Castro, Lígia

Caracterização genotípica de pacientes brasileiros com deficiência em processos de reparo de DNA / Lígia Castro; orientador Carlos Menck; coorientador Veridiana Munford. -- São Paulo, 2016.

102 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Mutações em genes de reparo de DNA. 2. Efeito fundador. 3. XP-V. 4. Cisplatina. I. Menck, Carlos, orientador. II. Munford, Veridiana, coorientador. III. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
**Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas**

---

**Candidato(a):**            Ligia Pereira Castro

**Título da Tese:**        Caracterização genotípica de pacientes brasileiros com deficiência em processos de reparo de DNA

**Orientador(a):**        Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

**Examinador(a):**        Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**Examinador(a):**        Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**Examinador(a):**        Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**Examinador(a):**        Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**Presidente:**            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405  
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 19 de abril de 2012.

**PARECER 1044/CEP**

A Comissão de *Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 18.04.2012, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Caracterização fenotípica e genotípica de células de pacientes xeroderma pigmentosum brasileiros no estado de Goiás*" dos autores Prof. **CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK** e a aluna **LÍGIA PEREIRA CASTRO**.

*Informa ainda, que seu projeto será regularizado junto a Plataforma Brasil, assim que a CONEP liberar o acesso ao sistema.*

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **18.03.2013**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO M.A. ZANOTTO**  
Coordenador da Comissão de Ética em  
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico aos meus pais, pelo amor, paciência e apoio  
incondicional aos meus estudos.

Às minhas irmãs, pelo carinho e apoio emocional,  
mesmo quando longe fisicamente.

À memória da Filó

## AGRADECIMENTOS

Então essa hora chegou! É o fim, que começa no começo. Quero desfrutar desse momento, a parte mais divertida da escrita dessa tese, com a liberdade em escrever o que quiser, sem nenhum motivo científico, ou qualquer outra racionalidade que nos engessa. Comecei a escrevê-la algumas vezes e o choro não deixou continuar, mas agora vai!

Aliás, “Agora vai!” foi uma frase que disse/escrevi muito nesses cinco anos de Laboratório de Reparo de DNA, foi nome de muitos arquivos de resultados felizes ou infelizes, assim como, foi frase do início do dia ao começar empolga com algum experimento. Entrei nesse mundo ainda na faculdade e, assim como uma criança começa a vida, fui aprendendo a engatinhar e caminhar nesse chão. Fiz muitas “caixinhas” que foram motivos de muitas risadas e muita vergonha, mas aos poucos a gente foi aprendendo a deixar a vergonha de lado e a fazer “caixinhas” sem vergonha mesmo na frente do chefe.

Caixinhas a parte, ainda olhando para trás, esses cinco anos de Laboratório de Reparo me fizeram outra pessoa. E à essa mudança, tanto profissional, quanto pessoal, venho agradecer a todos que fizeram parte dessa minha história, que me fizeram enxergar e descobrir a vida de diversas formas. Primeiramente, ao meu primeiro orientador dentro do laboratório, Prof. Dr. Helotônio Carvalho (Helots), que me aguentou no início fazendo todas as peripécias de IC e com muita paciência e risada foi me ensinando os primeiros passos. Depois de um ano o Helots teve que partir, logo depois a Ju, o Teiti, em seguida a Débora, depois a bebe Ca, a Eliza, a Maria Helena, a Marinas, a Lelê, o Léo, o Alê, a Annabel, e pôr fim a Clariss. À toda essa cavalaria genial que me recebeu no lab, as pessoas que estavam ali presentes todos os dias, rindo, chorando e me dando força para tentar mais uma vez, serei eternamente grata. Eu vi um por um indo embora e aos poucos percebendo e sentindo toda a bagagem que esse mundo/essas pessoas me deram. No meio do caminho outras pessoas chegaram e fizeram parte dessa bagagem também: A Marioly, Nati, Lu, Ali, LiviaAline, Natalita, Gi, Val, enfim agradeço à toda “MulheradaLab” que me ajudaram e muito na finalização desse trabalho (não tem homem, porque parece que o Menck resolveu ter uma era de macho alfa sem concorrências). Brincadeira, não me esqueci dos homens não: do amiguinho Japa, do Vítor que foi embora logo cedo da vida acadêmica e resolveu ir ganhar

dinheiro, do Andrezão, do Apuã, a primeira pessoa com quem comecei a discutir o que era ciência e a vida no lab, dos Davis, do Edu e até do Matheus.

Fez parte desse meu mundo, muito mais intimamente do que de todos, minha co-orientadora Dra. Veridiana Munford. A Veri, foi a pessoa quem esteve ali presente, na alegria ou na tristeza desses meus cinco anos, quem acompanhou toda minha trajetória, sempre aberta para me ouvir, me dar rumo, dar bronca, tirar do rumo, discutir, acalmar e sem querer/querendo fazendo um papel de mãezona da vida fora e dentro do laboratório. Eu não sou a única, a Veri tem muitos filhos além dos biológicos!

Quero agradecer em especial à Susan e ao Tiago, do CEFAP que, com todo carinho, paciência e vontade, me colocaram no mundo de sequenciamento de nova geração. Me ajudaram tanto no preparo das amostras, quanto na análise dos dados quando o Tiago que me introduziu em um mundo à parte. O mundo da matrix, que graças a Huma Asif, esse mundo ficou menos distante de ser conquistado, quem me aguentou também com muita paciência, amor e carinho, indo à mesa dela com erros de comandos e muita ignorância no mundo da bioinformática.

Quero agradecer de coração ao Prof. Menck, pela confiança e paciência com o começo da minha vida científica, pela sabedoria em me fazer enxergar os dados de outra forma e por ter me dado liberdade no traçar dessa história que contarei para vocês na forma de tese.

Parece que uma hora a temporada acaba e o momento da escrita da tese é a hora em que se realiza que sua temporada acabou. Guardo um carinho enorme no peito por todos que fizeram parte dessa temporada e agradeço de coração por toda experiência desses últimos anos.

Por fim, porém não menos importante, muito pelo contrário, agradeço à minha mãe e ao meu pai. Descobri, depois de muita terapia, que no fundo os dois foram o motivo pelo qual entrei na vida acadêmica. Deles veio a vontade de entender o desconhecido e do gosto pelo questionamento. Agradeço, de certa forma, às vezes que minha mãe foi abrir a Barsa, e todos os livros ali presentes, para me explicar uma simples pergunta. A minha irmã Elisa, que despertou meu interesse pela biologia quando, todas as vezes que aprendia algo de novo na escola, vinha toda deslumbrada me explicar sobre a vida. A minha irmã Cecilia, quem esteve



ao meu lado para o que desse e viesse em São Paulo, me acompanhou, me guiou e me ensinou a viver sozinha nessa cidade enormemente assustadora. Sem eles nada disso teria acontecido.

Agradeço também as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo financiamento deste projeto e, claro, pela bolsa de concedida!

## RESUMO

Castro LP. Caracterização genotípica de pacientes brasileiros com deficiência em processos de reparo de DNA [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Mutações em genes da via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos estão associados a doenças genéticas raras, como xeroderma pigmentosum (XP), síndrome de Cockayne (CS) e tricotiodistrofia (TTD). Desde que essas doenças foram descritas, o estudo da genética e sua relação com as características clínicas que esses pacientes manifestam têm ajudado na compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de carcinogênese e morte celular. Este trabalho teve como objetivo identificar mutações responsáveis por essas síndromes em pacientes brasileiros. Inicialmente o projeto teve como foco o estudo da comunidade de Araras, no interior de Goiás, onde existe uma das maiores incidências de pacientes XP no mundo. Duas mutações foram identificadas no gene *POLH*, c.764+1G>A (intron 6) e c.C907T [p.R303X] (exon 8) associadas a dois efeitos fundadores independentes. Através do desenvolvimento de um teste específico para essas mutações, dezessete pacientes, entre 10 e 82 anos de idade, além de familiares, foram caracterizados geneticamente, apresentando uma grande heterogeneidade das manifestações clínicas com fenótipos brandos à extremamente agressivos. Através do desenvolvimento de painel genético para genes relacionados a reparo de DNA e sequenciamento de nova geração, este estudo se estendeu a mais dezesseis pacientes de todo o Brasil, incluindo outros grupos de complementação de XP, CS e TTD. Por fim, apresentamos o que se tem descrito atualmente de caracterização genética no Brasil, que somam um total de 80 pacientes. Ainda nesse contexto de caracterização molecular, o estudo do efeito das mutações nos introns 6 e 10 do gene *POLH*, mostrou que as trocas de nucleotídeos em sítio de *splicing* estão afetando o processamento do mRNA desse gene, que codifica a DNA polimerase eta (Pol eta). Finalmente, também avaliamos as respostas de células de pacientes XP-V (deficientes no gene *POLH*) ao tratamento com o agente genotóxico cisplatina. Foi possível observar que as linhagens deficientes em Pol eta são mais sensíveis aos danos induzidos pela cisplatina, encontram problemas na fase G1/S após tratamento com cisplatina e apresentam um aumento de estresse genotóxico, através da marcação *high-level* para histona H2AX fosforilada. Sendo assim, esperamos contribuir para avaliação genética de pacientes com síndromes com deficiências em reparo de DNA, buscando também entender como essas deficiências se relacionam com os fenótipos clínicos.

**Palavras-chave:** Mutações em genes de reparo de DNA. Xeroderma Pigmentosum. Síndrome de Cockayne. Tricotiodistrofia. XP-V. Cisplatina.

## ABSTRACT

Castro LP. Genotypic characterization of Brazilian patients with deficiency in DNA repair processes. [Ph.D. Thesis [Biotecnology]]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Mutations at DNA repair genes are associated with rare genetic diseases such as xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS) and Trichothiodystrophy (TTD). The road since these diseases had been described into the study of their genetics and the relationship with clinical symptoms has helped the understanding of mechanisms involved in carcinogenesis and cell death processes. This study aimed to identify mutations responsible for these syndromes in Brazilian patients. Initially the project focused on the study of Araras community in the state of Goiás, where we reported one of the densest known areas of XP patients. Two mutations were identified at the *POLH* gene, c.764 + 1G> A (intron 6) and c.C907T [p.R303X] (exon 8), associated with two independent founders effects. With the development of a specific assay for those mutations, seventeen XP patients, from 10 to 82 years old, and their relatives, were genetically characterized, with the patients carrying highly heterogeneous clinical symptoms, from mild to extremely aggressive phenotypes. With the development of a gene panel for DNA repair related genes and next generation sequencing, this study was extended to all over Brazil, including seventeen other patients with XP, CS and TTD phenotypes. We also present a list comprising 80 Brazilian patients genetically characterized for these syndromes. In the context of molecular characterization, we also studied the effects of intron 6 and intron 10 splicing site mutations, detected in XP-V patients, on the differential *POLH* mRNA processing, which normally encodes for DNA polymerase eta (Pol eta). Finally, we evaluated the responses of XP-V primary fibroblasts, from Brazilian patients, after treatment with the genotoxic agent cisplatin. We observed that Pol eta deficient cells were more sensitive to damage induced by cisplatin, as well as encountered problems in the S phase replication after treatment, and presented increased high-level fluorescence for a genotoxic stress marker, the phosphorylated histone H2AX. Therefore, we expect our work contributes to the genetic evaluation of patients with DNA repair deficient syndromes, also trying to understand how these deficiencies relate to clinical phenotypes.

**Keywords:** Mutations in DNA repair genes. Xeroderma pigmentosum. Cockayne syndrome. Trichothiodystrophy. XP-V. Cisplatin.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Esquema representando os passos das duas sub-vias do NER, GGR (reparo do genoma global) e TCR (reparo acoplado à transcrição). Essa via envolve basicamente o reconhecimento da lesão, abertura da dupla fita de DNA, excisão da região que contém a lesão e síntese de uma nova fita livre de erros. A versatilidade dessa via envolve o reconhecimento uma grande variedade de lesões capazes de distorcer a dupla fita de DNA. Adaptado de Menck e Munford 2014 (1).....28

**Figura 2** - Domínios de regulação da proteína Pol eta. Na porção N-Terminal, primeiros 432 aminoácidos, contendo o *core* catalítico *Finger, Palm e Thumb* (em vermelho escuro) e o domínio *Little finger* (LF). Na porção C-Terminal, últimos 281 aminoácidos, as sequências necessárias para interação com PCNA monoubiquitinado (em verde, PIP1-box 1 e 2), interação com a polimerase de translesão REV1 (RIR, *motif* 524-539), em preto (*motif* F1 483-484) região de interação com a subunidade POLD2 da polimerase replicativa Pol delta, domínio zinc-finger de interação com ubiquitina (UBZ) e recrutamento da Pol eta ao núcleo (NLS) (2-7).....34

**Figura 3** - Linha do tempo indicando os relatos de casos e os estudos moleculares de pacientes XP e CS. Em amarelo os trabalhos que apresentaram caracterização genética dos pacientes.....37

**Figura 4** - Localização e paisagem de Araras. (A) Localizada no estado de Goiás, centro do Brasil, com alta incidência de radiação solar durante todo o ano. (B) Percurso entre Goiânia, capital do Estado de Goiás, e Araras. De Goiânia à Faina são 200 Km, com estrada asfaltada, porém o trecho de 40 km entre Faina e Araras, a estrada é de terra, com muitas pontes quebradas, o que muitas vezes nos leva a preferir passar com o carro pelos córregos. É uma comunidade isolada, o que dificulta a chegada de assistência médica aos pacientes. (C) Vista aérea do vilarejo de Araras e (D e E) fotos da região. O isolamento preservou a paisagem e suas araras, o que deu nome à comunidade .....49

**Figura 5** - Arvore genealógica desenhada por Gleice Machado a partir das lembranças de Dona Clementina, na época a pessoa mais idosa da comunidade, de quem resgatou a memória de todos os casos de Xeroderma. Em asteriscos vermelhos estão indicados todos os indivíduos que têm, ou eventualmente tiveram, sintomas clínicos de XP (90)..... 50

**Figura 6** - Células de pacientes XP de Araras apresentam menor expressão da proteína Pol eta. Wester Blot para proteína Pol eta indicando ausência da proteína nas linhagens XP03GO e XP04GO e pequena expressão na linhagem XP06GO, como controle positivos utilizamos o extrato proteico dos fibroblastos proficientes em reparo, FHN, GO01 e GO07..... 52

**Figura 7** - Identificação das mutações associadas aos pacientes de Araras/Goiás. Sequenciamento dos fibroblastos primários dos pacientes de Araras: XP03GO, XP04GO (irmãs) e XP06GO (filho de GO01 e GO05). Parte do sequenciamento do exon 6 (I) e exon 8 (II) do gene POLH indicando as alterações em sítio de splicing c.764+1 G>A (intron 6) e c.907 C>T (exon 8), caracterizando uma parada de leitura na arginina 303 da proteína. Os pais, GO01 e GO05, do paciente XP06GO (homozigoto para o intron 6) são, heterozigotos, portadores do alelo mutado e as pacientes XP03GO e XP04GO heterozigotas compostas para as mutações no intron 6 e exon 8. Referência hg 19, POLH: NM\_006502 .....53

**Figura 8** - Coleta de amostra de saliva de pacientes e familiares para teste de diagnóstico molecular na comunidade de Araras.....54

**Figura 9** - Ensaio de genotipagem com sondas Taqman® específicas para as mutações do intron 6 (A) e exon 8 (B). O grupo em azul representa os pacientes homocigotos mutados, em verde heterocigotos e em vermelho, homocigotos para o alelo selvagem. O quadrado preto (canto inferior esquerdo) representa o controle negativo da reação. Este resultado é representativo do que foi observado em pelo menos 3 experimentos independentes. .... 54

**Figura 10** - Fotos de pacientes XP de Araras, GO. Fotos de doze, dos dezessete pacientes XP da comunidade de Araras. Em (a) XP06GO, (b) XP03GO e (c) XP04GO os pacientes cujas linhagens celulares foram estabelecidas em laboratório para os ensaios fenotípicos e caracterização genética. (d) XP39GO (e) XP52GO, (f) XP85GO, (g) XP88GO, os dois irmãos (h) XP56GO e (i) XP63GO, dentre os outros pacientes de Araras os dois são os que possuem maior fotossensibilidade e problemas oftalmológicos; (j) XP45GO, aos 41 anos possui um dos fenótipos mais ameno entre os pacientes; (k) XP11GO, com a pele bem clara, aos 66 anos já retirou diversas lesões no rosto incluindo uma cirurgia em que retirou parte do queixo e (l) XP78GO paciente de 32 anos cuja pele negra o protegeu dos efeitos do sol. De forma geral, os pacientes apresentam o fenótipo clássico de hiper e hipopigmentação da pele nas regiões expostas ao sol, incluindo xerosis, e um aumento na frequência de câncer de pele, principalmente BCC e SCB. Em nenhum dos casos foram observadas alterações neurológicas.... 59

**Figura 11** - Genealogia representando o grau de parentesco entre os pacientes e residentes de Araras. Quatro principais famílias de Araras: Família A (-III.2 e -III.3), que muito provavelmente introduziu a primeira e mais antiga mutação do intron 6 na comunidade, com os dois filhos, -III.2 e -III.3, que chegam à Araras de Portugal. Família B (-II.3, -II.4, -II.7 e -II.8). Família C (-II.5 e -II.6). Família D (0.25 e 0.26), de Hidrolândia, provável segundo efeito fundador da mutação no exon 8. Pacientes heterocigotos compostos para as mutações do intron 6 e do exon 8 só aparecem após miscigenação das duas famílias. As setas em vermelho indicam os pacientes que inicialmente foram estudados para determinação da mutação e ensaios fenotípicos. A geração zero é referente à geração da pessoa cujos relatos basearam a construção da genealogia, 0.21..... 62

**Figura 12** - Genealogia da família de pacientes negros residentes em Faina (GO). Segundo eles não há relação de ancestralidade conhecida entre as duas famílias. Os dois afetados (I.3, XP08GO e I.8, XP33GO) têm fenótipo mais ameno quando comparado aos outros pacientes XP. A pele negra é um fator protetor aos efeitos da radiação UV, assim como para os pacientes negros de Araras que, comparados àqueles de pele clara, são menos afetados..... 63

**Figura 13** - Identificação de mutações na família residente em Poços de Caldas, MG. Sequenciamento do DNA extraído de células do paciente de Poços de Caldas (MG), XP05MG, seus pais MG06 e MG07 e seu irmão MG08. (A) O eletroferograma corresponde ao sequenciamento do exon 11 do gene POLH. Para análise do sequenciamento utilizamos as ferramentas Phred, Phrap e Consed, tendo como

referência para alinhamento o genoma hg19. (B) Heredograma da família do paciente XP05MG evidenciando a herança autossômica recessiva do alelo mutado. Amostras de saliva dos pais e irmão foram enviadas ao laboratório para confirmação e genotipagem da alteração..... 64

**Figura 14** - Mapa da distribuição dos três alelos mutado, c.764+1 G>A (intron 6), c.907 C>T (exon 8) e c.1249-1 G>A (intron 10) no gene POLH no estado de Goiás. Foram identificados até o momento vinte pacientes XP-V em Goiás, 12 homozigotos para o alelo intron 6, cinco heterozigotos compostos para intron 6 e exon 8, um homozigoto para o exon 8 e dois homozigotos para o intron 10. O alelo intron 10 foi identificado inicialmente em um paciente de Poços de Caldas, Minas Gerais (XP05MG) ..... 66

**Figura 15** - A. Heredograma da família da paciente XP137GO (II.2), homozigota para p.Q216X no gene XPA e sua mãe GO138 (I.2), portadora da mutação. O pai da paciente é falecido e amostra do irmão não foi coletada B. Foto da mãe e filha, com estatura normal e leve hiperpigmentação da pele nas regiões mais expostas ao sol..... 71

**Figura 16** - Imagem do alinhamento na região da mutação c.C646T, p.Q216X, para a amostra afetada XP137GO (homozigota), e sua mãe, não afetada GO138 (heterozigota). As barras cinzas representam a leitura da região sequenciada..... 71

**Figura 17** - Foto do paciente XP141GO ao lado de sua esposa e filha. O paciente já fez muitas cirurgias para retirada de tumores..... 72

**Figura 18** - Imagem do alinhamento na região da mutação c.1108delG, p.E370fs, identificada na amostra do paciente XP141GO. Uma deleção em homozigose no gene XPC (exon 9). As barras cinzas representam a leitura da região sequenciada, em vermelho a posição da base excluída..... 73

**Figura 19** - Imagem do alinhamento na região das mutações c.G1969T [p.E657X] e c.2564delT [p.L855fs] da amostra XP01PE. A paciente é heterozigota composta para as alterações que codificam; uma parada de leitura no aminoácido 657 e deleção que altera o frame de leitura do mRNA do gene XPC. As barras cinzas representam a leitura da região sequenciada..... 74

**Figura 20** - Foto da paciente XP02TO. Em A e B foto de uma lesão da paciente na região da face e em C e D regiões expostas ao sol com hiper e hipopigmentação da pele, extremamente seca e fotossensível..... 75

**Figura 21** - Região conservada da proteína XPD (Uniprot, P18074), indicando a alteração no domínio helicase com provável alteração na função da proteína... ..... 76

**Figura 22** - Genealogia do paciente XP01RN (II.10) do Rio Grande do Norte. O paciente relata que seu irmão (II.8) também era XP, chegou a fazer quimioterapia e faleceu aos 26 anos de idade... ..... 77

**Figura 23** - Alinhamento do sequenciamento das amostras XP136GO e XP01RN na região do gene da POLH (chr6: g.43560580, c.C638G, p.S213X). Os dois pacientes, de Goiás e do Rio Grande do Norte, respectivamente, com a mesma mutação..... 78

**Figura 24** - A. Paciente XP140GO com fenótipo ameno apesar da pele bem clara e extremamente seca. B. Nuca do paciente, onde já havia retirado uma lesão anteriormente.....79

**Figura 25** - Níveis de expressão do mRNA de *POLH* em células humanas são afetados pelas mutações em introns. RT-PCR para análise da expressão relativa do gene *POLH* para as linhagens; AS405 (selvagem), GO01, XP04GO e XP06GO. O RNA total foi isolado das células, em seguida as amostras foram tratadas com DNase (Promega®) para síntese do cDNA. O cDNA foi submetido a reação de PCR em tempo real, utilizando o iniciador para a região de junção entre o exon 6 e 7. Para quantificação utilizou-se o método comparativo de Cts, normalizados pela expressão endógena do gene *GAPDH*. O experimento foi realizado pelo menos três vezes independentemente... 85

**Figura 26** - Aumento da expressão relativa do mRNA do gene *POLH* na linhagem XP05MG (XP-V), relativo ao controle AS405. As amostras foram analisadas como descrito na figura 6. Este resultado é representativo da média de 3 experimentos independentes..... 85

**Figura 27** - Quantidade de leituras de cada exon do mRNA do gene *POLH*, normalizadas pelo seu tamanho e por milhões de bases sequenciadas – RPKM (reads per kilobase per million mapped reads)..... 87

**Figura 28** - Análise do mRNA das amostras Gel de agarose 1% do PCR com o cDNA das amostras, controle (FHN) e XP-V; XP06GO (intron 6) e XP05MG (intron 10) para o gene *POLH* (2,2 kpb). Diferentes quantidades do volume total de PCR foram aplicadas para que se conseguisse visualizar as diferentes bandas de cada amostra; de 50µL da reação de PCR, aplicou-se 20 µL da amostra FHN, 40 µL da XP06GO e 5 µL da XP05MG..... 87

**Figura 29** - Mapa da distribuição dos pacientes descritos neste trabalho, XP (34), CS (2) e TDD (3) no Brasil. Os 34 pacientes XP estão distribuídos entre; 24 XP-V, 7 XP-C, 1 XP-A, 1 XPE e 1 XP-G, considerando os pacientes previamente caracterizados pelo nosso grupo de pesquisa, sendo; 3 pacientes XP-C de São Paulo (82), um paciente XP-G do Rio de Janeiro (103) e um XP-E de Manaus (Santiago et al., em preparação). Entre os pacientes CS e TDD, uma mutação em CSB e XPD (ERCC2), respectivamente..... 92

**Figura 30** - Efeito de cafeína na sensibilidade de células humanas, deficientes ou proficientes em XPV. Células XP-V são mais sensíveis a cisplatina. Efeito da cisplatina nas linhagens normais (FHN e GO01) e XP-V (XP865VI, XP06GO, XP04GO, XP88GO e XP05MG). Ensaio de viabilidade celular (XTT) após 72 h de tratamento com 5, 15 e 25 µM. Análise estatística realizada pelo método Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni, comparando todas as linhagens ao controle FHN, com  $p < 0.0001$ . O gráfico é resultado da média de quatro experimentos independentes... 98

**Figura 31** - Ensaio de viabilidade celular (XTT) após 72h de tratamento com 5 e 15 µM de cisplatina, com e sem cafeína (1mM), para avaliar o efeito do co-tratamento nas linhagens primárias controle, FHN e GO01 e XP-V; XP06GO e XP88GO. A análise estatística foi realizada utilizando o método Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni, comparando o tratamento de cada linhagem com e sem cafeína. O gráfico é resultado da média de dois experimentos independentes..... 99

**Figura 32** - Sensibilização de viabilidade de células XP-V irradiadas com luz UVC. Ensaio de viabilidade celular (XTT) para avaliar o efeito do co-tratamento de UVC e cafeína (72h) nas linhagens: GO01 (normal) e XP-V: XP05MG, XP06GO e XP88GO. Este gráfico representa dois experimentos independentes.....99

**Figura 33** - Cisplatina provoca bloqueio de fase S em células XP-V. Histogramas representativos mostrando o efeito do tratamento com cisplatina no ciclo celular das linhagens controle FHN e GO01 e linhagens XP-V; XP06GO, XP04GO, XP05MG e XP88GO. Após 24 h de tratamento com cisplatina (5 e 25  $\mu$ M), com e sem cafeína (1 mM) as células foram coletadas e marcadas com PI para análise por citometria de fluxo. Os histogramas são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes. As escalas dos eixos X e Y foram mantidas as mesmas para todos os histogramas.....100

**Figura 34** - Efeito de cisplatina na indução de gH2AX em células humanas. Histogramas representativos para imunomarcagem da histona H2AX fosforilada (gH2AX) detectadas por citometria de fluxo após 24h de tratamento com 5 e 25  $\mu$ M, com e sem cafeína (1 mM). As células marcadas com maior fluorescência comparadas à amostra não tratada foram consideradas positivas para a imunomarcagem para gH2AX. O círculo em azul representa a marcação *High-Level* da histona gH2AX fosforilada. Este experimento é representativo de 3 experimentos independentes .....101

**Figura 35** - Indução de gH2AX em altos níveis é maior em células XP-V tratadas com cisplatina. Gráfico da quantificação de células positivas para marcação com gH2AX. A. Quantificação total de células positivas para H2AX fosforilada. B. Quantificação da marcação *High-Level* da histona H2AX fosforilada. Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes sendo cada um em duplicata.....102



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Lista das Síndromes relacionadas a deficiências na via de NER e os genes em que já foram descritas mutações responsáveis pelas características clínicas dos pacientes.....	31
<b>Tabela 2</b> - Mutações de Pacientes XP e CS já publicadas no Brasil entre 2000 e 2015. São 16 pacientes estudados e 14 mutações descritas, sendo 11 não descritas anteriormente e 3 já descritas na literatura.....	40
<b>Tabela 3</b> - Linhagens utilizadas para estudo fenotípico e genotípico dos pacientes. A idade é referente ao momento da coleta da biópsia para estabelecimento da cultura de células.....	42
<b>Tabela 4</b> - Oligos usados para amplificação e sequenciamento dos onze exons do gene POLH (NM_006502), sendo o exon 11 subdividido em 4 conjuntos de iniciadores (87).....	43
<b>Tabela 5</b> - Informações gerais dos indivíduos dos quais foram coletadas biópsias para a caracterização genotípica dos pacientes de Araras.....	51
<b>Tabela 6</b> - Genótipo e características clínicas dos 17 pacientes residentes em Araras e regiões vizinhas.....	56
<b>Tabela 7</b> - Painel de genes de reparo para identificação de variantes genéticas em pacientes com deficiência em reparo de DNA.....	67
<b>Tabela 8</b> - Mutações candidatas para os fenótipos dos 17 pacientes estudados, sendo 13 XP, três TTD e 1 CS.....	69
<b>Tabela 9</b> - Variantes finais encontradas para amostra nos genes, ERCC2 (XPD), ERCC3 (XPB) e GTF2H5 (TTD) para amostra TTD02SP. ....	76
<b>Tabela 10</b> - Alterações encontradas no gene XPC do paciente XP140GO.....	79
<b>Tabela 11</b> - Variantes encontradas na paciente XP01BA com frequência alélica menor que 0,5.....	80

**Tabela 12** - Variantes encontradas para a amostra do paciente CS01RS. Dos prováveis genes responsáveis pelo fenótipo CS; ERCC6 (CSB), ERCC8 (CSA), ERCC2 (XPD), ERCC3 (XPB) e ERCC5 (XPG) e com frequência alélica menor que 0,5.....81

**Tabela 13** - Variantes não sinônimas e com frequência alélica menor e igual à 0,5 da amostra XP01TO.....82

**Tabela 14** - Variantes encontradas para os genes com fenótipo mais leve de XP.....84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**6-4 PP** - 6-4 pirimidina-pirimidona

**A, T, C, G** - Adenina, Timina, Citosina, Guanina

**AB** - solução de antibiótico/antimicótico

**ATM** - ataxia telangiectasia mutada

**ATR** - ataxia telangiectasia relacionada a Rad3

**cDNA** - DNA complementar

**Cispt** - cisplatina

**COFS** - cerebro-oculo-facial-skeletal syndrome (síndrome cérebro óculo facial esquelética)

**CPD** - dímeros de pirimidina ciclobutano

**CS** - síndrome de Cockayne

**CSA – CSB** - Grupo A ou B da Síndrome de Cockayne

**DMEM** - meio de Eagle modificado por Dulbecco

**DNA** - ácido desoxirribonucleico

**DNA-PK** - DNA-dependent protein kinase

**dNTPs** - desoxirribonucleotídeos fosfatados

**DSB** - double strand breaks (quebra dupla fita de DNA)

**dsDNA** - Dupla fita de DNA

**GAPDH** - gliceraldeído 6-fosfato desidrogenase

**GGR** - global genome repair (reparo do genoma global)

**HR** - homologous recombination (recombinação homóloga)

**ICL** - interstrand crosslink (ligação cruzada intercadeia)

**Kpb** - mil pares de base

**mRNA** - RNA mensageiro

**NER** - nucleotide excision repair (reparo por excisão de nucleotídeos)

**NHEJ** - non-homologous end joining (Reparo de Extremidades não Homólogas)

**PBS** - tampão fosfato salino

**PCNA** - antígeno nuclear de proliferação celular

**PCR** - reação em cadeia de polimerase

**PI** - propidium iodide (iodeto de propídeo)

**PI3K** - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

**Pt-G** – monoadutos de platina

**RNA** - ácido ribonucleico

**RPA** - proteína de replicação A

**RPM** - rotações por minuto

**RT-PCR** - transcrição reversa por reação de polimerase em cadeia

**SFB** - soro fetal bovino

**SSB** - single strand break (quebra de fita simples)

**TCR** - transcription coupled repair (reparo acoplado a transcrição)

**TFIIH** - fator de transcrição H da RNA polimerase II

**TLS** - translesion synthesis (síntese translesão)

**TTD** - tricotiodistrofia

**UDS** - Unscheduled DNA Synthesis (síntese de DNA não programada)

**UV** - luz ultravioleta

**UVSS** - UV-sensitive syndrome (síndrome UV-sensível)

**XP** - xeroderma pigmentoso

**XPA-XPG** - grupos de complementação de xeroderma pigmentosum A a G

**XTT** - sal tetrazolium

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>AMINOÁCIDO</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>LETRA</b>
Ácido aspártico	Asp	D
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

# Sumário

---

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS GERAIS.....</b>	<b>23</b>
1.1 INTRODUÇÃO GERAL .....	24
1.1.1 O DNA e sua estabilidade.....	25
1.1.2 O reparo por excisão de nucleotídeo – NER .....	26
1.1.3 Uma via de tolerância ao dano.....	31
1.2 OBJETIVOS GERAIS .....	35
<b>CAPÍTULO 2 - AS SÍNDROMES DE NER NO BRASIL .....</b>	<b>36</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
2.3.1 Cultura de células .....	42
2.3.2 Sequenciamento pelo método de Sanger.....	43
2.3.3 Extração de DNA de saliva .....	44
2.3.4 Ensaio de discriminação alélica .....	45
2.3.5 Genealogia.....	45
2.3.6 Análise do mRNA da Pol eta.....	46
2.3.7 Sequenciamento em larga escala (NGS) .....	46
2.3.7.1 Preparo da amostra.....	46
2.3.7.2 Análise dos dados de sequenciamento: identificação de variantes.....	47
2.4 RESULTADOS .....	49
2.4.1 História da descoberta de uma doença rara, não tão rara em Araras.....	49
2.4.2 Características clínicas e genótipo dos pacientes.....	51
2.4.3 Outra mutação, outro Estado e o mesmo gene.....	64
2.4.4 Caracterização genética de novos pacientes brasileiros .....	67
Paciente XP-A; XP137GO .....	70
Pacientes XP-C; XP141GO, XP01PE e XP02TO;.....	72
Paciente XP-D/TTD; TTD02SP.....	75
Pacientes XP-V; XP136GO e XP01RN .....	77
Pacientes com variantes de Patogenicidade Incerta (PI) .....	78
Paciente sem identificação da mutação.....	81
2.4.5 Efeito das mutações em sítio de splicing no mRNA do gene POLH, intron 6 e intron 10.....	84
2.4.6 RNA-Seq .....	86
2.4.7 PCR do gene POLH.....	87
2.5 DISCUSSÃO .....	88
<b>CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA CELULAR FRENTE AO DANO INDUZIDO POR CISPLATINA .....</b>	<b>94</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	95
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	96
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
3.3.1 Preparo e uso da cisplatina.....	96
3.3.2 Ensaio de viabilidade celular por XTT .....	96
3.3.3 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo .....	97
3.3.4 Imunomarcagem para gH2AX por citometria de fluxo.....	97
3.4 RESULTADOS .....	98
3.3.1 Sensibilidade das linhagens XP-V frente ao tratamento com cisplatina .....	98
Efeito na viabilidade Celular (XTT) .....	98

3.3.2 Efeito da cisplatina no ciclo celular .....	100
3.3.3 Efeito na fosforilação da histona gH2AX em células tratadas com cisplatina.....	101
3.4 DISCUSSÃO .....	103

**CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....** 106

4.1 CONCLUSÕES .....	107
4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	107

**REFERÊNCIAS.....** 110

**APÊNDICES.....** 118

**A** – Artigo aceito para publicação: *A genetic cluster of xeroderma pigmentosum variant patients with two different founder mutations. British Journal of Dermat.*

**B** – Tabela com características clínicas necessárias ao estudo de caracterização genética dos pacientes com deficiência em *NER*.

# CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS GERAIS

---



## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A doença Xeroderma Pigmentosum (XP) é uma síndrome genética rara em que os pacientes possuem uma alta predisposição ao câncer de pele, principalmente carcinoma e melanoma, induzido pela exposição à luz do sol, devido ao componente da radiação ultravioleta (UV). A incidência estimada da doença é de 1/1.000.000 nos EUA e Europa, em alguns lugares, no entanto, a incidência é mais alta devido a efeitos fundadores, tais como 1/100.000 no Japão e 1/50.000 na África do Norte e Oriente Médio (1). A síndrome foi originalmente documentada pelo dermatologista húngaro Moritz Kaposi e seu orientador austríaco Ferdinand von Hebra na Universidade de Viena (2). Neste trabalho a síndrome é descrita em 4 pacientes com Xeroderma ou, como denominaram, Síndrome da “pele de pergaminho”, em que descrevem; uma pigmentação atípica da pele, algumas lesões com caráter de fissura, além de seca, envelhecida e com pequenas veias dos olhos e da pele dilatadas (telangectasia).

Aos poucos as vias moleculares e os mecanismos de reparo de DNA envolvidos com a síndrome foram sendo elucidados. Em 1949 Albert Kelner e Renato Dulbecco descobrem que bacteriófagos eram capazes de sobreviver ao efeito da irradiação UV quando tratados com luz visível (3, 4). Esse efeito foi chamado de fotorreativação e atualmente sabe-se que essa é uma via de reparo de DNA, presente até mamíferos placentários, dependente de uma enzima chamada fotoliase, capaz de desfazer a ligação entre duas pirimidinas adjacentes, utilizando como energia um fóton de luz azul (350 a 450nm), e retornar a estrutura original da dupla hélice (5). Curiosamente, a descoberta foi acidental e os pesquisadores à descobriram quando as placas contendo bacteriófagos irradiados foram esquecidas ao lado de uma janela com passagem de luz visível. Nos dias seguintes o resultado inesperado de uma curva de sobrevivência maior que a observada até aquele momento (6). Somente em 1978 Sancar identifica e clona o gene da fotoliase (7).

Em 1963, Philip Hanawalt e seu aluno David Pettijohn demonstram em bactéria uma outra via de reparo independente da luz visível (8). Cinco anos mais tarde o pesquisador americano James Cleaver identifica que a síndrome XP estava diretamente relacionada à incapacidade das células destes pacientes em reparar lesões em seu DNA (9). Em seguida, constatou-se que células de pacientes XP, altamente sensíveis à luz UV, apresentam elevados níveis de mutagenicidade após irradiação, correlacionando, assim, o fenótipo celular, a

instabilidade gênica e o elevado índice de tumores de pele nos pacientes (10, 11). Além da alta frequência de tumores, cerca de 20 a 30% dos pacientes XP apresentam graves problemas neurológicos, caracterizados por morte neural prematura, progressiva deficiência intelectual mental ou mesmo problemas de desenvolvimento (12, 13).

### 1.1.1 O DNA e sua estabilidade

Como reconhecido por Francis Crick em 1978, 25 anos após reportar a estrutura química e física da molécula de DNA; *“We totally missed the possible role of ... [DNA] repair although ... I later came to realise that DNA is so precious that probably many distinct repair mechanisms would exist”* (14). Dado o alto grau de conservação de alguns mecanismos de reparo de DNA é de se ressaltar a grande importância da manutenção da integridade física e biológica dessa molécula (6, 15).

A estrutura química do DNA, em solução aquosa, está constantemente sendo “atacada” por agentes endógenos e exógenos (16). As bases nitrogenadas da dupla hélice podem sofrer, por exemplo, alterações espontâneas com desaminações, perdas de base e desemparelhamentos, ou ser atacada por radicais livres capazes de induzir lesões do tipo bases oxidadas. A radiação UV é um dos principais fatores externos capazes de causar importantes lesões no DNA e as principais lesões induzidas por este agente são os fotoprodutos CPD e 6-4PP, em que duas pirimidinas adjacente absorvem energia e se ligam covalentemente distorcendo a dupla fita (17).

Essas lesões, se não reparadas, podem comprometer o correto processamento das polimerases durante a replicação e transcrição, e desencadear importantes processos de carcinogênese, envelhecimento e morte celular (6, 12). Assim, apesar da grande quantidade diária de lesões, o DNA é uma macromolécula extremamente conservada e protegida. Além de estar empacotado, o que dificulta o acesso dessas moléculas reagirem com o DNA, “sequestradores” estão constantemente removendo essas ameaças. Somado a esses eventos, a evolução selecionou múltiplos e, muitas vezes redundantes, mecanismos de respostas aos danos induzidos no DNA (10).

### 1.1.2 O reparo por excisão de nucleotídeo – NER

Uma importante via é o reparo por excisão de nucleotídeos (NER do inglês *Nucleotide Excision Repair*), o qual remove lesões que distorcem a dupla hélice do DNA (15). Dentre os diversos mecanismos de reparo, o NER é um dos mais versáteis, pois reconhece uma grande variedade de lesões. A principal lesão reconhecida por esse mecanismo são os adutos induzidos pela radiação UV. Essa via de reparo envolve basicamente o reconhecimento, abertura e estabilização das proteínas de reparo no local da lesão, uma dupla incisão a 5' e a 3' da lesão, a remoção dos oligonucleotídeos contendo a lesão, a síntese de DNA na lacuna formada e ligação do DNA reparado.

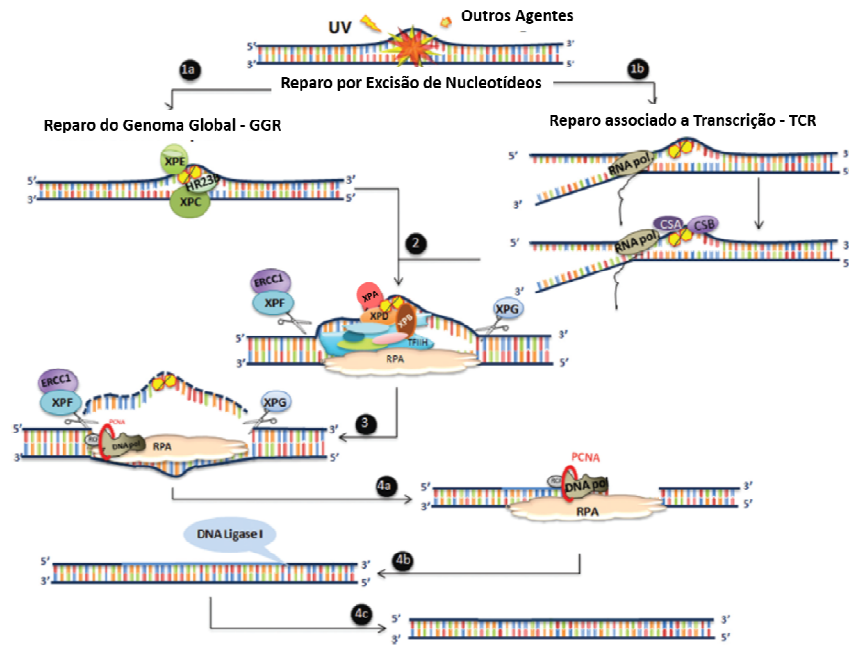
Todo esse mecanismo envolve cerca de 30 proteínas e promove a excisão de aproximadamente 30 pares de base englobando a região da lesão. O primeiro passo da via é o reconhecimento do local da lesão, o qual pode ocorrer em diferentes momentos na célula; durante o processo de transcrição (TCR) ou no genoma global (GGR), como mostra a figura 1.

A via TCR remove especificamente lesões da fita de DNA que está sendo transcrita. Devido ao impedimento físico da distorção causada pela lesão, a RNA pol II não consegue progredir na transcrição dos genes, o que sinaliza o recrutamento das proteínas da via de NER (18). Esse reparo deve ser imediato, caso contrário toda a maquinaria celular dependente dos genes à serem transcritos fica comprometida, o que pode desencadear o processo de senescência ou morte celular. Em seguida, as proteínas CSA (ERCC8) e CSB (ERCC6) são recrutadas para o local da lesão. A proteína CSB (168 kDa) é um membro da família SWIS/SNF ATPase DNA-Dependente, um grupo de proteínas associadas ao remodelamento de cromatina, transcrição e reparo (19). Assim, CSB está constantemente ligada à RNA polimerase durante a etapa de alongação da transcrição estimulando sua atividade e garantindo que o DNA esteja descompactado durante a transcrição do gene. Essa ligação se torna mais forte quando a polimerase não consegue continuar esse processo frente a um dano ativando a cascata da via TCR. Uma das hipóteses é que a forte interação de CSB à polimerase faz com que essa fique para trás (*backtracking*), deslocando-a e possibilitando o acesso das outras proteínas de reparo (20). Conforme a polimerase regressa na fita as proteínas RPA se ligam na fita simples de DNA evitando sua renaturação e sinalizando o recrutamento de outras proteínas como XPA para o local da lesão. CSB também sinaliza o recrutamento da proteína CSA para o núcleo. Essa proteína tem atividade de E3 ubiquitina

ligase com sete motivos WD40, importante para interação com outras proteínas e formação de um complexo multiproteico (DDB1, Culina4A e Roc1) (21).

Em contraste, a via GGR ocorre por todo o genoma da célula, incluindo a fita que não está sendo transcrita e é ativada quando o dímero DDB1-DDB2-CUL4A e o complexo proteico XPC-hHRB23B-CEN2 reconhecem a distorção na dupla fita (22). Uma das hipóteses é que a proteína XPC possui afinidade ao DNA com e sem lesão, porém no DNA com lesão essa afinidade é maior e o tempo de interação com o *motif*  $\beta$ -hairpin da proteína e os nucleotídeos alterados é o que estabiliza o complexo na região a ser reparada (23).

Apesar das diferentes formas de reconhecimento de cada via (TCR e GGR) os passos subsequentes convergem para uma via única com o mesmo *core* proteico, que envolve o recrutamento do fator de transcrição TFIIH. Associado à esse fator de transcrição, as DNA-helicases dependentes de ATP, XPB (3'-5') e XPD (5'-3') possuem um papel de desenrolar a dupla fita que fica recoberta pelas proteínas RPA (*Replication protein A*) evitando sua renaturação. Tanto RPA, quanto XPA então envolvidas na estabilização da "bolha" formada, processo que demanda gasto de energia para a célula a medida em que a abertura da região gera uma importante força de tração em toda dupla fita. XPA também é importante na sinalização de qual fita deverá ser excisada. Por fim, as endonucleases XPG e o complexo XPF/ERCC1 clivam respectivamente as regiões 3' e 5' da fita, as polimerases replicativas, Pol delta ou Pol épsilon sintetizam a fita nova e a DNA-ligase I ou II ligam o DNA sintetizado (12).



**Figura 1** - Esquema representando os passos das duas sub-vias do NER, GGR (reparo do genoma global) e TCR (reparo acoplado à transcrição). Essa via envolve basicamente o reconhecimento da lesão, abertura da dupla fita de DNA, excisão da região que contém a lesão e síntese de uma nova fita livre de erros. A versatilidade dessa via envolve o reconhecimento uma grande variedade de lesões capazes de distorcer a dupla fita de DNA. Adaptado de Menck e Munford 2014 (12).

Mutações na via de NER levam ao desenvolvimento de Síndromes genéticas raras como Xeroderma (descrita anteriormente), Cockayne (CS, do inglês *Cockayne Syndrome*) e Tricotodistrofia (TTD). Dentre os pacientes XP, diferentes grupos de complementação com deficiências nessa via foram identificados por fusão celular. Assim, células de pacientes com deficiências em proteínas da via clássica de XP fazem parte de sete grupos de complementação de A até G e um oitavo grupo, XP-Variante, que apesar de sintomas clínicos similares, apresentam essa via NER normal. A genética da doença envolve mutações nesses oito genes: *XPA*, *XPB* (*ERCC3*), *XPC*, *XPD* (*ERCC2*), *XPE* (*DDB2*), *XPF* (*ERCC4*), *XPG* (*ERCC5*) e *XPV* (*POLH*), com fenótipo que variam de leve; *XPC*, *XPE* e *XPV*, à mais graves que incluem graves sintomas de fotossensibilidade e neurodegeneração. De forma geral, esses pacientes possuem problemas relacionados ao aumento da frequência de câncer de pele, em até 10.000 vezes de não melanomas e 2.000 mil vezes de melanoma em pacientes com até 20 anos, dentre esses 25% desenvolvem problemas neurológicos (24). Deficiência na via de TCR, levam a síndromes relacionadas à graves problemas de desenvolvimento, envelhecimento precoce e neurodegeneração.

Pacientes CS têm como principal característica clínica que definem seu diagnóstico; retardo no crescimento e problemas neurológicos; outras manifestações muito comuns incluem a perda auditiva neurossensorial, catarata, retinopatia pigmentar, fotossensibilidade cutânea e cárie dentária (25). De acordo com a severidade do sintoma envolvido a síndrome foi dividida em quatro classificações; Tipo I; em que nos primeiros anos de vida o paciente tem um desenvolvimento normal, até que começam a surgir os problemas de neurodegeneração, deficiência intelectual, e envelhecimento precoce, com perda de peso, estatura, visão, audição, o sistema nervoso central e periférico começam a perder função, com expectativa de vida de cerca de vinte anos. Já CS do tipo II, envolve característica da síndrome Cérebro-óculo-facial-esquelético (COFS), incluindo grave microcefalia extrema, catarata congênita, dismorfismo facial, nanismo caquético e artrogripose (retenção da articulação em uma posição fixa), cujos sintomas são acometidos logo que a criança nasce com expectativa de vida de até dez anos de idade (26). Eles também apresentam uma falha de crescimento predominantemente pós-natal, um retardo psicomotor grave, com hipotonia axial e hipertonia periférica e dificuldades de alimentação neonatais. Do tipo III inclui os pacientes com fenótipo mais amenos. Alguns pacientes CS, além dos problemas de neurodegeneração e desenvolvimento possuem uma alta predisposição ao câncer de pele e são classificados como XP/CS, até o momento a genética desses pacientes envolveram mutações nos genes *XPB* (*ERCC3*), *XPD* (*ERCC2*), *XPG* (*ERCC5*), *CSA* (*ERCC8*) e *CSB* (*ERCC6*) (19).

Em 1981, Fujiwara e colaboradores descrevem uma paciente japonesa com uma nova síndrome, UVSS (do inglês, *UV-sensitive Syndrome*) com leve fotossensibilidade, porém sem desenvolver câncer de pele ou problemas neurológicos (27, 28). As células desses pacientes possuem alta sensibilidade a UV e problemas de reparo na via de TCR com redução nos níveis de *RNA synthesis recovery* após irradiadas (29-31). Atualmente a genética desses pacientes envolve mutações no gene *CSA* (*ERCC8*), *CSB* (*ERCC6*) e *UVSSA*, identificado recentemente (30, 32-34). Alguns estudos mostraram que essa proteína interage com vários componentes da via de TCR e CSB, envolvida na ubiquitinação e desfosforilação da RNA Pol II parada na forquilha de transcrição frente a um dano, assim como na estabilização de CSB no local da lesão (35). A estabilização é mediada pela interação de UVSSA com USP7, uma protease que remove ubiquitinas das proteínas, restabelecendo o estado hipofosforilado da RNA pol II, importante para o reestabelecimento de sua atividade transcricional (36, 37).

Bem diferente desse quadro clínico, a síndrome Tricotiodistrofia (TTD) tem como principal característica clínica a fragilidade do cabelo e das unhas. Descrita pela primeira vez em 1968, TTD é uma síndrome genética autossômica recessiva rara, em que os pacientes possuem problemas na formação de pontes de sulfetos, essencial para síntese de alguns aminoácidos que constituem o cabelo (38). Em função dessa deficiência os cabelos ficam quebradiços e ralos, e quando analisados por microscopia apresentam aspecto de “rabo de tigre” devido à ausência de cor em algumas regiões, sendo esse o diagnóstico clássico de TTD (39, 40). Além do cabelo de “tigre”, ao nascer os pacientes desenvolvem problemas de desenvolvimento, com baixa estatura, microcefalia, deficiência intelectual, possuem uma face característica com queixo recuado e orelhas grandes, displasia das unhas. Em alguns casos apresentam fotossensibilidade (porém sem desenvolver câncer de pele), ictioses, infertilidade, alta predisposição à doenças infecciosas, principalmente no trato gastrointestinal e respiratório (41).

O primeiro trabalho descrevendo a genética envolvida no fenótipo TTD foi publicado em 1986 por Stefanini e colaboradores, em que descreveram quatro pacientes Italianos com o fenótipo clássico, porém com alta fotossensibilidade (42). Nesse trabalho foi reportado um defeito na via de NER envolvendo a proteína mutada XPD (*ERCC2*). Em 1993 um estudo, do mesmo grupo, com 13 pacientes TTD identificou dez pacientes mutados em *ERCC2*, porém três não apresentaram nenhuma mutação nesse gene (43). Muitos outros casos do fenótipo sem ligação com mutações nesse gene trouxeram à literatura novos genes envolvidos com a síndrome.

Atualmente sabe-se que a genética envolvida nas características clínicas de TTD possui uma certa complexidade. Os principais genes envolvidos no fenótipo fazem parte da via de NER, *XPB (ERCC3)* (44), *XPD (ERCC2)* (45) e *GTF2H5 (TTD-A)* (46). As três proteínas fazem parte do complexo TFIIH, em uma via comum de GGR e TCR, e dependendo do local da mutação nesses genes e da função cujo local faz parte o fenótipo pode incluir características de XP, como fotossensibilidade, reportado em 20% dos casos TTD (43), ou sintomas misturados de XP e CS (XP/CS) envolvendo neurodegeneração e fotossensibilidade (47). Recentes descobertas têm introduzido na literatura outros genes envolvidos no fenótipo TTD, como o envolvimento dos genes *MPLKIP (TTDN1* ou *C7orf11)* (48) e *RNF113A (TTD5)*, ligado ao cromossomo X) (49).

A severidade dos sintomas dessas síndromes, tanto XP, quanto CS e TTD está diretamente relacionada à via deficiente envolvida. De forma geral, paciente com mutações em *XPA*, *ERCC3* (XP-B), *ERCC2* (XP-D) e *ERCC5* (XP-G) apresentam sintomas de fotossensibilidade e tumores cutâneos muito mais cedo quando comparados à paciente mutados em *XPC*, *DDB2* (XP-E) e *POLH* (XP-V). Os pacientes com sintomas clínicos mais severos representam cerca de 25% dos pacientes XP e são aqueles que normalmente desenvolvem problemas de neurodegeneração e desenvolvimento (33). A participação na via de NER da proteína mutada reflete *in vitro* a sensibilidade dessas células à radiação UV, assim como ao fenótipo clínico do paciente. Por exemplo, uma linhagem de paciente XP-C, proteína envolvida somente na via de GGR, é bem menos sensível à UV quando comparada à linhagem XP-A, deficiente em GGR e TCR e extremamente sensível. Essa relação também é observada na diferença de fenótipo entre esses pacientes em que XP-A possui um prognóstico clínico muito mais severo e uma menor expectativa de vida comparada à pacientes XP-C. A tabela 1 a seguir resume os genes mutados envolvidos em cada fenótipo, a principal característica clínica da síndrome e a via de NER afetada.

**Tabela 1 - Lista das Síndromes relacionadas a deficiências na via de NER e os genes em que já foram descritas mutações responsáveis pelas características clínicas dos pacientes.**

Diagnóstico Clínico	Gene mutado
Xeroderma	XPA
	XPB (ERCC3)
	XPC
	XPD (ERCC2)
	XPE (DDB2)
	XPF (ERCC4)
	XPG (ERCC5)
	XPV (POLH)
	Cockayne
Tricotodistrofia	XPB (ERCC3), XPD (ERCC2), TTD (GTF2H5), MPLKIP (TTDN1), RNF113A (TTD5)

### 1.1.3 Uma via de tolerância ao dano

Outro importante via é a síntese de translesão (TLS), uma via de tolerância ao dano essencial na manutenção da estabilidade genômica. Mutações no gene *POLH*, que codifica a proteína Pol eta, levam à síndrome XP-V. Relatada pela primeira vez em 1970, a síndrome foi descoberta em pacientes XP proficientes em NER (50). Em 1972, outros três casos de pacientes com a mesma forma variante de XP, em que a sensibilidade e o reparo induzidos



por UV eram as mesmas de uma linhagem normal, porém com dificuldades no processo mitótico pós replicação do DNA (51). Em 1975, sabendo do fato de que a cafeína estava envolvida no aumento da sensibilidade e mutagênese em *E. coli* (52), Lehmann e colaboradores, foram capazes de sensibilizar as linhagens variantes de XP após co-tratamento de UV e cafeína (53). A cafeína tem um efeito pleiotrópico na célula com ação na síntese de DNA, apoptose, condensação da cromatina e regulação do ciclo celular. O aumento de sensibilidade após co-tratamento UV e cafeína ocorre devido ao fato de que a cafeína inibe a fosforilação da quinase CDK1 que regulada o *check-point* de G2/M (54), porém os mecanismos dessa inibição ainda não foram completamente elucidados. Dessa forma, a célula com lesão no DNA não para no ciclo antes do processo mitótico, o que desencadeia aos processos de instabilidade genética e morte celular.

Entretanto, apenas em 1999 o gene responsável pela síndrome foi identificado e clonado, através da purificação da proteína Pol eta, de extratos de células HeLa, capaz de complementar o defeito das linhagens XP-V. Além de cloná-la, Masutani e colaboradores mostram que essa é uma polimerase da família Y de translesão, especializada em replicar o DNA com fotoprodutos induzidos por UV, inserindo corretamente duas adeninas frente a um dímero de timina (55). Em humanos os processos de tolerância ao dano (DDT, do inglês *DNA Damage Tolerance*) são catalisadas pelas cinco principais polimerases da família Y; Rev1, Pol eta ( $\eta$ ), Pol iota ( $\iota$ ), Pol Kappa ( $\kappa$ ) e da família B, Pol zeta ( $\zeta$ ) (56). Esse processo é chamado de síntese translesão (TLS) e o reparo da lesão é feito após a replicação do DNA, do inglês *postreplication repair*. Esse mecanismo evita o bloqueio prolongado da forquilha de replicação frente ao dano, o que pode desencadear o processo de apoptose, por exemplo, ou expor essa região a uma provável quebra da dupla fita de DNA, contribuindo, dessa forma, à morte celular (57).

Assim, a Pol eta é a principal polimerase da família Y responsável por inserir o primeiro nucleotídeo frente a um dímero de pirimidina (CPD) induzido por luz UV, replicando fielmente o DNA lesado. Na falta dessa proteína, a TLS é processada por outras polimerases, como a Pol iota, mais propensas à erros, portanto, mais mutagênicas, uma explicação para o fato de que pacientes XP-V possuem elevada incidência de câncer de pele (58, 59). Além do *bypass* de dímeros de pirimidina, a Pol eta está envolvida na translesão de danos induzidos pelo tratamento com cisplatina, um quimioterápico capaz de se ligar covalentemente ao DNA (60).

O gene *POLH* está localizado no cromossomo 6p21.1-6p12.3 contendo cerca de 40 kpb de DNA, divididos em 11 exons (Figura 2). O RNA mensageiro (mRNA) correspondente tem um tamanho de 3.464 pb (Genebank NM\_006502) com uma região de *Open Reading Frame* (ORF) de 2.139 pb, e a primeira metionina localizada no exon 2 (61). A isoforma canônica da proteína possui 713 aminoácidos (aa), em que o motivo de atividade catalítica se localiza inteiramente nos dez primeiros exons, 512 aa (N-terminal), contendo cinco motivos proteicos altamente conservados responsáveis pela sua atividade enzimática (62). Diferentemente do sítio catalítico das polimerases replicativas, as polimerases da família Y possuem os domínios *palm* and *thumb* menores e por isso o nucleotídeo consegue ser incorporado apesar da lesão (dímero de pirimidina) no DNA. Os três domínios *Finger*, *palm* e *thumb*, formam o *core* catalítico da proteína e funcionam como uma “garra” entre o DNA que está sendo replicado e os oligonucleotídeos que serão incorporados (63).

Na porção C-Terminal, codificada pela região do último exon, se localiza o sinal de localização nuclear (NLS), entre os aminoácidos 682-698, essencial na dinâmica de redistribuição da Pol eta quando recrutada (64). O domínio *zinc finger* de ligação ao domínio de ubiquitinação (UBZ) se localiza entre os aminoácidos 635-659, assim como o sítio de ligação à proteína de proliferação nuclear (PCNA), importante proteína acessória durante a replicação que ancora a polimerase replicativa ao DNA (65). Baldeck e colaboradores identificaram recentemente um novo domínio F1 (483-484), sendo essa uma região de interação com a subunidade POLD2 da polimerase replicativa Pol delta. Como essa é também uma subunidade do componente funcional da Pol zeta, outra polimerase da família Y de TLS, o grupo tem como hipótese que essa seja uma região importante para troca entre as polimerases de translesão, Pol eta de inserção, e a Pol zeta de extensão até que a polimerase replicativa delta retorne à duplicação do DNA (66).

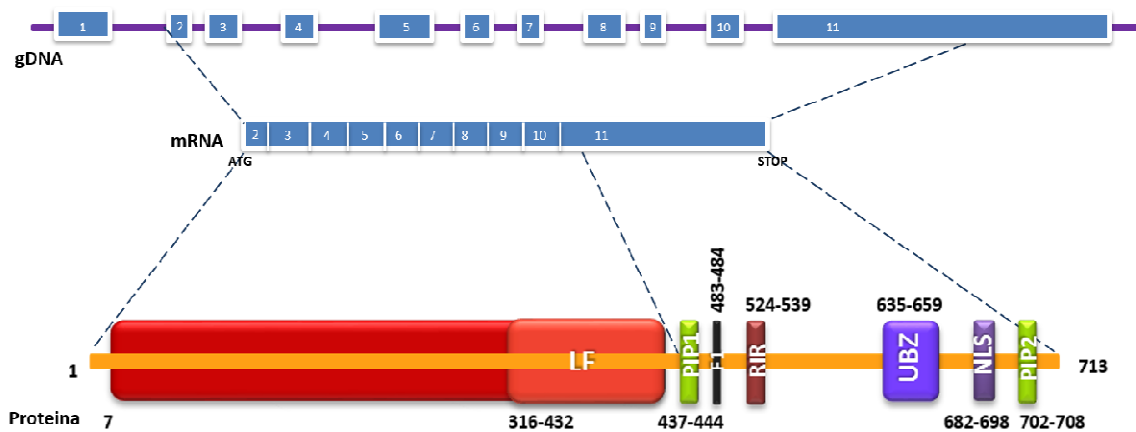


Figura 2 - Domínios de regulação da proteína Pol eta. Na porção N-Terminal, primeiros 432 aminoácidos, contendo o *core* catalítico *Finger, Palm e Thumb* (em vermelho escuro) e o domínio *Little finger* (LF). Na porção C-Terminal, últimos 281 aminoácidos, as sequências necessárias para interação com PCNA monoubiquitinado (em verde, PIP1-box 1 e 2), interação com a polimerase de translesão REV1 (RIR, *motif* 524-539), em preto (*motif* F1 483-484) região de interação com a subunidade POLD2 da polimerase replicativa Pol delta, domínio zinc-finger de interação com ubiquitina (UBZ) e recrutamento da Pol eta ao núcleo (NLS) (61, 62, 66-69).

Quando a polimerase replicativa encontra um impedimento físico para continuar a replicação, em função de um DNA-molde distorcido, a lisina 164 da proteína PCNA é monoubiquitinada pelas ubiquitinas ligases E2/E3 (Rad6/Rad18). Essa modificação pós-traducional promove o recrutamento das polimerases da família Y aumentando sua afinidade pela PCNA que interage com a Pol eta através dos domínios UBZ e PIP-box (68). Alguns trabalhos recentes mostram que a monoubiquitinação também regula negativamente a atividade da Pol eta durante a replicação do DNA sem lesão, em que alguns resíduos dos domínios UBZ e PIP-box são monoubiquitinados, inibindo sua interação com PCNA. Esse processo é *down*-regulado após indução de dano por UV ou cisplatina (65).

A síntese translesão é um processo feito por duas polimerases, em que a inserção dos nucleotídeos é feita por umas das polimerases da família Y e a extensão por mais alguns pares de base é feita principalmente pela Pol zeta da família B (54, 66). Após o *bypass* do dano, PCNA é desubiquitinado pela proteína USP7 para que a polimerase de alta fidelidade, Pol delta, continue o processo de replicação do DNA.

## 1.2 OBJETIVOS GERAIS

- Este trabalho visa identificar a distribuição das mutações encontradas nas células XP-V proveniente de Goiás (GO) e identificar as mutações responsáveis pelo fenótipo de pacientes de outras regiões do Brasil.
- Estudar o efeito das mutações em sítio de *splicing* no gene POLH, encontradas em pacientes brasileiros, no processamento do mRNA.
- Investigar o efeito do tratamento com cisplatina nos fibroblastos primários XP-V avaliando a sensibilidade, o efeito no ciclo celular e na fosforilação da histona H2AX.

## CAPÍTULO 2 - As Síndromes de NER no Brasil

---

## 2.1 INTRODUÇÃO

Após a descoberta e descrição das síndromes XP em 1878 por Hebra e Kaposi na Itália, de Cockayne em 1936 pelo pediatra Edward Alfred Cockayne na Inglaterra e TTD em 1968 por Pollit também na Inglaterra, relatos de casos e descrições de novos pacientes foram sendo publicados pelo mundo, principalmente na América do Norte, Europa, África e Japão. O acompanhamento de centenas de pacientes por décadas, e estudos com células desses, levou a compreensão do que se sabe atualmente sobre as vias moleculares e os defeitos genéticos envolvidos nos fenótipos dessas síndromes, assim como a compreensão da relação de causa e efeito das lesões no DNA e papel do reparo nos processos de mutagênese, carcinogênese e morte celular.

No Brasil os relatos de casos começaram a aparecer em 1995 com a descrição de dois pacientes CS em Pernambuco (PE), como mostra a retrospectiva da figura 3 a seguir. Medeiros e colaboradores descreveram os dois irmãos, um de sete anos e outro de 9 (falecido pouco tempo depois do estudo), os dois com diagnóstico clássico de CS com graves problemas de neurodegeneração e progeria (70).

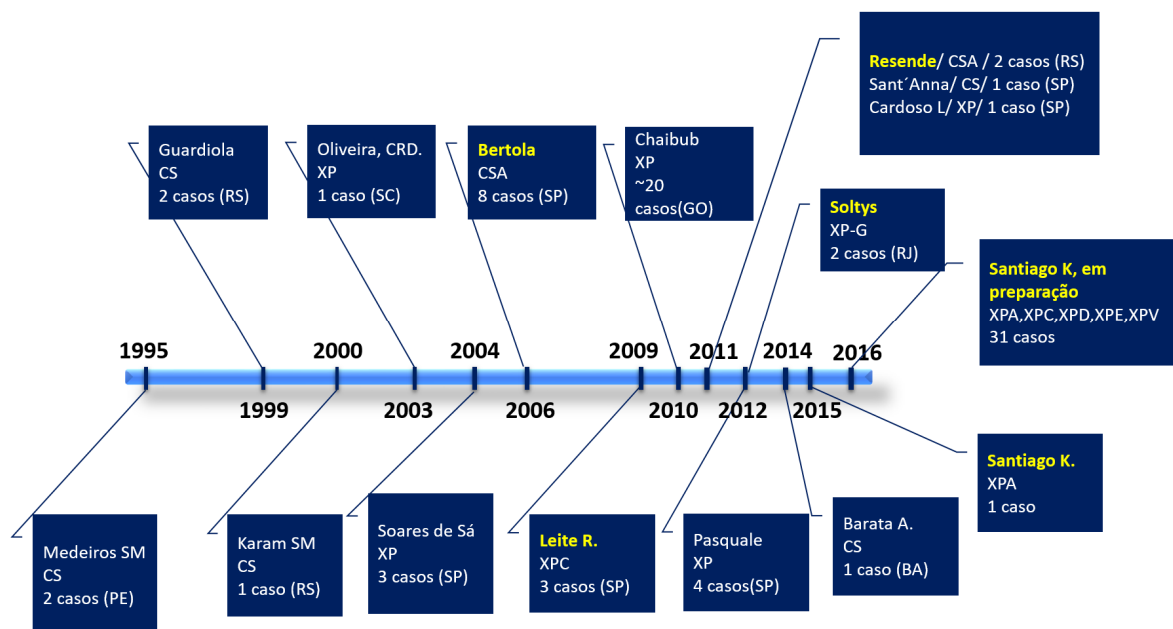


Figura 3 - Linha do tempo indicando os relatos de casos e os estudos moleculares de pacientes XP e CS. Em amarelo os trabalhos que apresentaram caracterização genética dos pacientes.

No estado do Rio Grande do Sul foram relatados dois trabalhos com pacientes CS: em 1999 o caso de uma criança de 3 anos, procedente de Eldorado do Sul (RS), foi descrita com graves problemas no desenvolvimento motor, hipotrofia muscular generalizada, deficiência intelectual, caquexia, microcefalia, convulsões e cefaleia (71). Em 2000, na cidade de Porto Alegre, uma criança com deficiência intelectual, envelhecimento precoce, surdez, problemas de cárie dentária, fotossensibilidade e entre 4-5 anos passou a ter convulsões. Filha de casamento consanguíneo de primeiro grau, a criança teve um irmão com os mesmos sintomas que faleceu aos 19 anos acamado. O ensaio de *RNA synthesis recovery* mostrou uma redução na síntese de RNA após irradiação com UV, o que confirmou molecularmente o diagnóstico clínico de CS (72).

Em seguida, dois trabalhos são publicados com pacientes do estado de São Paulo. Em 2006, um estudo no Hospital das Clínicas publicou oito casos de pacientes CS, todos com atraso de crescimento, problemas de desenvolvimento, microcefalia, caries dentárias, surdez, contratura muscular e sete deles com fotossensibilidade. Nesse trabalho cinco novas mutações foram identificadas no gene CSA (ERCC8); sendo quatro pacientes portadores de uma inserção no exon 4 do códon 104 (T104fs) que altera o quadro de leitura do mRNA, dois pacientes composto heterozigotos para essa mutação e uma alteração *missense* T204K, com dois pacientes homozigotos para outra alteração *missense* D266G e dois pacientes com mutações em sítio de splicing uma no intron 4, IVS4+1G>A e outra no intron 6, IVS7-1G>A (73). Em 2012, em Barueri (SP) outro relato de caso de uma criança de três anos com fotossensibilidade em regiões expostas ao sol, que começou aos seis meses, retardo psicomotor e deficiência intelectual, problemas dentários, atrofia óptica, surdez, perda gradativa da visão e microcefalia (74).

Ainda em 2012, dois novos casos em Porto Alegre (RS). Irmãos, uma menina de 8 anos e um menino de 13 anos, ambos com deficiência global do desenvolvimento, microcefalia, nanismo, face característica de CS (com ossos faciais proeminentes, microftalmia, olhos encovados, micrognatia e nariz fino), surdez e fotossensibilidade. A análise genética identificou duas alterações em sítio de *splicing* em CSA, uma no sítio doador do intron 7, G/A int7spl.donor; cDNA ins83; proteína Q228fs+X e outra no sítio aceptor do mesmo intron, G/A int7spl.acc; cDNA del 9nt; proteína del207-209 (75).

Em 2014, o último caso de CS relatado, um menino de 12 anos, nascido e criado em Salvador (BA) que procurou assistência médica com sintomas de fraqueza, tosse e recusa em se alimentar. A criança desenvolveu deficiência intelectual, não fala, não anda e interage socialmente somente com sorriso no rosto. Uma tomografia revelou atrofia cortical difusa, uma extensa calcificação cerebral e o espaço do líquido cefalorraquidiano aumentado (76).

Com relação ao que já foi descrito e caracterizado de XP no Brasil foram quatro relatos de caso (em 2003, 2004, 2011 e 2012) e três trabalhos de caracterização genética dos pacientes (em 2009, 2012 e 2015). Em 2003, em Santa Catarina, um relato de caso de uma criança de sete anos, com a face extremamente afetada por inúmeras cirurgias (77). Em 2004, Soares de Sá e colaboradores publicam um estudo de 20 anos de acompanhamento de pacientes, menores de 18 anos, com casos de câncer no Hospital do Câncer de São de São Paulo. Dentre esses pacientes três XP de 8, 16 e 17 anos com casos de melanoma nos membros, tronco, cabeça e pescoço (78). Em 2011, em Jundiaí, Pasquale relata 4 casos de pacientes XP extremamente afetados com um óbito durante a realização do estudo. A paciente que veio ao óbito em decorrência de complicações tumorais, dentre essas, uma neoplasia ginecológica devido a uma infecção por HPV, o que nos evidencia ao fato de que pacientes XP devem ser advertidos não somente com relação à proteção solar, mas também de infecções por HPV (79). Alguns estudos já mostraram que linhagens de células XP têm um aumento de instabilidade genômica e ficam extremamente mais sensíveis à morte induzida por UV ou por quimioterápicos como cisplatina quando transformadas por HPV (80). Ainda em São Paulo, em 2012, Cardoso e colaboradores, da Universidade de Bauru, publicam um relato de paciente XP de 41 anos com graves problemas odontológicos, leve problema neurológico, fotossensibilidade, com excisão de tumores no rosto, lábios, língua e mucosa bucal. As recorrentes cirurgias nessa região da boca levaram à microtomia o que dificultou a higienização bucal do paciente e até mesmo sua respiração (81).

Os estudos de caracterização genética envolvem os trabalhos de nosso grupo de pesquisa (2009 e 2013) e dois trabalhos de Santiago e colaboradores (2015 e 2016, em preparação) do Hospital do Câncer AC Camargo. Em 2009, foram relatados três pacientes XP, com duas mutações no gene *XPC*, sendo uma delas não descrita, c.1969G>T, e uma já descrita em pacientes na Europa, c.1643-1644delTG (82, 83). Esta segunda mutação foi reportada posteriormente como sendo resultado de um efeito fundador no norte da África (84). Em



2015, a partir de estudo de 26 pacientes XP, é descrita descreve a baixa incidência de pacientes XP-A no Brasil, com a descrição de uma mutação já descrita na literatura (85). A tabela 2 a seguir resume as mutações já descritas no Brasil a partir de 2000 até 2015.

Tabela 2 - Mutações de Pacientes XP e CS já publicadas no Brasil entre 2000 e 2015. São 16 pacientes estudados e 14 mutações descritas, sendo 11 não descritas anteriormente e 3 já descritas na literatura.

Artigo	NºPacientes	Gene	cDNA	Protein	Tipo	Literatura
2000 Berlota	8	CSA (ERCC8)	-	p.T104fs	Frameshift ins	-
		CSA (ERCC8)	-	p.T204K	missense	-
		CSA (ERCC8)	-	p.D266G	missense	-
		CSA (ERCC8)	IVS4+1G>A		splicing	-
2002 Resende	2	CSA (ERCC8)	IVS7-1G>A, c.618-1G>A		splicing	-
		CSA (ERCC8)	G/A int7spl.donor; cDNA ins83nt	p.Q228fs+X	splicing	-
		CSA (ERCC8)	G/A int7spl.acc; cDNA del 9nt	p.del207-209	splicing	-
2009 Leite	3	XPC	c.1969G>T (exon 9)	p.E657X	stop codon	novel
		XPC	c.1872_2031 (exon 9 deletion)		possible splicing error	novel
		XPC	c.1643-1644delTG (exon 8)		frame shift	Chavanne et al.,2000/Khan et al., 2006
		XPC	c.1626_1870del (245 nt deletion - Exon 8)		possible splicing error	Chavanne et al.,2000/Khan et al., 2006
2012 Soltys	2	XP-G (ERCC5)	c.83C>A	p.Ala28Aasp	Missense	novel
		XP-G (ERCC5)	c.2904G>C	p.Trp968Cys	Missense	novel
2015 Santiago	1	XPA	c.619C>T (exon 5)	p.R207X	stop codon	Bartels, C.L. 2007; Vasquez, K.M.2002; Satokata, I. 1992

## 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar geneticamente os pacientes XP e familiares da comunidade de Araras (GO);
- Desenvolver um método para diagnóstico molecular destes pacientes e avaliar a distribuição dos alelos mutados na comunidade, assim como nas regiões vizinhas à essa;
- Estudar o efeito das mutações em sitio de *splicing* no gene *POLH* das linhagens XP06GO e XP05MG;
- Identificar as mutações responsável pelo fenótipo de pacientes de diferentes regiões do Brasil com diagnóstico clínico de XP, CS e TTD.

## 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.3.1 Cultura de células

Cinco linhagens de fibroblastos primários foram isoladas a partir de biópsia da pele dos pacientes e familiares; GO-01, XP03GO, XP04GO, GO-05 e XP06GO, e três linhagens de células primárias obtidas neste laboratório ou gentilmente cedidas pelo Dr. Alain Sarasin (Institut Gustave Roussy, Villejuif, França): FHN, XP865VI (86) e XP05MG (Tabela 3). A biópsia foi realizada a partir de regiões livres de tumores e normalmente não expostas à luz. Após identificação da mutação, amostras de saliva (50 amostras), incluindo todos os pacientes da comunidade e familiares, foram coletadas para posteriores ensaios de caracterização genotípica e construção da genealogia. Todas as coletas, incluindo de biópsias e saliva, foram feitas sob autorização e conhecimento do comitê de ética de pesquisa Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Parecer 1007 CEP, OF. CEP SH 045-13). Os fibroblastos foram cultivados em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium®) suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (Cultilab), 2 mM de L-Glutamina (Glutamax®), na presença de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina.

**Tabela 3 - Linhagens utilizadas para estudo fenotípico e genotípico dos pacientes. A idade é referente ao momento da coleta da biópsia para estabelecimento da cultura de células.**

Linhagem	Fenótipo		Idade (Anos)	Mutação genômica <sup>1</sup>	Genótipo
FHN	Normal		-	-	Homozigoto
XP865VI <sup>2</sup>	XP-V	Homen	16	c.1075-2162 1244+1432del (del Exon 10)	Homozigoto
XP05MG <sup>3</sup>	XP-V	Homen	-	c.1249-1 G>A (intron 10)	Homozigoto
GO-01 <sup>3</sup>	Normal	Homen	35	c.764+1 G>A (intron 6)	Heterozigoto
XP03GO <sup>3</sup>	XP-V	Mulher	31	c.764+1 G>A (intron 6)	Heterozigoto
				c.907 C>T [p.(Arg303*)] (exon 8)	Heterozigoto
XP04GO <sup>3</sup>	XP-V	Mulher	35	c.764+1 G>A (intron 6)	Heterozigoto
				c.907 C>T [p.(Arg303*)] (exon 8)	Heterozigoto
GO-05 <sup>3</sup>	Normal	Mulher	33	c.764+1 G>A (intron 6)	Heterozigoto
XP06GO <sup>3</sup>	XP-V	Homen	7	c.764+1 G>A (intron 6)	Homozigoto

1. Referência hg19.

2. Linhagens gentilmente cedidas pelo Dr. Alain Sarasin, Institut Gustave Roussy, Villejuif (IGR).

3. Células isoladas de pacientes XP brasileiros – Laboratório de Reparo de DNA, USP, Brasil.

### 2.3.2 Sequenciamento pelo método de Sanger

A reação da polimerase em cadeia (PCR) para amplificação do gene *POLH* foi feita a partir de 25 ng de DNA genômico, extraído da cultura de fibroblastos primários e/ou de amostras de saliva. Para reação utilizou-se 0,1 U da enzima *High Fidelity Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen/Thermo Fisher), 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM de dNTPs e 0,3 μM dos iniciadores. O oligos utilizados para amplificação dos exons estão listados na tabela 4 (87).

Tabela 4 - Oligos usados para amplificação e sequenciamento dos onze exons do gene *POLH* (NM\_006502), sendo o exon 11 subdivido em 4 conjuntos de iniciadores (87).

Exon	Produto da PCR		Oligo
1	338	Sense	GCGCTGTCAGACCTCAGTC
		Anti-sense	AACCAATAGCCAAGGCAACA
2	279	Sense	TCCCTGGCATTITGGATTAG
		Anti-sense	CCACCACCACAACAACAAAG
3	326	Sense	ATGATGGCATCTGTGGTCAA
		Anti-sense	CCAGTTCCTAGCCTCATGGA
4	313	Sense	ATTGCCTGCATGAATGATCC
		Anti-sense	ATGACCAAGCAAAGCAGGTT
5	405	Sense	CTTCTAAGCTGGCTGCCATT
		Anti-sense	CACCCGGCCTATGTGTAATAA
6	221	Sense	TCACCAACTTTGATGGGTTG
		Anti-sense	CAACCAGAGAGTTTCTACACATGG
7	369	Sense	TCCTGAACCTTTTGGAGAGC
		Anti-sense	TGAAGCAAGAAGAACCAGTGAA
8	300	Sense	GGACAAGGTTTTCCTTTTTCA
		Anti-sense	ACCTACCCACTGACCCCTTT
9	260	Sense	TGGTGCACAATTCTGTTTGG
		Anti-sense	CTGTCTTTGTTCTCTGCTCCA
10	310	Sense	CTGGTCTCCATCCTTCCAC
		Anti-sense	TTTGAGTGATTAGACACAATGAGGA
11.1	328	Sense	AGCAACCACGTCCTGGAAT
		Anti-sense	TAGCTTCGACACCCCTTCAC
11.2	354	Sense	CCATGGTCCAACCTGTAAGC
		Anti-sense	AACCTGGGGGTTTGAAGAGT
11.3	332	Sense	AGAAGTGTGGCTCCCTGGTA
		Anti-sense	CCCTTCTCAGGGAAATCTG
11.4	352	Sense	TTCATGGAATTAGCAATAGGTCA
		Anti-sense	GCCTGAGTGGGAGCAGTAAG

A reação foi incubada por 3 min à 95 °C para desnaturação da dupla fita de DNA, seguido por 35 ciclos de: 30 s à 95 °C, 45 s à 55 °C para anelamento dos iniciadores e 1 minuto à 68 °C para extensão do produto. Por fim, a reação teve mais uma etapa de extensão à 68 °C por 5 min. Em seguida, utilizou-se 5 μL da PCR para purificação, utilizando 0,5 μL da enzima ExoSap IT (USB/Cleveland, OH, EUA), 0,2 μL de TE e 1,3 μL de água, para um volume final de 7 μL de reação. A reação foi incubada por 15 min à 37 °C e a enzima inativada por incubação à 80 °C por 15 min. Para o sequenciamento utilizou-se o kit *BigDye® Terminator*

v3.1 (Thermo Fisher) na reação com; 1 µL da enzima BigDye, 0,3 µL dos iniciadores (os mesmos utilizados para amplificação de cada exon), 1,5 µL do tampão *SaveMoney* (5x) e 3,7 µL de água. Foram programadas as seguintes etapas para reação; uma pré incubação por 2 min à 95 °C, 40 ciclos das etapas 18 s à 95 °C, 18 s à 55 °C e por fim 4 min à 60 °C. As amostras foram mantidas em geladeira cobertas com alumínio até o dia seguinte. Para precipitação da reação 2 µL da mistura, EDTA 125 mM pH 8 e acetato de sódio 3 M na proporção 1:1, foi adicionado aos 10 µL do volume total da reação de sequenciamento e a placa contendo as amostras foi centrifugada por 15 s à 290 g. À solução adicionou-se 25 µL de etanol 100% a temperatura ambiente e incubada por 15 min no escuro. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 2800 g por 30 min à 4 °C. O sobrenadante foi descartado vertendo-se a placa, a qual foi novamente centrifugada invertida no lenço de papel por 10 s à 650 rpm, com aceleração e desaceleração de 2. A placa foi mantida à -20 °C até ser enviada à Dra. Tatiana Corrêa, especialista em laboratório no GaTE Lab, Departamento de Botânica, IB-USP, que utilizou o equipamento da Applied Biosystems 3730 DNA para leitura dos fragmentos de PCR. Os arquivos .ab e .phd foram enviados via servidor e analisados com as ferramentas Phred, Phrap e Consed (88, 89). As nomenclaturas para as variações encontradas seguem as recomendações disponíveis no *site* da Human Genome Variation Society (HGVS).

### 2.3.3 Extração de DNA de saliva

Para genotipagem das mutações de alguns pacientes de Goiânia utilizou-se coletores de saliva da Oragene™ (Oragene™ DNA self-collection kit, DNA Genotek, Canadá) específicos para extração de DNA. Após a coleta da saliva os tubos coletores foram cuidadosamente invertidos dez vezes. As amostras de saliva foram armazenadas a temperatura ambiente e processadas, seguindo especificações do fabricante. Para a extração do DNA de algumas amostras, o material foi inicialmente pré-aquecimento a 50 °C por 1 h, em incubador de água banho-maria e, em seguida, de um total de 4 mL de amostra, foram retirados 500 µL para purificação do DNA. A esta alíquota adicionou-se 20 µL do reagente de purificação PT-L2P® (Oragene™), a solução foi homogeneizada e incubada no gelo por 15 min. Após centrifugação de 290 g por 15 min, o sobrenadante (aproximadamente 450 µL) foi transferido para um tubo novo de 1,5 mL onde adicionou-se isopropanol na proporção de 1:1. Homogeneizou-se a

solução invertendo os tubos e, em seguida, incubado à temperatura ambiente por 5 min. As amostras foram novamente centrifugadas (290 g por 5 min) e o precipitado lavado 2 vezes com etanol 70% gelado. O precipitado de DNA foi eluído em 50 µL de TE pré-aquecido à 37 °C.

### 2.3.4 *Ensaio de discriminação alélica*

Para a otimização de um método para a identificação da presença dos alelos mutados utilizou-se a metodologia Taqman SNP Genotyping assay<sup>®</sup> (Applied Biosystems/Thermo Fisher, Pittsburgh, PA, USA). Este ensaio baseia-se na amplificação de duas diferentes sondas marcadas com os fluoróforos VIC<sup>®</sup> e FAM<sup>®</sup>, em que uma dessas irá se ligar ao alelo selvagem e a outra ao alelo mutado. A diferença na amplificação de cada alelo será resultado da discriminação alélica de cada amostra. A partir de uma garrafa de 75 cm<sup>2</sup> de cada uma das culturas celulares, o DNA genômico foi extraído utilizando o kit Blood & Cell Culture DNA<sup>®</sup> seguindo as especificações do fabricante (Qiagen, Hilden, DE). O ensaio de genotipagem foi realizado utilizando o Taqman<sup>®</sup> SNP genotyping (Thermo Fisher), seguindo especificações do fabricante. Para a reação de amplificação utilizou-se o PCR em tempo real, 7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher), em que 60 ng de DNA, acrescido de 2 X Taqman<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix e 20 X SNP *Genotyping Assay Mix*, em um volume final de 25 µL. Antes da reação de amplificação foi feita uma pré-leitura da placa por 1 min a 60 °C, seguido pela amplificação de uma etapa de 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C e uma última etapa de 1 minuto à 60 °C. Ao final da reação é feita uma pós-leitura da fluorescência total, a qual é usada para análise de discriminação alélica. O *software* utilizado para análise foi o TaqMan Genotyper v1.3 (Thermo Fisher).

### 2.3.5 *Genealogia*

Para melhor entendimento das relações de parentesco existentes entre os pacientes da comunidade de Araras, GO, foi elaborada uma árvore genealógica baseada nas informações coletadas em duas viagens à comunidade, bem como baseado nas informações relatadas no livro “Nas Asas da Esperança” (90).

Para o desenho da genealogia utilizou-se o programa CYRILIC (versão 2.1, Cyrillic, Oxfordshire, UK).

### 2.3.6 Análise do mRNA da Pol eta

O RNA total das linhagens foi extraído das células com kit da Qiagen® (AllPrep DNA/RNA Mini Kit, cat n°80204 ). O RNA resultante teve sua integridade e quantificação verificadas através da visualização em gel de agarose 1% e a quantificação realizada em espectrofotômetro (modelo DU-640, Beckman, EUA ou NanoDrop 1000, ThermoScientific). Em seguida 2 µg deste RNA, tratado com DNase (Promega® RQ1 RNase-Free DNase), foi utilizado para síntese do cDNAs, com a enzima SuperScript IV (Applied Biosystems, Foster City, CA cat n° 4374966) seguindo especificações do fabricante. O cDNA produzido nesta reação foi utilizado na reação de PCR em tempo Real utilizando sondas fluorescentes intercalantes de DNA dupla fita (SyberGreen da Applied Biosystems®) e utilizando iniciadores para região do cDNA correspondente à junção do exon 6/7 do gene POLH, iniciador da fita sense 5´GGT CAG TCC CAC AGC TCT TC 3´ e anti-sense 5´GAC AGA GGC CCC TAG CTT TC 3´. A análise dos dados seguiu método comparativo de Cts (*cycle threshold*), após normalização baseada na expressão do mRNA do gene endógeno GAPDH.

Para estudo das isoformas da POLH consequentes da mutação em sítio de *splicing* dos pacientes XP06GO e XP05MG, a partir do cDNA, utilizamos os iniciadores sense: 5´ ATGGCTACTGGACAGGATCGAGT 3´ (POLH\_ATG) e anti-sense 5´ GGCAGCACTAATGTGTTAATGGC 3´ (POLH\_STOP).

### 2.3.7 Sequenciamento em larga escala (NGS)

#### 2.3.7.1 Preparo da amostra

O DNA genômico das novas amostras foram sequenciadas utilizando a plataforma MiSeq da Illumina© (San Diego, CA, EUA) com o kit de captura SureSelectQXT da Agilent Technologies© (Santa Clara, CA, EUA). Para o enriquecimento das regiões alvos utilizamos um ensaio customizado com um painel de genes de reparo de aproximadamente 370 kpb. O preparo das amostras seguiu o protocolo conforme indicado pelo fabricante. O sequenciamento foi realizado na plataforma do MiSeq (Illumina) que gerou leituras (*reads*) de 150 bases.

O crescente número de amostras de pacientes nos levou a adotar a forma clássica de padronização de identificação dos pacientes, em que as letras iniciais correspondem ao fenótipo clínico XP, CS ou TTD e as letras finais ao estado de origem do paciente: como em XP05MG, de fenótipo XP que foi relatado como morador de Minas Gerais. Nos casos dos pacientes de Goiás, GO, no entanto revisores de nosso trabalho comentaram que GO se refere a pacientes XP de Gottingen na Alemanha. Sendo assim, desenvolvemos um sistema de nomenclatura que esperamos possa ser útil em todo o mundo, no qual adicionamos ao final do nome a extensão normalmente utilizada em internet: “.br” (Munford, Castro et al, 2016 in press). Entretanto, para facilitar a leitura deste trabalho a extensão “.br” não foi adotada, porém para futuras publicações científicas, desses dados deveremos seguir com o padrão adotado.

### 2.3.7.2 Análise dos dados de sequenciamento: identificação de variantes.

A análise das sequências geradas foram mapeadas utilizando o *software* de alinhamento BWA 7.0.10 com a referência genômica hg19. Com o *software* Picard (versão 1.97) retiramos sequências duplicadas, considerados artefatos do preparo das amostras. Para o estudo das variantes utilizamos o *software* Genome Analysis TK (GATK) que recalibrou e realinou as sequências do arquivo BAM; em seguida com a função Haplotype Caller obtivemos o arquivo com das variantes finais (vcf), utilizadas para estudo da mutação responsável pelo fenótipo do paciente. Esse processamento foi feito utilizando a interface web construída pela aluna de mestrado do nosso laboratório, Ms. Livia Moura, que está localizada e disponível em; <http://varfinderhg.com.br>. O *software* da Agilent Technologies, SureCall®, também foi utilizado para análise dos dados com o objetivo de confirmação e comparação dos dados obtidos com o [varfinderhg.com.br](http://varfinderhg.com.br).

A estatística da análise dessas amostras nos mostrou que tivemos uma média de 47% de sequências alinhadas nos genes de interesse, gerando em torno de 72,5 milhões de bases mapeadas por amostra, com cobertura média de 222 X.



Como estratégia de estudo da variante responsável pela síndrome, utilizamos alguns filtros; na primeira filtragem utilizamos o valor da frequência das variantes na população (FA, frequência alélica). Adotamos o valor 0,5, ao invés de 0,1 (usualmente utilizado) em função da alta frequência de alguns polimorfismos, em heterozigose, por exemplo no gene *XPC*. Essa alta frequência poderia mascarar algumas mutações que, em homozigose ou em casos de heterozigosidade composta, poderiam ter efeito na função do gene.

Em seguida avaliamos as variantes com alterações na função do gene (mutações); *missense* (trocas de nucleotídeos, inserções e/ou deleções com alteração na codificação dos aminoácidos da proteína), parada de leitura, com alteração no quadro de leitura ou em sítios de *splicing*. Mutações de grande escala da estrutura do cromossomo não foram avaliadas. A partir dessas filtragens indicou-se a provável variante como mutação responsável pelo fenótipo dos pacientes. O estudo do efeito da mutação na proteína do gene em questão foi feito utilizando as interfaces SIFT, PolyPhen e Mutation taster.

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 História da descoberta de uma doença rara, não tão rara em Araras

A narrativa desta história começa com uma mãe angustiada e uma criança ruiva de cinco anos de idade que vivem em uma comunidade pequena e isolada. Aos dois anos de idade, sua mãe começou a notar que ao brincar ao sol, a pele do menino ficava avermelhada e cheia de bolhas. Na comunidade estes sintomas, de sensibilidade ao sol, eram conhecidos como consequência de uma doença que denominaram "doença da pele ruim". Desconfiando que seu filho pudesse ser mais um dos acometidos, a mãe passou a levá-lo para capital para consultas ao médico. A viagem de 240 Km até Goiânia é cansativa, parte das estradas são de terra e com trechos de difícil acesso (Figura 4). Os médicos, todavia, insistiam em dizer que a sensibilidade da criança ao sol vinha do fato desta ser ruiva e muito clara.

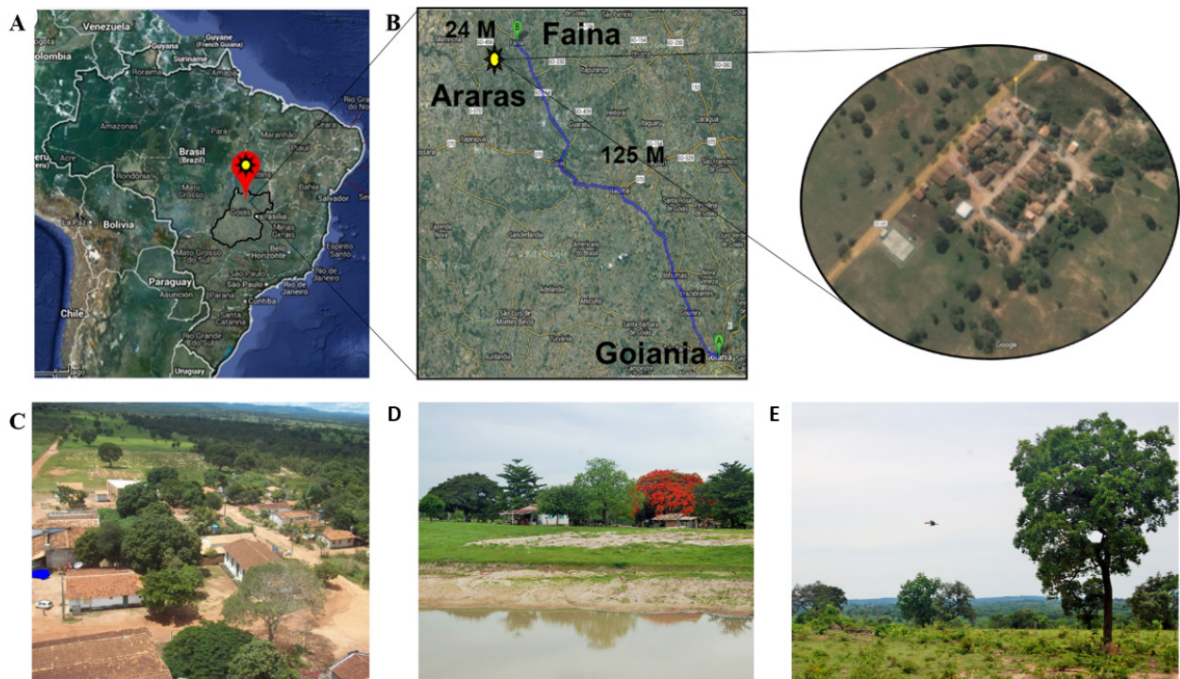


Figura 4 - Localização e paisagem de Araras. (A) Localizada no estado de Goiás, centro do Brasil, com alta incidência de radiação solar durante todo o ano. (B) Percurso entre Goiânia, capital do Estado de Goiás, e Araras. De Goiânia à Faina são 200 Km, com estrada asfaltada, porém o trecho de 40 km entre Faina e Araras, a estrada é de terra, com muitas pontes quebradas, o que muitas vezes nos leva a preferir passar com o carro pelos córregos. É uma comunidade isolada, o que dificulta a chegada de assistência médica aos pacientes. (C) Vista aérea do vilarejo de Araras e (D e E) fotos da região. O isolamento preservou a paisagem e suas araras, o que deu nome à comunidade.

Após insistência da mãe na descrição da doença da “pele ruim”, um comentário chamou a atenção da dermatologista Sulamita Costa Chaibub; "Onde eu moro existem mais de 20 pessoas que costumam vir ao hospital para retirada de tumores todo ano". Naquele momento, a dermatologista começou a pensar em uma doença genética e, depois de algumas perguntas mais detalhadas, chegou ao diagnóstico de uma doença genética rara Xeroderma pigmentoso (XP). A falta de um diagnóstico precoce, em função do fenótipo mais ameno em comparação a outros grupos de complementação de XP, é frequente em todo o mundo (91, 92).

Assim, após o diagnóstico e a explicação da médica a respeito da genética da doença a mãe, Gleice Machado, volta para comunidade com o objetivo de resgatar o histórico familiar dos pacientes. Ela procura a anciã da comunidade, com 103 anos na época, e anota todas as recordações relatadas de doentes e familiares desde os primeiros ancestrais da comunidade. E assim publica o livro intitulado ‘Nas asas da esperança’, descrevendo a história de alguns pacientes, suas características e uma genealogia correlacionando as famílias dos pacientes, figura 5 (90).

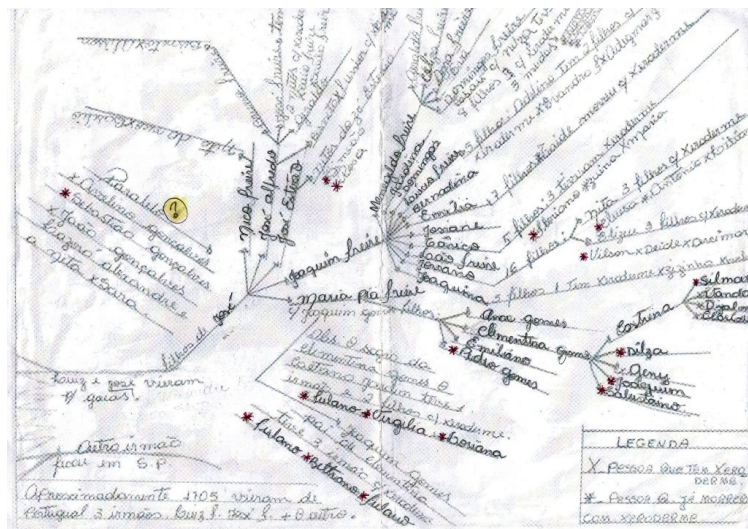


Figura 5 - Arvore genealógica desenhada por Gleice Machado a partir das lembranças de Dona Clementina, na época a pessoa mais idosa da comunidade, de quem resgatou a memória de todos os casos de Xeroderma. Em asteriscos vermelhos estão indicados todos os indivíduos que têm, ou eventualmente tiveram, sintomas clínicos de XP (90).

Na comunidade vivem cerca de 200 famílias, aproximadamente mil habitantes, sendo dezessete pacientes XP com idades entre dez e 82 anos de idade. Além dos dezessete pacientes, foram relatados outros treze casos de XP falecidos. Há cerca de seis anos, Gleice fundou a Associação Brasileira de Xeroderma pigmentosum (ABRAXP). Hoje ela consegue

ajuda do Governo do Estado de Goiás, da L’Oreal Paris e de outras entidades, e envia, a cada 3 meses, 21 unidades do protetor solar Eryphotona® AK-NMSC (Isdin), fator de proteção 100, para cerca de 100 pacientes de todo Brasil. Para a comunidade, a associação conseguiu adquirir uma ambulância só para os pacientes, que os levam para consultas em Goiânia e um ambulatório dentro da comunidade com uma estrutura básica de atendimento médico.

### 2.4.2. Características clínicas e genótipo dos pacientes

Em 2010, o caso foi noticiado na mídia, o que chamou a atenção de nosso grupo de pesquisa. Diante do problema, a equipe assumiu investigar e caracterizar a mutação responsável pela síndrome dos pacientes XP de Araras. Com o objetivo de estabelecermos culturas celulares para caracterização fenotípica dos pacientes a Dra. Juliana B. Vilar, juntamente com a dermatologista do Hospital Geral de Goiás, Dra. Sulamita Chaibub, realizaram a coleta de biópsias, de regiões não expostas ao sol, de três pacientes, sendo duas irmãs, XP03GO e XP04GO, e da criança, XP06GO, bem como de três indivíduos não afetados: GO01 e GO05 (pais do XP06GO) e GO07 (Tabela 5).

**Tabela 5 - Informações gerais dos indivíduos dos quais foram coletadas biópsias para a caracterização genotípica dos pacientes de Araras.**

Amostra	Diagnóstico Clínico	Nascimento/ Gênero	Cosanguinidade	Idade do Diagnóstico (a)	Idade dos primeiros sintomas (a)	Xerosis	Problemas Oculares	Fotofobia	Primeira lesão de pele (a)
GO01 <sup>1</sup>		1974/H		-	-	-	-	-	-
XP03GO <sup>2</sup>	XP	1978/M	não	32	7	sim	sim	sim	25
XP04GO <sup>2</sup>	XP	1974/M	não	36	7	sim	sim	sim	13
GO05 <sup>1</sup>		1977/M		-	-	não	não	não	-
XP06GO	XP	2002/H	sim	5	2	sim	sim	sim	2
GO07		1956/M		-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Pais XP06GO

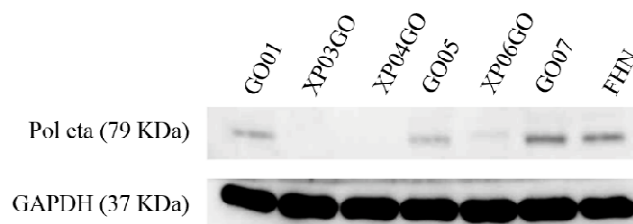
<sup>2</sup> Irmãs

O estabelecimento da cultura de fibroblastos primários dessas amostras nos permitiu, primeiramente, caracterizar o fenótipo dessas linhagens frente aos danos induzidos por UV. Os ensaios de viabilidade celular, conduzidos pela Dra. Veridiana Munford, mostraram um aumento de sensibilidade à luz UVC das linhagens afetadas, apenas após co-tratamento com cafeína, quando comparadas à cultura de fibroblastos primários selvagens, AS405. Trabalhos anteriores (93, 94) indicam que este tipo é um fenótipo comumente observado em células

com deficiência na Pol eta (XP-V). Indicando que a provável via de reparo comprometida nessas células seria a via de síntese de translesão realizada por esta proteína.

Corroborando este dado, os ensaios de UDS, realizados em colaboração com o grupo do pesquisador Dr. Alain Sarasin (Institut Gustave Roussy, Villejuif, França), e de remoção de lesões (André P. Schuch, comunicação pessoal) nos indicaram que as células dos pacientes de Araras são capazes de remover os danos induzidos por UVC, assim como a linhagem controle selvagem AS405, diferente do observado para linhagem XP-C (XP202VI). Indicando que as células dos pacientes de Araras são proficientes para via de NER.

Finalmente, o ensaio de *Western blot* (WB), realizado pela Dra. Leticia Lerner, demonstrou a ausência da proteína Pol eta nas linhagens XP03GO, XP04GO e uma pequena expressão dessa proteína na linhagem XP06GO (Figura 6). Todos estes resultados indicaram que o quadro clínico apresentado pelos pacientes de Araras estaria relacionado a deficiência no gene POLH, o que nos levou a sequenciá-lo.



**Figura 6 - Células de pacientes XP de Araras apresentam menor expressão da proteína Pol eta.** *Wester Blot* para proteína Pol eta indicando ausência da proteína nas linhagens XP03GO e XP04GO e pequena expressão na linhagem XP06GO, como controle positivos utilizamos o extrato proteico dos fibroblastos proficientes em reparo, FHN, GO01 e GO07.

O sequenciamento, metodologias Sanger e NGS, indicou a alteração em sítio de *splicing* c.764+1 G>A (intron 6) e a troca de nucleotídeo que caracteriza uma parada de leitura do mRNA, c.907 C>T (exon 8), como mostra a figura 7 a seguir. A mutação do exon 8 foi descrita previamente em um paciente de Kosovo, na Europa (86). Uma outra troca de G para C no mesmo sítio da mutação no intron 6 foi identificada no paciente XP31BE, c.764+1 G>C (61) e, este ano, a mesma troca de G para A foi identificada em quatro pacientes na Europa (95).

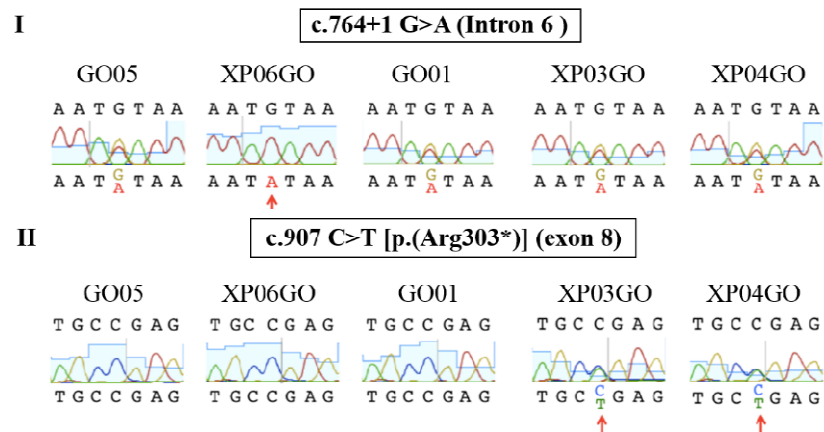


Figura 7 - Identificação das mutações associadas aos pacientes de Araras/Goiás. Sequenciamento dos fibroblastos primários dos pacientes de Araras: XP03GO, XP04GO (irmãs) e XP06GO (filho de GO01 e GO05). Parte do sequenciamento do exon 6 (I) e exon 8 (II) do gene *POLH* indicando as alterações em sítio de *splicing* c.764+1 G>A (intron 6) e c.907 C>T (exon 8), caracterizando uma parada de leitura na arginina 303 da proteína. Os pais, GO01 e GO05, do paciente XP06GO (homozigoto para o intron 6) são, heterozigotos, portadores do alelo mutado e as pacientes XP03GO e XP04GO heterozigotas compostas para as mutações no intron 6 e exon 8. Referência hg 19, *POLH*: NM\_006502.

A partir da identificação das mutações responsáveis pelo fenótipo dos pacientes de Araras, otimizamos um ensaio de PCR em tempo real utilizando sondas Taqman<sup>®</sup>, para discriminação dos alelos mutados e selvagem. Essa metodologia foi usada como um teste de diagnóstico molecular, permitindo a identificação de indivíduos afetados, assim como indivíduos heterozigotos, portadores. Esse teste foi utilizado como confirmação de diagnóstico clínico, para aconselhamento genético de famílias com histórico de XP, assim como para casais de primos (figura 8). Avaliamos a qualidade de amplificação do DNA das amostras extraídas tanto da cultura de células de alguns pacientes, quanto da saliva. Apesar do DNA da saliva permanecer com alguma impureza, observada na relação 260/280 nm (equipamento Nanodrop), não houve interferência na discriminação alélica das mutações. Um teste foi realizado com a sonda alinhando em uma troca de nucleotídeo logo após o nucleotídeo mutado e o alelo não é amplificado, mostrando a alta especificidade das sondas na discriminação alélica dessas mutações. Na figura 9 ilustramos resultados desse ensaio de genotipagem para alguns pacientes.



Figura 8 - Coleta de amostra de saliva de pacientes e familiares para teste de diagnóstico molecular na comunidade de Araras.

Os resultados apresentados permitiram identificar pacientes e portadores heterozigotos da comunidade, assim como de regiões vizinhas. Foram testados 58 indivíduos, dentre esses 41 não portadores de XP e 17 foram confirmados como pacientes XP. A alta frequência de portadores heterozigotos é explicada por termos dirigido este estudo para familiares direto dos pacientes. Posteriormente esse ensaio de genotipagem foi utilizado para ampliar a amostragem na região, pelo Dr. Rafael Souto (Secretaria de Saúde de Goiás).

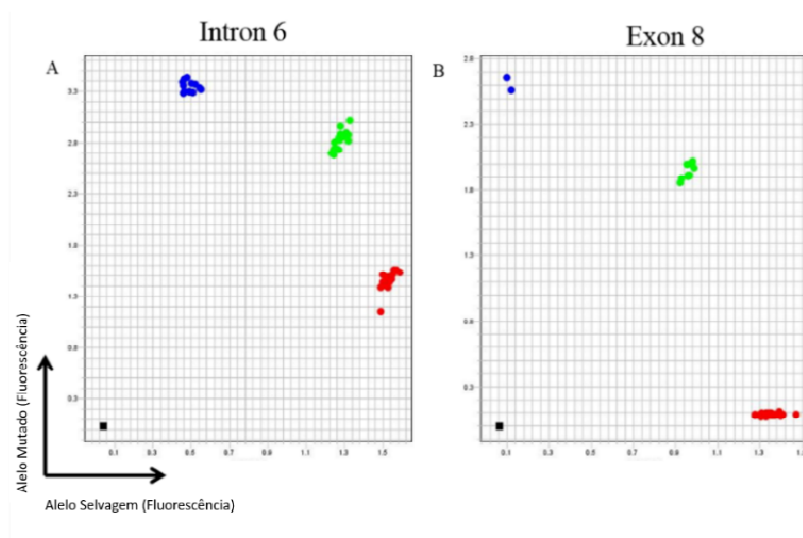


Figura 9 - Ensaio de genotipagem com sondas Taqman® específicas para as mutações do intron 6 (A) e exon 8 (B). O grupo em azul representa os pacientes homozigotos mutados, em verde heterozigotos e em vermelho, homozigotos para o alelo selvagem. O quadrado preto (canto inferior esquerdo) representa o controle negativo da reação. Este resultado é representativo do que foi observado em pelo menos 3 experimentos independentes.

Dos pacientes encontrados, 11 são homozigotos para a mutação no intron 6, um é homozigoto para mutação no exon 8 (XP88GO) e cinco são heterozigotos compostos para as duas mutações (Tabela 6). Dois pacientes negros, os irmãos XP08GO e XP33GO, homozigotos para a mutação do intron 6, são residentes de Faina e relatam não ter relação de parentesco com as famílias de Araras. A severidade dos sintomas dos pacientes foi classificada como leve, até 10 lesões, média, entre 10 e 50 lesões, ou agressiva com mais de 50 lesões.



Tabela 6 - Genótipo e características clínicas dos 17 pacientes residentes em Araras e regiões vizinhas.

Paciente	Genealogia ID	Sexo	Nascimento	Cidade Natal	Severidade dos Sintomas*	Fototipo	Lesões Removidas	Enxerto	
<b>Intron 6 homozigoto</b>									
1	XP06GO	IV.1 (A)	Masculino	2002	Araras (GO)	Leve	I	<10	Não
2	XP110GO	III.1 (A)	Masculino	1997	Araras (GO)	Leve	III	<10	Não
3	XP100GO	III.2 (A)	Masculino	1992	Araras (GO)	Leve	III	<10	Não
4	XP78GO	-	Masculino	1983	Matrinchã (GO)	Leve	V	<10	Não
5	XP33GO	I.8 (B)	Feminino	1981	Faina (GO)	Leve	IV	<10	Não
6	XP08GO	I.3 (B)	Masculino	1976	Faina (GO)	Leve	IV	<10	Não
7	XP45GO	II.22 (A)	Feminino	1975	Araras (GO)	Leve	II	<10	Não
8	XP52GO	II.17 (A)	Masculino	1969	Araras (GO)	Agressivo	III	>50	Yes <sup>1</sup>
9	XP25GO	II.16 (A)	Masculino	1968	Araras (GO)	Leve	III	<10	Não <sup>2</sup>
10	XP11GO	I.20 (A)	Feminino	1949	Araras (GO)	Medium	III	>10	Não <sup>3</sup>
11	XP85GO	I.4 (A)	Masculino	1936	Araras (GO)	Agressivo	III	>50	Sim <sup>4</sup>
<b>Intron 6 and Exon 8 heterozygotes</b>									
12	XP63GO	III.7 (A)	Masculino	1981	Araras (GO)	Leve	IV	<10	Não
13	XP56GO	III.6 (A)	Masculino	1979	Araras (GO)	Leve	III	<10	Não
14	XP03GO	II.31 (A)	Feminino	1978	Araras (GO)	Leve	III	<10	Não
15	XP39GO	II.29 (A)	Masculino	1975	Araras (GO)	Agressivo	III	>50	Sim <sup>5</sup>
16	XP04GO	II.28 (A)	Feminino	1974	Araras (GO)	Medium	III	>10	Sim <sup>6</sup>
<b>Exon 8 homozigote</b>									
17	XP88GO	I.31 (A)	Masculino	1934	Hidrolândia (GO)	Leve	II	<10	Não

A e B representa o ID da genealogia das famílias de Araras e Faina, respectivamente.

<sup>1</sup> Ele tem uma prótese no rosto.

<sup>2</sup> Possui uma cicatriz no nariz.

<sup>3</sup> Ela passou por uma cirurgia que removeu grande parte de seu queixo.

<sup>4</sup> Ele tem uma cirurgia no rosto em que se removeu grande parte do queixo, boca e nariz.

<sup>5</sup> Toda a região direita do rosto, incluindo olho, nariz e boca, foi removida e substituída por uma prótese. Falecido em 2015.

<sup>6</sup> Ela possui um enxerto no nariz e já teve quatro diagnóstico de melanoma.

\* Para classificação da severidade dos sintomas considerou-se; Leve até 10 lesões, média entre 10 e 50 e severa para mais de 50 lesões.

Apesar da alta frequência de casamentos consanguíneos, as manifestações clínicas da doença nos pacientes de Araras é bem heterogênea, com alguns casos mais amenos e outros extremamente agressivos (Figura 10). Os dados clínicos que conseguimos coletar se basearam principalmente nos relatos dos pacientes. Apesar da frequência com que esses pacientes se consultaram com diversos médicos dos hospitais em Goiânia, esses dados não estão reunidos de forma que pudessem ser coletados.

Na comunidade existem pacientes com mais de 80 anos e durante a vida tiveram poucas lesões, apesar da vida na lavoura no sol, e alguns pacientes que viveram por cerca de vinte anos com muitas cirurgias e complicações da doença. A heterogeneidade das manifestações pode ser identificada tanto entre pacientes com os diferentes genótipos, quanto entre pacientes com o mesmo alelo mutado, como é o caso de três irmãos heterozigotos compostos para o intron 6 e exon 8: XP04GO, XP03GO e XP39GO (respectivamente Figura 10b, c e d): a primeira, aos 32 anos de idade havia removido três

lesões (não melanoma), porém sua irmã aos 36 já havia removido quatro tumores malignos, no nariz, lábio inferior, no pulso direito (um melanoma de segundo grau) e recentemente, nas costas. Seu irmão, XP39GO, infelizmente, faleceu no ano passado, aos 39 anos, provavelmente em decorrência de complicações de uma metástase de melanoma maligno. Segundo o seu próprio relato, ele já havia retirado inúmeras lesões e feito rádio e quimioterapia com cisplatina, o que quase o levou à morte. Aos 30 anos acabou tendo que colocar uma prótese em parte da boca, nariz e olho do lado direito do rosto, em função das consecutivas remoções cirúrgicas. Nesta família, quatro dos sete filhos nasceram com XP, tendo um deles falecido aos 21 anos de idade.

Atualmente, as características mais agressivas incluem outros dois pacientes; XP52GO (46 anos), figura 10e, e XP85GO (80 anos), figura 10f. O primeiro (XP52GO) teve seus primeiros sintomas aos 7 anos, com manchas vermelhas na pele. Aos 10 anos tirou a primeira lesão no nariz e, depois disso, lembra que todo ano fazia alguma cirurgia (sempre no rosto); no entanto ressalta que nunca falaram em melanoma para essas lesões. Aos 25, teve que colocar uma prótese no rosto, a mesma usada até os dias de hoje. Atualmente, com acompanhamento semanal de um dermatologista, relata que tem tratado suas lesões com Imiquimod®, o que tem sido eficaz na redução e muitas vezes desaparecimento das lesões tratadas. O segundo paciente, XP85GO, aos 80 anos possui grande parte do queixo, boca e nariz removido. As tentativas de enxerto não tiveram sucesso e a região é coberta por gaze. Dentre os pacientes negros suas manifestações clínicas são mais amenas, provavelmente em virtude da melanina como um fator protetor. Porém as manifestações oculares os acometeram mais cedo, comparados ao acometimento dessas lesões nos olhos nos outros pacientes, com telangectasia na conjuntiva, pterígia e pinguecula.

De forma geral, os primeiros sintomas acometeram os pacientes com idade entre 2 e 5 anos e envolveram sensibilidade ao sol, aparecimento de sardas, hipo e hiperpigmentação da pele, *xerosis* (pele seca) em regiões expostas ao sol e alterações oculares. Na maioria dos casos os primeiros sinais começaram a surgir com a idade escolar, uma vez que era necessário andar pela estrada sem proteção solar. Já para o paciente XP06GO, o sintoma inicial se manifestou ainda quando bebê, com o surgimento de bolhas no rosto ao se expor no sol por cerca de 30 a 60 minutos. Inicialmente a mãe suspeitou apenas de picadas de insetos ou de algum tipo de alergia. O fato se repetiu por 3 ou 4 vezes e em seguida vieram as sardas no

rosto, o que levou a mãe a procurar a dermatologista. Esse sintoma de surgimento de bolhas, como queimaduras, só foi relatado pelo paciente XP06GO, em nenhum outro caso há relatos de queimaduras de sol.

A relação entre genótipo e fenótipo desses pacientes não é clara. Muitos outros fatores estão envolvidos na frequência e no tipo de tumor que esses pacientes desenvolveram na vida. Variáveis como o gênero podem influenciar na quantidade de exposição ao sol que a pessoa se expôs na vida. As mulheres da comunidade possuem um papel de donas de casa, o que as favorecem, submetendo-as aos trabalhos internos da casa, diferente dos homens que trabalham com a terra e dependem da lavoura como forma de sustento. Porém, casos como do paciente XP52GO que, percebendo sua sensibilidade ao sol, passou a ordenhar vacas de madrugada, o que não o poupou das muitas lesões na pele e cirurgias no rosto. Pudemos perceber que, de forma geral, as mulheres na comunidade foram mais adeptas aos cuidados com a pele na constância em passar protetor solar e se proteger do sol.

Dessa forma, a heterogeneidade das características clínicas entre os pacientes da região é consequência não só da genética, mas também resultado da atividade socioeconômica do paciente na comunidade, o que envolve o nível de exposição solar ao qual o paciente se expõe.



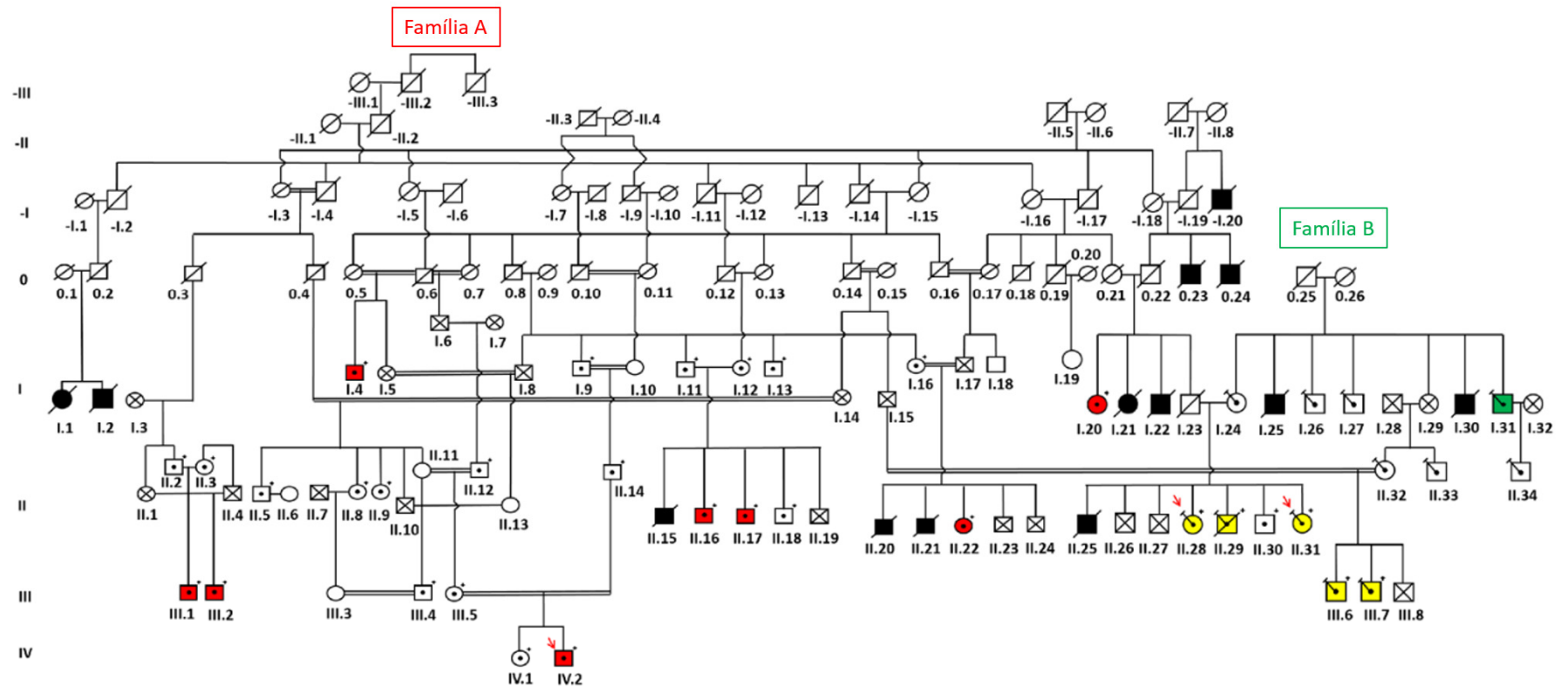
**Figura 10** - Fotos de pacientes XP de Araras, GO. Fotos de doze, dos dezessete pacientes XP da comunidade de Araras. Em (a) XP06GO, (b) XP03GO e (c) XP04GO os pacientes cujas linhagens celulares foram estabelecidas em laboratório para os ensaios fenotípicos e caracterização genética. (d) XP39GO (e) XP52GO, (f) XP85GO, (g) XP88GO, os dois irmãos (h) XP56GO e (i) XP63GO, dentre os outros pacientes de Araras os dois são os que possuem maior fotossensibilidade e problemas oftalmológicos; (j) XP45GO, aos 41 anos possui um dos fenótipos mais ameno entre os pacientes; (k) XP11GO, com a pele bem clara, aos 66 anos já retirou diversas lesões no rosto incluindo uma cirurgia em que retirou parte do queixo e (l) XP78GO paciente de 32 anos cuja pele negra o protegeu dos efeitos do sol. De forma geral, os pacientes apresentam o fenótipo clássico de hiper e hipopigmentação da pele nas regiões expostas ao sol, incluindo *xerosis*, e um aumento na frequência de câncer de pele, principalmente BCC e SCB. Em nenhum dos casos foram observadas alterações neurológicas.

No período entre 2011 e 2014, foram realizados trabalhos de campo com o objetivo de coletar dados referentes ao grau de parentesco entre os pacientes, cujo fenótipo das linhagens celulares estava sendo estudado no momento, XP03GO, XP04GO e XP06GO. Com base nos dados de genotipagem, na genealogia desenhada no livro “Nas Asas da Esperança”, e nas entrevistas feitas com pacientes e familiares, foi possível construir a genealogia das famílias de Araras (Figura 11) e de Faina (Figura 12). Nessas genealogias, somente estão representadas famílias com maior proximidade de parentesco com os pacientes e nem todos os filhos puderam ser representados. A partir da genealogia e dos dados de genotipagem das mutações pudemos compreender a distribuição do alelo mutado entre os pacientes e familiares da região.

A referência de estudo na genealogia de Araras se encontra na anciã da comunidade (0.21, em amarelo) que faleceu em 2010 com 103 anos. Com a genealogia pudemos identificar a distribuição dos alelos mutados, assim como, o efeito dos casamentos consanguíneos fixando a mutação na comunidade. É possível também identificar dois efeitos fundadores desses alelos (intron 6 e exon 8).

O primeiro efeito fundador teria ocorrido no início do século XVIII, provavelmente com a família A (-III.2 e -III.3). Já o segundo efeito fundador, teria ocorrido na segunda metade do século XX com a chegada da família B (0.25 e 0.26), vinda de Hidrolândia (GO). Os pacientes heterozigotos compostos, intron 6 e exon 8, só aparecem após o casamento entre indivíduos de Araras e Hidrolândia; conforme é observado nos casamentos entre I.24, de Hidrolândia, e I.23, de Araras, dos sete filhos, quatro nasceram com XP (II.25, II.28, II.29 e II.31), e entre I.15 (Araras) e II.32 (Hidrolândia), com os filhos afetados III.6 e III.7. É importante ressaltar que somente nesses dois casos o segundo alelo mutado, exon 8, aparece entre os pacientes de Araras, em todos os outros casos os pacientes são homozigotos mutados para o intron 6.

Outra evidência desse efeito fundador, de todos os pacientes genotipados, o único paciente homozigoto mutado para o exon 8 (XP88GO, I.31) veio de Hidrolândia. Há relatos de que existem outros pacientes XP nessa cidade, provavelmente outros casos homozigotos mutados para esse alelo. XP88GO é o paciente mais velho da comunidade com 81 anos, sem nenhum caso de melanoma e poucas cirurgias de remoção de lesões. Em sua família, dois irmãos faleceram com XP, o primeiro aos 27 anos e o segundo aos 79 (em 2011), segundo relatos, os dois com fenótipo mais grave comparado a ele.



#### Legenda/Genótipo:

☒ ☓ Sem Informação ou Não Genotipado

◻\* ◯\* Intron 6 heterozigoto

◻\* ◯\* Exon 8 heterozigoto

◻\* ◯\* Heterozigoto Composto (Intron 6/Exon8)

◻ ◯ Selvagem

◻◻\* ◯◻\* Intron 6 homozigoto

◻◻\* ◯◻\* Exon 8 homozigoto

◻◻◻\* ◯◻◻\* Relatado como XP falecido

Figura 11 - Genealogia representando o grau de parentesco entre os pacientes e residentes de Araras. Quatro principais famílias de Araras: Família A (-III.2 e -III.3), que muito provavelmente introduziu a primeira e mais antiga mutação do intron 6 na comunidade, com os dois filhos, -III.2 e -III.3, que chegam à Araras de Portugal. Família B (-II.3, -II.4, -II.7 e -II.8). Família C (-II.5 e -II.6). Família D (0.25 e 0.26), de Hidrolândia, provável segundo efeito fundador da mutação no exon 8. Pacientes heterozigotos compostos para as mutações do intron 6 e do exon 8 só aparecem após miscigenação das duas famílias. As setas em vermelho indicam os pacientes que inicialmente foram estudados para determinação da mutação e ensaios fenotípicos. A geração zero é referente à geração da pessoa cujos relatos basearam a construção da genealogia, 0.21.

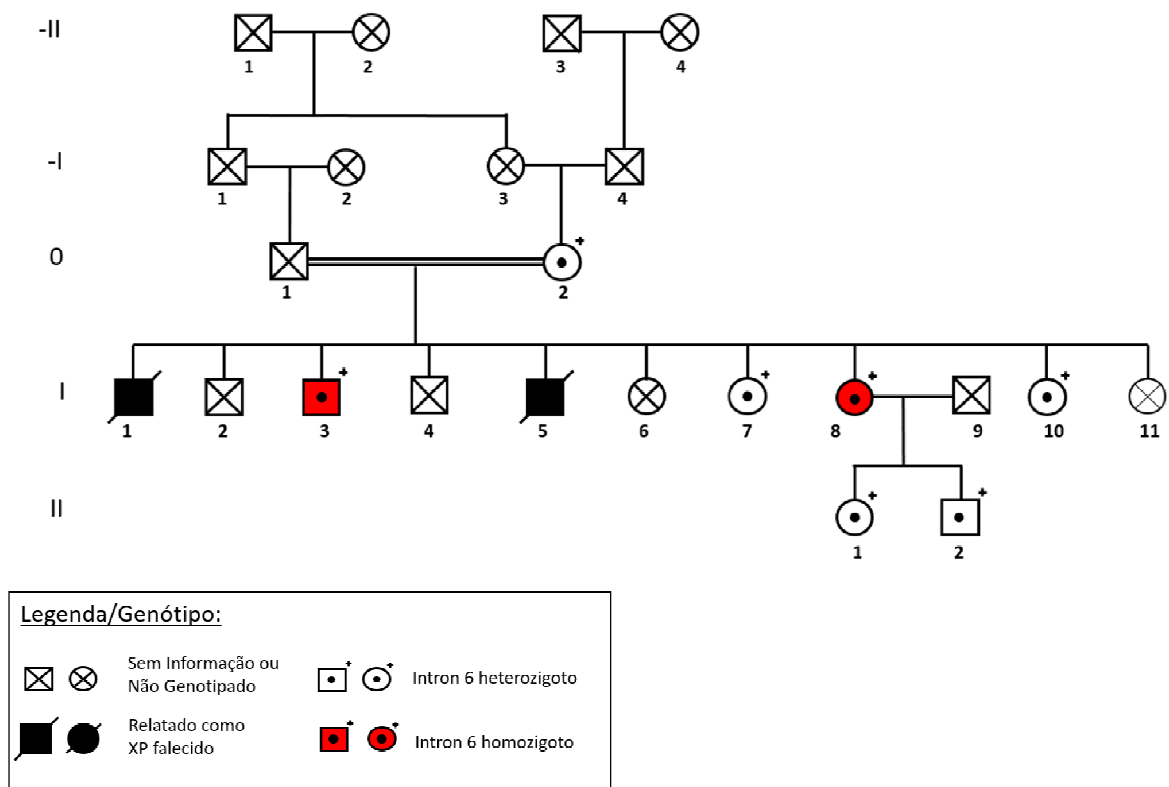
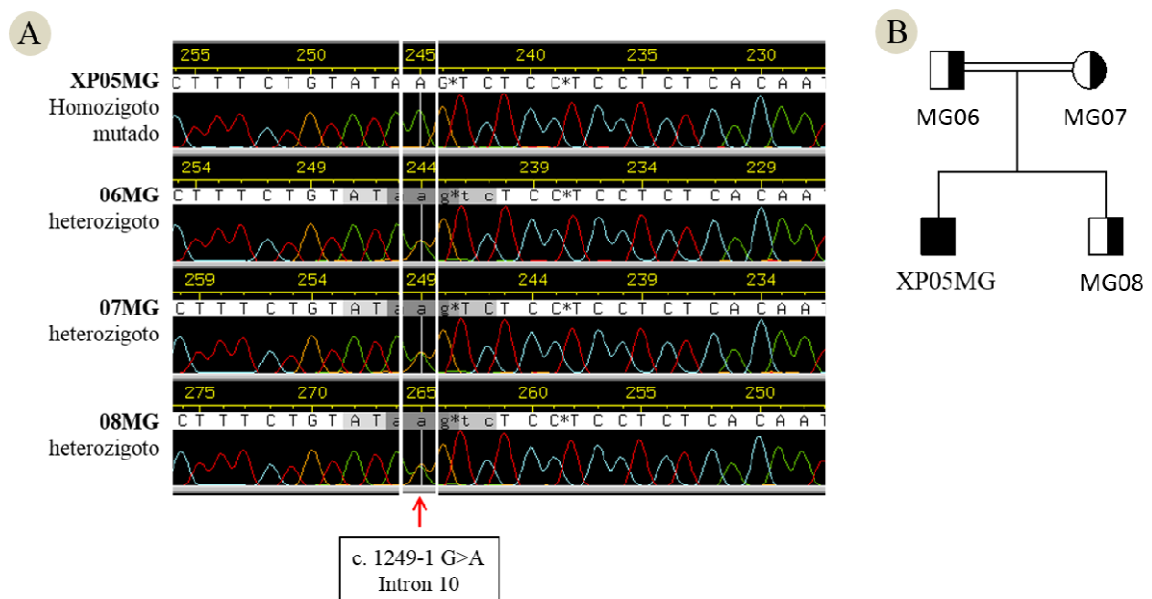


Figura 12 - Genealogia da família de pacientes negros residentes em Faina (GO). Segundo eles não há relação de ancestralidade conhecida entre as duas famílias. Os dois afetados (I.3, XP08GO e I.8, XP33GO) têm fenótipo mais ameno quando comparado aos outros pacientes XP. A pele negra é um fator protetor aos efeitos da radiação UV, assim como para os pacientes negros de Araras que, comparados àqueles de pele clara, são menos afetados.



### 2.4.3. Outra mutação, outro Estado e o mesmo gene.

A cultura primária de fibroblastos, XP05MG, foi estabelecida e caracterizada como XP-V pelas Dras. Daniela Soltys e Leticia Lerner. O paciente do qual a biópsia foi retirada nasceu em 1995, apresenta sintomas clínicos brandos de pigmentação na pele e ausência de problemas neurológicos. Apesar do fenótipo leve, o paciente já apresentou uma lesão maligna na pele do rosto, em idade precoce para a média dos pacientes XP-V. Para identificação da mutação responsável pelo fenótipo do paciente a amostra foi sequenciada por NGS e analisada em colaboração pelo pesquisador Dr. Pedro Galante (Hospital Sírio Libanês), que indicou como alteração candidata a troca de nucleotídeo no gene *POLH* em sitio de *splicing*, c.1249-1 G>A (intron 10). A mutação foi confirmada por sequenciamento Sanger e amostras dos pais e do irmão foram enviadas ao laboratório para genotipagem (Figura 13).



**Figura 13** - Identificação de mutações na família residente em Poços de Caldas, MG. Sequenciamento do DNA extraído de células do paciente de Poços de Caldas (MG), XP05MG, seus pais MG06 e MG07 e seu irmão MG08. (A) O eletroferograma corresponde ao sequenciamento do exon 11 do gene *POLH*. Para análise do sequenciamento utilizamos as ferramentas Phred, Phrap e Consed, tendo como referência para alinhamento o genoma hg19. (B) Heredograma da família do paciente XP05MG evidenciando a herança autossômica recessiva do alelo mutado. Amostras de saliva dos pais e irmão foram enviadas ao laboratório para confirmação e genotipagem da alteração.

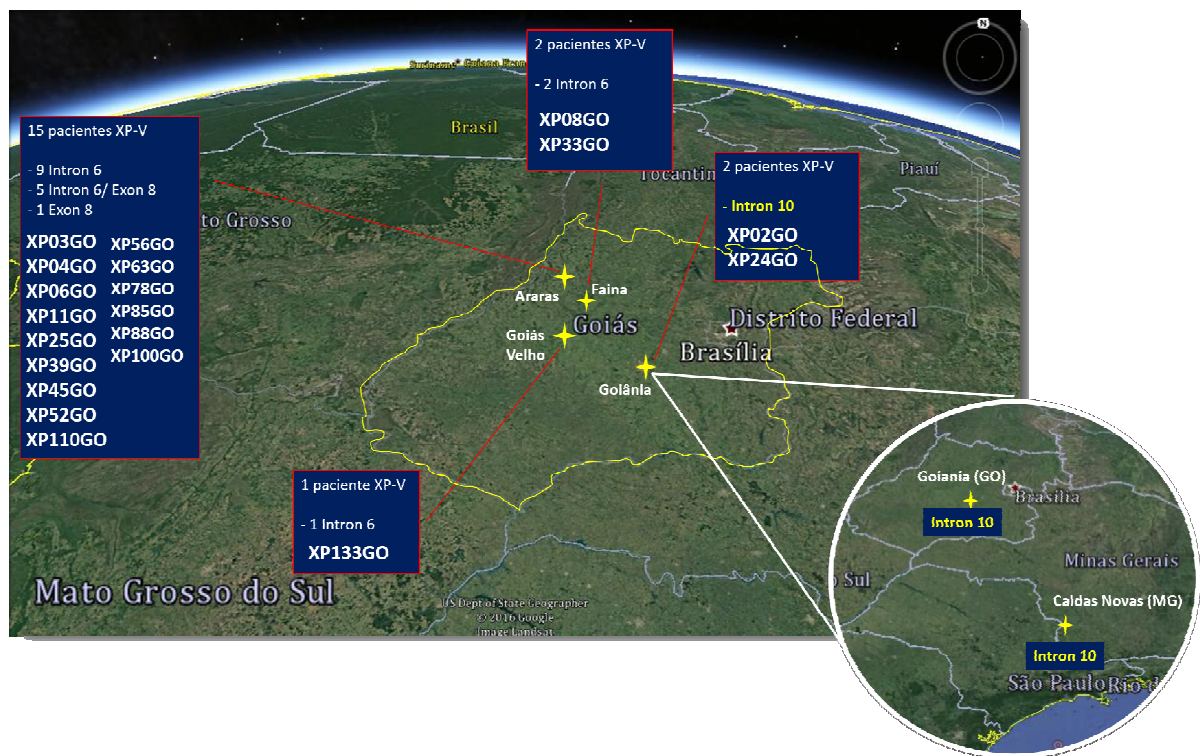
Assim como para as mutações do intron 6 e exon 8, desenhamos sondas Taqman® para genotipagem da mutação do intron 10. A partir desse momento, todas as amostras de saliva

de pacientes com fenótipo de XP leve, encaminhadas ao laboratório de Reparo de DNA, foram testadas por Taqman® para as três mutações previamente identificadas no gene *POLH*, e sendo essas negativas as amostras foram encaminhadas para sequenciamento de nova geração (NGS), utilizando um painel de Genes de Reparo para preparo da biblioteca.

Inicialmente três novas amostras de saliva, de pacientes do estado de Goiás, foram testadas com sondas para a mutação no intron 6, exon 8 e intron 10. O DNA da amostra de saliva do paciente XP133GO, da Cidade de Goiás, foi genotipado como homocigoto para mutação do intron 6. Segundo relatos do paciente, não existe parentesco direto com paciente da comunidade de Araras. Porém, o fato desse paciente ter a pele negra, como os pacientes de Araras e Faina também homocigotos para o intron 6, nos leva a sugerir que provavelmente exista um ancestral comum entre essas famílias.

Os outros dois pacientes, XP02GO e XP24GO (irmãos), residentes em Goiânia, curiosamente foram genotipados como selvagens para as duas mutações, do intron 6 e exon 8, do estado de Goiás. Entretanto, foram caracterizados como homocigotos para a mutação do intron 10, identificada no paciente de Minas Gerais, XP05MG. Segundo relatos do paciente XP02GO, há recordação de seus bisavôs terem vindo de Minas Gerais para Goiânia. O paciente também relatou ser filho de casamento consanguíneo sem recordações de ancestrais com XP na família. Esse paciente e sua irmã, nascidos em 1952 e 1947, possuem a pele bem clara e, apesar da idade avançada, os sintomas clínicos são brandos com relação aos pacientes XP-V nessa idade. É importante ressaltar que desde jovem o paciente XP02GO percebendo sua sensibilidade ao sol passou a trabalhar de motorista de ambulância no período noturno, provavelmente o cuidado em não se expor ao sol o preveniu de sintomas clínicos mais graves.

Assim, a partir das sondas desenhadas para as três novas mutações no gene *POLH* (intron 6, exon 8 e do intron 10) pudemos identificar a distribuição dessas no estado de Goiás, assim como a presença desse alelo em um paciente de Minas Gerais, como mostra a figura 14 a seguir.



**Figura 14 - Mapa da distribuição dos três alelos mutado, c.764+1 G>A (intron 6), c.907 C>T (exon 8) e c.1249-1 G>A (intron 10) no gene POLH no estado de Goiás. Foram identificados até o momento vinte pacientes XP-V em Goiás, 12 homocigotos para o alelo intron 6, cinco heterocigotos compostos para intron 6 e exon 8, um homocigoto para o exon 8 e dois homocigotos para o intron 10. O alelo intron 10 foi identificado inicialmente em um paciente de Poços de Caldas, Minas Gerais (XP05MG).**

Devido aos resultados iniciais obtidos em Goiás e possibilidade de desenvolvimento de diagnóstico molecular através de NGS, nosso grupo passou a aceitar amostras de saliva de pacientes de várias localidades do Brasil. Sendo assim, participamos no desenvolvimento de um painel de genes de reparo para investigar outros possíveis genes envolvidos nos fenótipos desses pacientes. Atualmente, esse painel abrange 48 alvos com um total de 372 kpb do genoma humano (Tabela 7).

Tabela 7 - Painel de genes de reparo para identificação de variantes genéticas em pacientes com deficiência em reparo de DNA.

Painel de Genes de Reparo			
Chr	Gene	Chr	Gene
1	PARP1	10	ERCC6/CSB
2	ERCC3/XPB	11	DDB1
2	XRCC5	11	DDB2/XPE
3	XPC	11	MRE11A
3	FANCD2	11	ATM
3	POLQ	13	ERCC5/XPG
3	ATR	13	BRCA2
4	KIAA1530/UVSSA	14	XRCC3
5	ERCC8/CSA/CKN1	16	ERCC4/XPF
5	POLK	16	FANCA
5	XRCC4	16	USP7
6	POLH/XPV	17	BRCA1
6	GTF2H5/TTD	17	TP53
7	XRCC2/FANCU	17	POLR2A
7	MPLKIP/TTDN1	18	POLI
8	POLB	19	ERCC2/XPD
8	PRKDC/DNAP-k	19	ERCC1
9	XPA	19	XRCC1
9	FANCC	20	PCNA
9	FANCG	22	XRCC6/KU70

#### 2.4.4 Caracterização genética de novos pacientes brasileiros

Dezenove amostras de saliva provenientes de 17 afetados e dois indivíduos não afetados, foram sequenciadas para identificação das mutações responsáveis pelo fenótipo dos pacientes. Entre essas amostras treze pacientes foram diagnosticados clinicamente como XP; outros fenótipos além de XP foram incluídos em nossa pesquisa, sendo três com Tricotodistrofia (TTD) e um com Síndrome de Cockayne (CS).

A análise do sequenciamento partiu do alinhamento das sequências geradas utilizando o *software* BWA v0.7.12, tendo como referência o genoma humano hg19. O arquivo gerado (.bam) foi analisado pela interface *web* Human Variants Finder <http://varfinderhg.com.br>, desenvolvida durante o mestrado da aluna Ms. Lívia Moura em nosso laboratório. Essa interface, a partir do arquivo de alinhamento, gera uma planilha de variantes encontradas na amostra, a qual foi usada no estudo para identificar a mutação responsável pelo fenótipo de

cada paciente.

Como explicado em Materiais e Métodos, a estratégia para identificação da possível mutação candidata ao fenótipo dos pacientes partiu da busca por variantes que alterassem a função de um gene, tais como: deleções, inserções, trocas de nucleotídeos não-sinônimas ou que afetassem regiões de *splicing*. As mutações classificadas como P (patogênicas) ou PI (Patogenicidade Incerta) seguiram os seguintes critérios: P- aquelas que foram preditas computacionalmente com alteração na função do gene, não está relatada na literatura como polimorfismo (SNP) ou que já foi descrita na literatura com associação ao fenótipo clínico em questão, PI- para alterações preditas ou não como deletérias na função do gene, depositadas nos bancos de dados como polimorfismo ou em heterozigose sem associação com uma segunda mutação no mesmo gene.

Para os 17 pacientes estudados identificamos dezesseis mutações; uma no gene *XPA*, seis no gene *XPC*, duas no gene *ERCC2* (*XPB*), quatro no gene *POLH* (*XPV*), uma no gene *DDB2* (*XPE*) e duas alterações no gene *ERCC6* (*CSB*), como mostra a tabela 8 a seguir.

**Tabela 8 - Mutações candidatas para os fenótipos dos 17 pacientes estudados, sendo treze XP, três TTD e um CS.**

	Gene	Amostra	Síndrome	Grupo	Etnicidade	Chr	Genótipo	Região	Variação	Classificação*	Genômico	Proteína	Literatura
1	XPA	XP137GO	XP	XP-A	Ipameri (GO)	9	Homozigose	Exon 5	Parada de Leitura	P	c.C646T	p.Q216X	nova
2	XPC	XP141GO	XP	XP-C	Iporá (GO)	3	Homozigose	Exon 9	Deleção	P	c.1108delG	p.E370fs	nova
3	XPC	XP01PE	XP	XP-C	Recife (PE)	3	Heterozigose	Exon 10	Parada de Leitura	P	c.G1969T	p.E657X	Leite et al 2009
								Exon 15	Deleção	P	c.2564delT	p.L855fs	nova
4	XPC	XP140GO	XP	XP-C	Silvânia (GO)	3	Heterozigose	Exon 13	Troca Não sinônima	PI	c.G2404A	p.G802S	rs200148127
								-	-	-	-	-	-
5	XPC	XP02TO	XP	XP-C	Natividade (TO)	3	Heterozigose	Intron 6	<i>Splicing</i>	P	c.780-2A>T	-	nova
								Intron 5	<i>Splicing</i>	P	c.621+1G>A	-	nova
6	ERCC2 (XPD)	TTD02SP	TTD	XP-D	São Paulo (SP)	19	Heterozigose	Intron 10	<i>Splicing</i>	P	c.949+5G>A	-	nova
								Exon 18	Troca Não sinônima	P	c.T1742C	p.L581P	nova
7	POLH (XPV)	XP136GO	XP	XP-V	Jataí (GO)	6	Homozigose	Exon 5	Parada de Leitura	P	c.C638G	p.S213X	nova
8	POLH (XPV)	XP01RN	XP	XP-V	São João do Sabugi (RN)	6	Homozigose	Exon 5	Parada de Leitura	P	c.C638G	p.S213X	nova
9	POLH (XPV)	XP01BA	XP	XP-V	Salvador (BA)	6	Heterozigose	Exon 6	Inserção	PI	c.672_673insT	p.K224fs	nova
								-	-	-	-	-	-
10	POLH (XPV)	XP11	XP	XP-V	São Paulo (SP)	6	Homozigose	Exon 5	Troca Não sinônima	P	c.A571C	p.T191P	nova
11	POLH (XPV)	XP28	XP	XP-V	São Paulo (SP)	6	Homozigose	Exon 5	Troca Não sinônima	P	c.T634C	p.C212R	nova
12	DDB2 (XPE)	XP03AM	XP	XP-E	Manaus (AM)	11	Homozigose	Exon 7	Troca Não sinônima	P	c.C1003T	p.Q335X	nova
13	ERCC6 (CSB)	CS01RS	CS	CSB	Porto Alegre (RS)	10	Heterozigose	Exon 18	Troca Não sinônima	PI	c.A3637G	p.R1213G	rs2228527
								Exon21	Troca Não sinônima	PI	c.A4238G	p.Q1413R	rs2228529
14	-	XP01TO	XP	-	Ponte Alta do Tocantins (TO)	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	TTD01SP	TTD	XP-D	São Paulo (SP)	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	TTD01ES	TTD	XP-D	Vitória (ES)	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	XP05AM	XP	-	Manaus (AM)	-	-	-	-	-	-	-	-

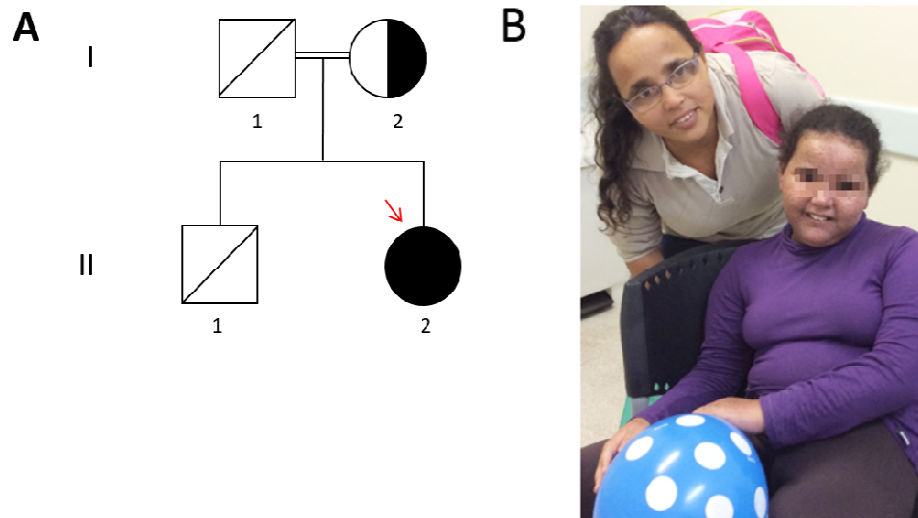
\* **P** de Patogênica e **PI** de Patogenicidade Incerta

## *Paciente XP-A; XP137GO*

A paciente XP137GO nasceu em 2004 na cidade de Ipamerí (GO). A paciente é filha de casamento consanguíneo de 2º grau, tem deficiência motora, nunca falou, apresenta dificuldades para caminhar, possui as pernas um pouco torta sendo necessário o uso de botas com suporte para ajudá-la. Em 2015 fez uma cirurgia no pé para corrigi-lo. Tem problemas auditivos, deficiência intelectual, microcefalia, hiperpigmentação da pele e fotossensibilidade (Figura 15). Entre 2008 e 2013 a paciente retirou 23 lesões na pele, 14 na região da cabeça, três no tronco e seis nos membros. Dentre essas lesões; seis carcinomas basocelulares (CBC), um carcinoma espinocelular (CEC) e seis nevus melanocíticos.

Os primeiros sintomas surgiram aos 2 meses com o aparecimento de sardas no rosto e aos 5 meses no corpo todo. O que fez a mãe ir em busca de médicos foi o fato da pele da criança descamar muito. O primeiro pediatra, em Uberlândia (a uma distância de 170 km de Ipamerí) receitou o uso da pomada Trok<sup>®</sup>, a base de cetoconazol indicado para o tratamento de dermatoses inflamatórias. Após o uso não resolver o problema da descamação, a mãe procurou outro pediatra para a filha, dessa vez o diagnóstico foi de celulite facial. Aos cinco meses surgiu a primeira lesão na bochecha, segundo a mãe como uma pinta escura e com sangue. O primeiro diagnóstico clínico foi feito por um oftalmologista, já no Hospital das Clínicas em Goiânia que olhando a pele pigmentada, o problema neurológico e motor da criança chegou ao diagnóstico de XP/CS.

Desde o diagnóstico e compreensão da doença, a mãe tem feito uso constante de protetor solar na filha. De 2013 até hoje não foram feitas mais cirurgias de retirada de lesões. A mãe tem feito uso tópico de Imiquimod<sup>®</sup> nas lesões que têm surgido e relata que as mesmas desaparecem, em média, após um mês de uso.



**Figura 15** - A. Heredograma da família da paciente XP137GO (II.2), homozigota para p.Q216X no gene XPA e sua mãe GO138 (I.2), portadora da mutação. O pai da paciente é falecido e amostra do irmão não foi coletada B. Foto da mãe e filha, com estatura normal e leve hiperpigmentação da pele nas regiões mais expostas ao sol.

A análise dos dados de sequenciamento nos indicou como mutação candidata, uma troca de nucleotídeo, C/T no exon 5 ainda não descrita pela literatura (c.C646T), que caracteriza uma parada de leitura do gene XPA (NM\_000380) no aminoácido 216, p.Q216X (figura 16). Como é possível observar nessa figura, a amostra GO138 (mãe da paciente XP137GO) apresenta a mesma mutação em heterozigose.



**Figura 16** - Imagem do alinhamento na região da mutação c.C646T, p.Q216X, para a amostra afetada XP137GO (homozigota), e sua mãe, não afetada GO138 (heterozigota). As barras cinzas representam a leitura da região sequenciada.



A família da mãe da paciente é do município de Canápolis (Bahia) e se mudou para Ipamerí (GO) antes do nascimento da filha, onde moram atualmente e possuem acompanhamento e atendimento no Hospital das Clínicas de Goiânia.

### *Pacientes XP-C; XP141GO, XP01PE e XP02TO;*

#### **- PACIENTE XP141GO**

O paciente, nascido em 1995 na cidade de Iporá (GO) e residente em Rio Verde (GO), tem a pele negra (fototipo V) e extremamente afetada por lesões e cirurgias. Segundo ele seus pais eram primos de primeiro grau e além dele tem uma irmã também afetada. O paciente (Figura 17) tem se tratado no Hospital das Clínicas em Goiânia. Entre 2008 e 2014 foram realizadas 41 cirurgias, entre essas, 14 carcinomas espinocelular (CEC), 13 basocelular (CBC) e três melanomas.



**Figura 17** - Foto do paciente XP141GO ao lado de sua esposa e filha. O paciente já fez muitas cirurgias para retirada de tumores.

A análise do sequenciamento indicou como candidata à mutação responsável pelo fenótipo do paciente uma deleção em homozigose no gene XPC (NM\_004628), c.1108delG no exon 9, ainda não descrita na literatura (figura 18). Essa deleção promove uma mudança de quadro de leitura, com a codificação predita de uma proteína truncada (p.E370fs).

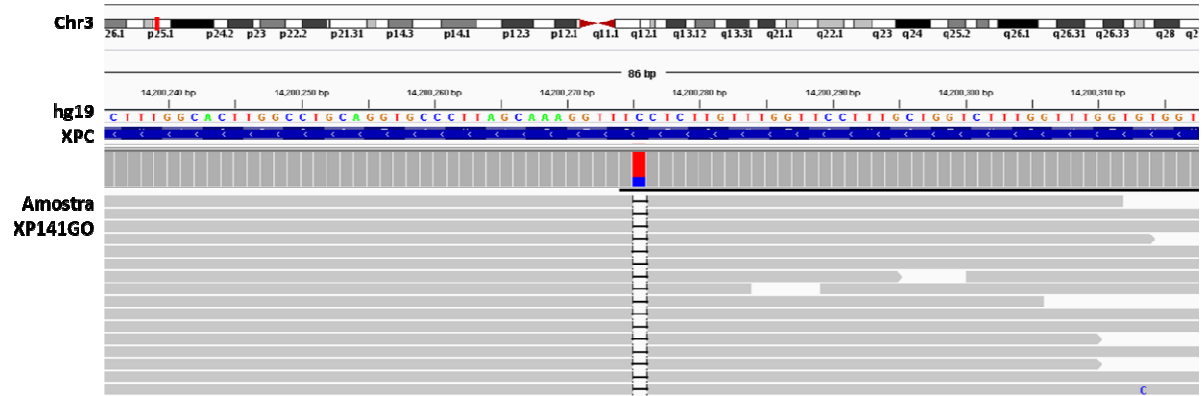


Figura 18 - Imagem do alinhamento na região da mutação c.1108delG, p.E370fs, identificada na amostra do paciente XP141GO. Uma deleção em homozigose no gene XPC (exon 9). As barras cinzas representam a leitura da região sequenciada, em vermelho a posição da base excluída.

### - PACIENTE XP01PE

A paciente, nasceu em 2001, fototipo IV, não há relato de casamento consanguíneo entre os pais, seu primeiro diagnóstico foi aos dois anos, tendo seus primeiros sintomas com um ano e seis meses.

Segundo o médico que a acompanha, Dr. Amadeus Caldas, os sintomas iniciaram com o surgimento de lesões pigmentares em áreas fotoexpostas e queimaduras solares. A criança teve o primeiro tumor de pele aos 2 anos, porém a mãe não sabe informar o tipo, uma vez que não possui os laudos e resumos de alta. Já teve seis CBC, dois CEC e nenhum caso de melanoma. Além das lesões, apresenta xeroses, rarefação capilar, alterações oftalmológicas como pterígio, xeroftalmia e fotofobia intensa. Segundo o médico, haviam lesões bilaterais na porção nasal da córnea e já foram tratados tumores palpebrais basocelulares.

Na amostra XP01PE foram identificadas duas variantes em heterozigose no gene *XPC*, que devem comprometer sua função: uma inserção que desloca o quadro de leitura da proteína (*frameshift*), c.2564delT, p.L855fs, e uma troca de nucleotídeo que caracteriza uma parada de leitura, c.G1969T, p.E657X (Figura 19). Apenas a segunda mutação já foi descrita em um paciente de São Paulo e caracterizada pelo trabalho de Leite e colaboradores (82).

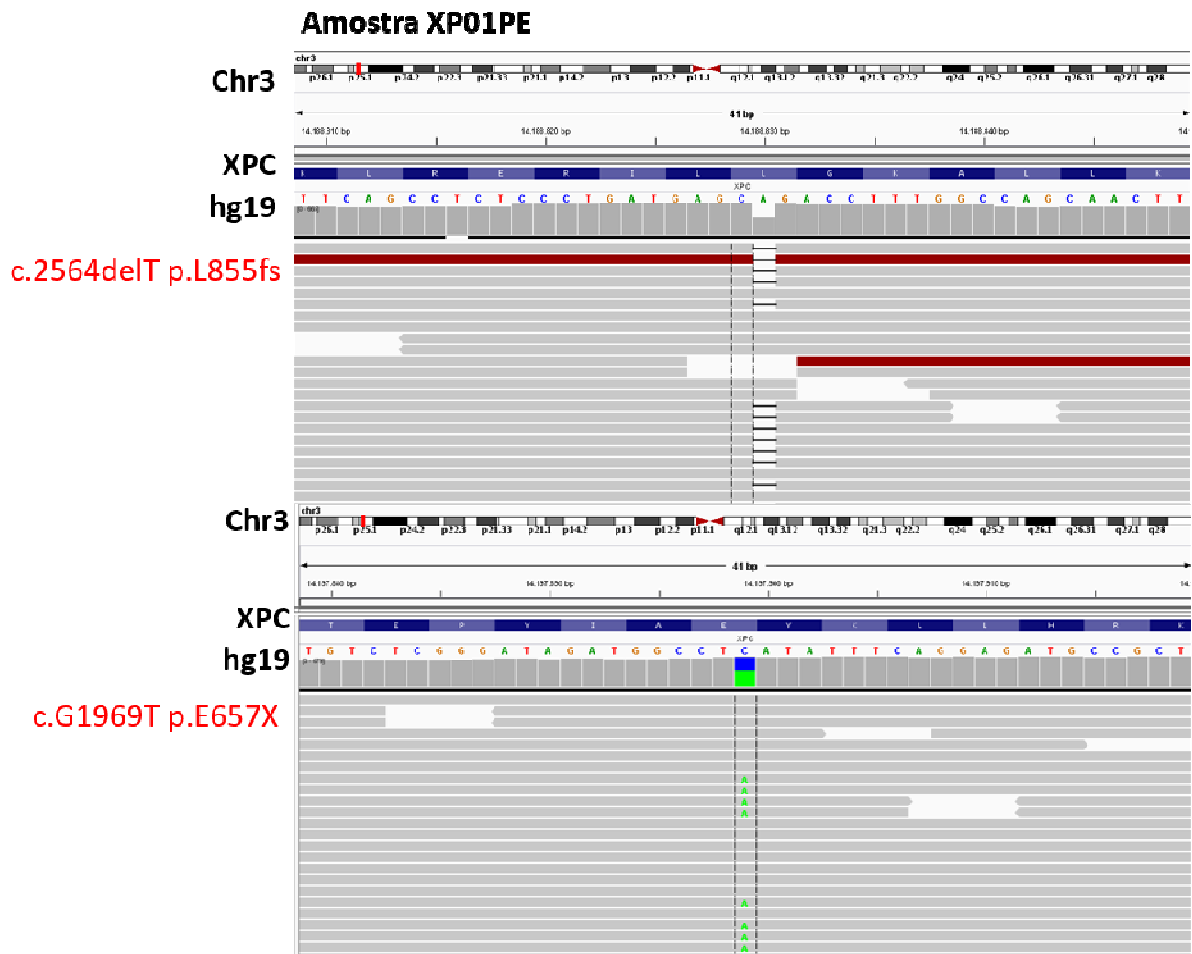


Figura 19 - Imagem do alinhamento na região das mutações c.G1969T [p.E657X] e c.2564delT [p.L855fs] da amostra XP01PE. A paciente é heterozigota composta para as alterações que codificam; uma parada de leitura no aminoácido 657 e deleção que altera o *frame* de leitura do mRNA do gene XPC. As barras cinzas representam a leitura da região sequenciada.

#### - PACIENTE XP02TO

A paciente XP02TO, fototipo IV, nascida em 2008 em Natividade (TO), teve seus primeiros sintomas aos três meses de idade quando começou a apresentar vermelhidão na pele ao se expor ao sol, o que resultou em um aumento de pigmentação nessas regiões (Figura 20). A paciente possui pele seca, com muitas manchas e queratoses actínicas, não há conhecimento de casos anteriores entre familiares e não há relato de casamento consanguíneo. Aos 16 anos já retirou muitos tumores, o primeiro melanoma foi retirado aos 5 anos de idade. Durante um atendimento da SBD em Araras, foram retiradas algumas lesões da paciente, sendo sete melanomas. No exame de ressonância magnética do cérebro não foi observada nenhuma anormalidade e não há descrição de atraso no desenvolvimento cognitivo da paciente.



**Figura 20** - Foto da paciente XP02TO. Em A e B foto de uma lesão da paciente na região da face e em C e D regiões expostas ao sol com hiper e hipopigmentação da pele, extremamente seca e fotossensível.

A análise do sequenciamento da amostra nos indicou duas mutações em heterozigose em sítio de *splicing* no gene XPC, c.621+1G>A (intron 5) e c.780-2A>T (intron 6), ambas ainda não descritas na literatura.

### *Paciente XP-D/TTD; TTD02SP*

Com um quadro clínico bem diferente dos pacientes citados acima, recebemos uma amostra de paciente com diagnóstico de TTD, TTD02SP. Uma criança de 10 anos, sem fotossensibilidade, com “fio de cabelo de tigre”, ralo, pequeno e quebradiço, característico do fenótipo de TTD. Dentro dos genes envolvidos com a síndrome e que fizeram parte do nosso painel de genes de reparo estão as duas subunidades do fator de transcrição TFIIH, *ERCC2* (XPD) e *ERCC3* (XPB), *GTF2H5* (TTDA) e *MPLKIP* (TTDN1). Nenhuma alteração foi encontrada no gene MPLKI e das variações encontradas nos genes alvos a única não sinônima dentro de uma região codificante está no gene *ERCC2*, em heterozigose, que encontramos uma troca de nucleotídeo no exon 18, c.T1742C, p.L581P (tabela 9).

Tabela 9 - Variantes finais encontradas para amostra nos genes, *ERCC2* (*XPB*), *ERCC3* (*XPB*) e *GTF2H5* (*TTD*) para amostra TTD02SP. Em vermelho as variantes candidatas no gene *ERCC2*.

Gene	Chr	Posição	dbSNP_ID	Ref.	Alt	Região	Genótipo	Alteração	RefSeq_ID	EXON	cDNA	Proteína	CLINVAR	#ESP6500
<b>ERCC2</b>	<b>chr19</b>	<b>45867239</b>	.	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>intrônica</b>	<b>het</b>	-	-	-	<b>c.949+5G&gt;A</b>	-	-	<b>0</b>
ERCC2	chr19	45856468	rs238417	G	C	intrônica	het	-	-	-	-	-	-	0.6785
<b>ERCC2</b>	<b>chr19</b>	<b>45856516</b>	.	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>exônica</b>	<b>het</b>	<b>não sinônima</b>	<b>NM_000400</b>	<b>exon18</b>	<b>c.T1742C</b>	<b>p.L581P</b>	-	<b>0</b>
ERCC3	chr2	128050134	rs4150402	T	C	intrônica	hom	-	-	-	-	-	-	0.7365
ERCC3	chr2	128050000	rs4150404	A	G	intrônica	hom	-	-	-	-	-	-	0
ERCC3	chr2	128018192	rs1566823	A	G	intrônica	hom	-	-	-	-	-	-	0
ERCC3	chr2	128015367	rs4662718	C	T	intrônica	hom	-	-	-	-	-	-	0
ERCC3	chr2	128047998	rs112272587	C	T	intrônica	het	-	-	-	-	-	-	0
GTF2H5	chr6	158591619	rs6931532	T	G	intrônica	het	-	-	-	-	-	-	0.0701
GTF2H5	chr6	158615926	rs1019682	A	T	UTR3	hom	-	NM_207118	-	c.*2737A>T	-	-	0
GTF2H5	chr6	158613374	rs3841147	TA	T	UTR3	het	-	NM_207118	-	c.*186delA	-	-	0
GTF2H5	chr6	158616335	rs10946159	A	C	UTR3	het	-	NM_207118	-	c.*3146A>C	-	-	0
GTF2H5	chr6	158613603	rs4425618	A	C	UTR3	het	-	NM_207118	-	c.*414A>C	-	-	0
GTF2H5	chr6	158618449	.	G	GA	UTR3	het	-	NM_207118	-	c.*5260_*5261in	-	-	0
GTF2H5	chr6	158616173	rs72413565	C	CT	UTR3	het	-	NM_207118	-	c.*2984_*2985in	-	-	0
GTF2H5	chr6	158619409	rs599345	G	A	UTR3	hom	-	NM_207118	-	c.*6220G>A	-	-	0
GTF2H5	chr6	158616727	rs1047876	C	T	UTR3	het	-	NM_207118	-	c.*3538C>T	-	-	0
GTF2H5	chr6	158589373	rs77941623	G	A	upstream	het	-	-	-	-	-	-	0

A análise com as ferramentas SIFT, Provean e MutationTaster mostrou que a troca c.T1742C [p.L581P] é potencialmente deletéria para função da proteína XPD. A lisina 581 é um aminoácido extremamente conservado fazendo parte do domínio Helicase da proteína (Figura 21). Uma segunda mutação intrônica, também em heterozigose, c.949+5G>A, foi indicada como mutação candidata. Pela análise da ferramenta *Human Splicing Finder* a alteração leva à mudança no padrão de processamento do mRNA do gene. Portanto, consideramos que essas duas mutações, no gene *ERCC2*, são potencialmente responsáveis pelo fenótipo observado.

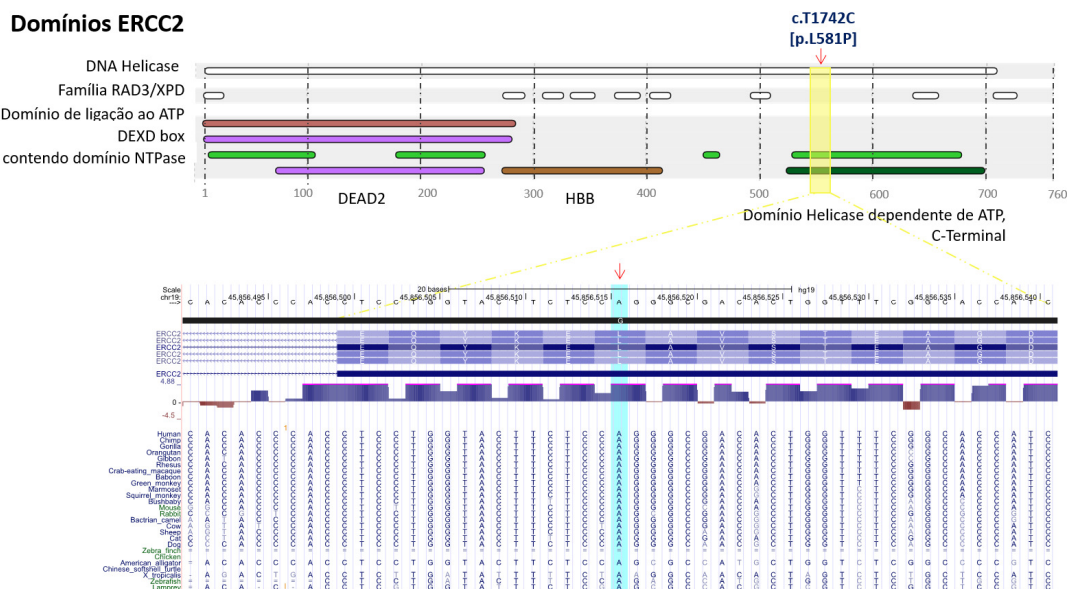
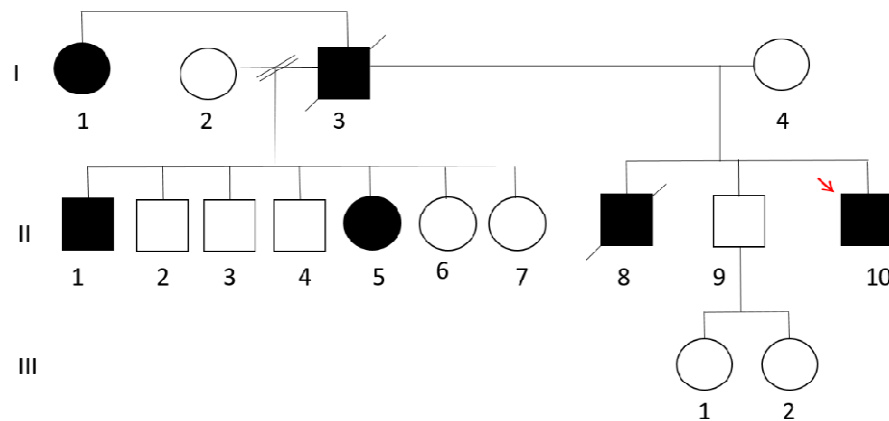


Figura 21 - Região conservada da proteína XPD (Uniprot, P18074), indicando a alteração no domínio helicase com provável alteração na função da proteína.

### Pacientes XP-V; XP136GO e XP01RN

O sequenciamento das amostras dos pacientes XP136GO e XP01RN indicou que ambas possuem a mesma mutação no gene *POLH*: uma troca não sinônima de C>G no nucleotídeo 638 (exon 5). XP136GO nasceu na cidade de Jataí (GO) e tem 42 anos. Segundo seu médico em Goiânia, Dr. Luís Fernando do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), a paciente não tem nenhum sinal de neurodegeneração, possui fotossensibilidade e já teve caso de melanoma. O paciente XP01RN, 34 anos, tem a vista muito comprometida e aos 9 anos já teve os primeiros sintomas de XP com o aparecimento de um caroço na região da pálpebra do olho. Após a primeira cirurgia, aos 10 anos para excisão de uma lesão na pálpebra, todos os anos passou por cirurgias para retirada de lesões na pele, CBC e CEC, sempre na região da face e dorso. Como mostra o heredograma na figura 22, o paciente é filho de um segundo casamento e relata que sua tia (I.1) tem XP, assim como seu pai (I.3), que faleceu aos 92 anos. No primeiro casamento seu pai teve 2 filhos com XP (II.1 e II.5) e no segundo mais dois filhos com XP, ele (II.10) e um irmão (II.8), falecido aos 26 anos de idade (Figura 22).



**Figura 22** - Genealogia do paciente XP01RN (II.10) do Rio Grande do Norte. O paciente relata que seu irmão (II.8) também era XP, chegou a fazer quimioterapia e faleceu aos 26 anos de idade.

A mutação encontrada nos pacientes ainda não está descrita nos bancos de dados, uma substituição de base de C para G em homozigose, c.C638G, que gera um códon de parada de leitura na proteína, p.S213X (Figura 23). O paciente de Goiás relata ter parentes em

Correntina, Bahia. Assim, é possível que a origem desse alelo seja única, com efeito fundador na região do Nordeste do país.

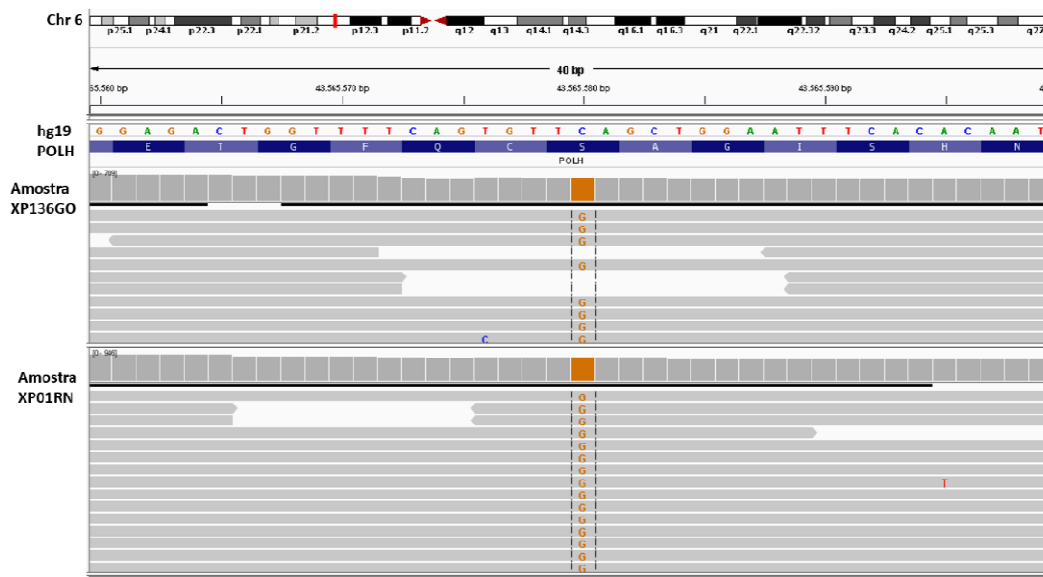
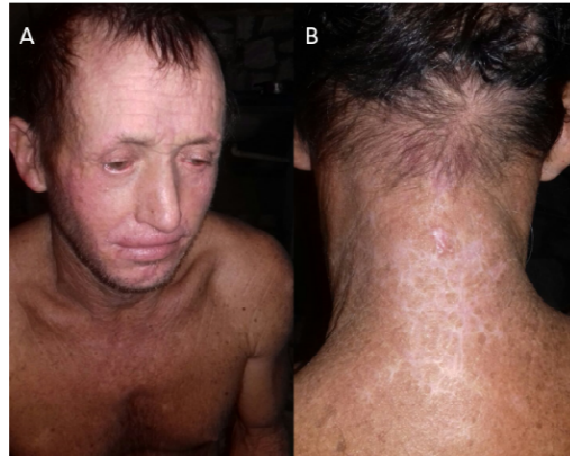


Figura 23 - Alinhamento do sequenciamento das amostras XP136GO e XP01RN na região do gene da POLH (chr6: g.43560580, c.C638G, p.S213X). Os dois pacientes, de Goiás e do Rio Grande do Norte, respectivamente, com a mesma mutação.

## *Pacientes com variantes de Patogenicidade Incerta (PI)*

### -PACIENTE XP140GO

O paciente de Silvânia (GO), tem 43 anos, a pele bem clara e extremamente seca (Figura 24). A amostra deste paciente foi coletada em outubro de 2015 em um mutirão realizado pela Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD) em Araras, GO. Durante o evento foram realizadas consultas, exames e algumas cirurgias, como o caso no paciente XP140GO, em que foi retirado um nevo melanocítico displásico do coro cabeludo.



**Figura 24** – A. Paciente XP140GO com fenótipo ameno apesar da pele bem clara e extremamente seca. B. Nuca do paciente, onde já havia retirado uma lesão anteriormente.

O sequenciamento da amostra do paciente indicou uma alteração em heterozigose, uma troca de nucleotídeo não sinônima que potencialmente altera a funcionalidade da proteína XPC, c.G2404A, p.G802S. De todas as mutações identificadas nesse gene, como mostra a tabela 10, a única que poderia justificar alguma patogenicidade seria essa troca não sinônima.

**Tabela 10 - Alterações encontradas no gene XPC do paciente XP140GO, em vermelho a alteração candidada.**

Gene	chr3	Posição	rs_ID	Região	Genótipo	Alteração	Gene_ID	Exon	cDNA	Proteína	Provean	SIFT	CLINVAR	#ESP6500
XPC	chr3	14186757	rs1126547	UTR3	hom	-	NM_004628	-	c.*684G>C	-	-	-	-	0
XPC	chr3	14189147	rs2257984	intronic	het	-	-	-	-	-	-	-	-	0
XPC	chr3	14187345	rs2229090	UTR3	het	-	NM_004628	-	c.*96C>G	-	-	-	-	0
XPC	chr3	14190237	rs2279017	intronic	het	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6353
XPC	chr3	14199887	rs2228000	exonic	het	Não Sinônima	NM_004628	exon9	c.C1496T	p.A499V	Neutra	Tolerável	sim	0.2006
XPC	chr3	14187449	rs2228001	exonic	het	Não Sinônima	NM_004628	exon16	c.C2815A	p.Q939K	Neutra	Tolerável	-	0.6421
XPC	chr3	14190078	rs200148127	exonic	het	Não Sinônima	NM_004628	exon13	c.G2404A	p.G802S	Deletéria	Não Tolerável	sim	0.0004
XPC	chr3	14197987	rs2958057	exonic	hom	Sinônima	NM_004628	exon10	c.T1881A	p.A627A	-	-	-	0

Assim, é bastante provável que este seja um paciente XP-C, porém será necessário identificarmos a segunda mutação no mesmo gene para que se justifique as alterações no gene *XPC* como responsáveis pelo fenótipo do paciente. É possível que uma análise menos restrigente durante a filtragem dos polimorfismos nos responda essa questão.

## - PACIENTE XP01BA

A Paciente XP01BA (24 anos) que, segundo a Dra. Joanna Meira, médica geneticista que trabalha na área de Genética do Hospital das Clínicas em Salvador (BA), possui um quadro de carcinomas recorrentes de pele desde os 17 anos, sendo que, no último ano, a frequência de



aparecimento dos mesmos aumentou, assim como a necessidade de exérese e análise histopatológica das lesões. Até o momento, já foram retiradas mais de 10 lesões malignas, dentre CBC, CEC e um melanoma em fase inicial, aos 21 anos. As principais regiões de acometimento são nas áreas fotoexpostas. Refere ainda que as lesões aparecem subitamente, já sob a forma de pequenas feridas. Com o sequenciamento da amostra, identificamos no gene *POLH*, em heterozigose, a inserção de um T no exon 6, c.672\_673insT, que gera um *frameshift* durante a leitura desse mRNA desse gene, p.K224fs (Tabela 11).

**Tabela 11 – Variantes encontradas na paciente XP01BA com frequência alélica menor que 0,5. Em vermelho indicado a alteração candidata.**

Gene	Chr	Posição	rs_ID	Região	Genótipo	Varição	Gene_ID	Exon	cDNA	Proteína	Clinvar
ATM	11	108183167	rs659243	exon	hom	não sinônima	NM_000051	exon40	c.A5948G	p.N1983S	sim/Benigna
FANCA	16	89849480	rs2239359	exon	hom	não sinônima	NM_000135	exon16	c.G1501A	p.G501S	sim/Benigna
FANCA	16	89836323	rs7195066	exon	hom	não sinônima	NM_000135	exon26	c.G2426A	p.G809D	sim/Não testado
FANCD2	3	10088343	rs73126218	exon	het	não sinônima	NM_001018115	exon15	c.A1214G	p.N405S	-
FANCG	9	35075969	rs4986939	exon	het	não sinônima	NM_004629	exon9	c.C1133T	p.S378L	sim/Não testado
MRE11A	11	94203652	s11524441	exon	het	não sinônima	NM_005590	exon9	c.C1002G	p.S334R	sim/Benigna
<b>POLH</b>	<b>6</b>	<b>43568736</b>	.	<b>exon</b>	<b>het</b>	<b>inserção/frameshift</b>	<b>NM_001291969</b>	<b>exon6</b>	<b>c.672_673insT</b>	<b>p.K224fs</b>	-
XPA	9	100437789	rs3176750	exon	het	não sinônima	NM_000380	exon6	c.C754G	p.L252V	sim/Benigna

Porém, será necessário estudarmos melhor o gene em questão na busca de uma provável segunda mutação em heterozigose no mesmo gene, cuja alteração comprometa o funcionamento da proteína e justifique o fenótipo da paciente. Um segundo sequenciamento dessa amostra será necessário para identificarmos esse segundo alelo.

## -PACIENTE CS01RS

Duas amostras de DNA, de pacientes do Rio Grande do Sul, com fenótipo CS foram enviadas ao laboratório para sequenciarmos e identificarmos a mutação responsável pela síndrome. Até o momento sequenciamos uma dessas amostras, CS01RS. Ainda não temos o detalhamento do diagnóstico clínico, sabemos que o paciente CS01RS nasceu em 1998 em Três Passos (RS), tem a pele seca, com poucas manchas e não há relato de fotofobia. Em 2014, aos 16 anos pesa 30 kg com 1,40 cm de altura. Não existem casos anteriores na família.

O fenótipo de CS já foi descrito com mutações nos genes *ERCC6* (CSB), *ERCC8* (CSA), *ERCC2* (XPD), *ERCC3* (XPD) e *ERCC5* (XPG). Avaliando as variantes desses genes, com frequência alélica menor que 0,5, foi possível selecionar algumas variantes para estudo. Uma variante no gene *ERCC5* (XPG) que, apesar de predita com deletéria e prejudicial pelos

programas provean e sift, foi descrita como benigna em um estudo com 681 indivíduos saudáveis na população (96). O estudo de todas as variantes encontradas no gene, tanto intrônicas, como em regiões 5' e 3' UTR não identificou nenhuma outra alteração que poderia estar em heterozigose composta com c.A760G [p.M254V] e justificar uma possível associação com o fenótipo do paciente. Encontramos também variantes no gene *ERCC2*, duas alterações não sinônimas, porém ambas já encontradas, juntas, em pacientes com fenótipos XP e TTD sequenciados por nós, além de serem descritas como polimorfismos da população (Tabela 12).

A análise do sequenciamento nos indicou, em heterozigose, as trocas não sinônimas no gene *ERCC6*, c.A3637G [p.R1213G] e c.4238G [p.Q1413R], como mostra a tabela 12 a seguir. A primeira foi predita como deletéria pelo programa Provean, mas como tolerada pelo programa Sift, e a segunda foi considerada neutra e tolerada. As duas foram descritas como associadas à um aumento na frequência de CBC em um estudo feito com 900 pacientes com câncer de pele (CEC e CBC) e comparação a 900 pessoas sem câncer (96). Além disso, essas alterações não foram encontradas em nenhum dos 12 pacientes sequenciados neste trabalho. Sendo assim, neste caso há uma clara indefinição do gene responsável pela síndrome, tendo o gene *ERCC6* como candidato, porém sem clareza se essas variantes, c.A4238G [p.Q1413R] e c.A3637G [p.R1213G] são realmente patogênicas.

**Tabela 12 - Variantes encontradas para a amostra do paciente CS01RS. Dos prováveis genes responsáveis pelo fenótipo CS; *ERCC6* (CSB), *ERCC8* (CSA), *ERCC2* (XPD), *ERCC3* (XPB) e *ERCC5* (XPG) e com frequência alélica menor que 0,5.**

Gene	Chr	Posição	dbSNP	Região	Genótipo	Varição	Exon	cDNA	Proteína	Provean	Sift	Mutation Taster	ClinVar
BIVM-ERCC5,ERCC5	13	103513944	rs1047769	exon	het	não sinônima	exon7	c.A760G	p.M254V	Deleteria	Prejudicial	Polimorfismo	sim/Benigna
ERCC2	19	45854919	rs13181	exon	het	não sinônima	exon23	c.A2251C	p.K751Q	Neutra	Tolerada	Polimorfismo	sim/não testado
ERCC2	19	45867259	rs1799793	exon	het	não sinônima	exon10	c.G934A	p.D312N	Deleteria	Tolerada	Polimorfismo	sim/não testado
ERCC6	10	50667105	rs2228529	exon	het	não sinônima	exon21	c.A4238G	p.Q1413R	Neutra	Tolerada	Polimorfismo	sim
ERCC6	10	50678717	rs2228526	exon	het	não sinônima	exon18	c.A3289G	p.M1097V	Neutra	Tolerada	Polimorfismo	sim/Benigna
ERCC6	10	50678369	rs2228527	exon	het	não sinônima	exon18	c.A3637G	p.R1213G	Deleteria	Tolerada	Polimorfismo	sim

## Paciente sem identificação da mutação

### - PACIENTE XP01TO

A paciente XP01TO, 58 anos, segundo a Dra. Ana Maria Quinteiro, dermatologista no Hospital Geral de Goiânia, nunca se protegeu do sol e ainda hoje não se cuida com relação à fotoproteção. Sua pele é branca (fototipo II) e com psoríase. A paciente tem formação no

ensino superior e é servidora pública federal, não apresentando nenhum tipo de neurodegeneração ou indicação de deficiência cognitiva. A médica relata um quadro bem leve de XP, com poucos casos de CBC e CEC (menos de 10 lesões), e nenhum caso de melanoma.

Dentre as variantes com provável alteração na função do gene e com frequência alélica menor ou igual a 0,5, encontramos as alterações listadas na tabela 13 a seguir.

**Tabela 13 - Variantes não sinônimas e com frequência alélica menor e igual à 0,5 da amostra XP01TO.**

Gene	Chr	dbSNP	Ref	Alt	Região	Genótipo	Variação	Exon	cDNA	Proteína	ClinVar	Provean	Sift	MutationTaster
ERCC2	19	rs13181	T	G	exon	het	Não Sinonima	exon23	c.A2251C	p.K751Q	sim	Neutra	Tolerada	Polimorfismo
ERCC2	19	rs1799793	C	T	exon	het	Não Sinonima	exon10	c.G934A	p.D312N	sim	Deleterious	Tolerada	Polimorfismo
ERCC6	10	rs2228529	T	C	exon	het	Não Sinonima	exon21	c.A4238G	p.Q1413R	sim	Neutra	Tolerada	Polimorfismo
ERCC6	10	rs2228527	T	C	exon	het	Não Sinonima	exon18	c.A3637G	p.R1213G	sim	Deleterious	Tolerada	Polimorfismo
ERCC6	10	rs2228526	T	C	exon	het	Não Sinonima	exon18	c.A3289G	p.M1097V	sim	Neutra	Tolerada	Polimorfismo
FANCA	16	rs7195066	C	T	exon	het	Não Sinonima	exon26	c.G2426A	p.G809D	sim	Neutra	Tolerada	Polimorfismo
FANCA	16	rs2239359	C	T	exon	het	Não Sinonima	exon16	c.G1501A	p.G501S	sim	Neutra	Tolerada	Polimorfismo
BRCA1	17	rs16941	T	C	exon	het	Não Sinonima	exon9	c.A2972G	p.E991G	sim	Deleterious	Prejudicial	Polimorfismo
BRCA1	17	rs16942	T	C	exon	het	Não Sinonima	exon9	c.A3407G	p.K1136R	sim	Neutra	Tolerada	Polimorfismo
BRCA1	17	rs799917	G	A	exon	het	Não Sinonima	exon9	c.C2471T	p.P824L	sim	Neutra	Tolerada	Polimorfismo
BRCA1	17	rs4986850	C	T	exon	het	Não Sinonima	exon9	c.G1936A	p.D646N	sim	Neutra	Prejudicial	Polimorfismo
BRCA1	17	rs1799966	T	C	exon	het	Não Sinonima	exon15	c.A1525G	p.S509G	sim	Neutra	Prejudicial	Polimorfismo
ATR	3	rs2229032	C	T	exon	het	Não Sinonima	exon43	c.G7274A	p.R2425Q	sim	Neutra	Tolerada	Polimorfismo

Todas as alterações encontradas  $FA < 0,5$  são do tipo não sinônimas. A análise de impacto dessas alterações, utilizando os programas Provean e Sift, indicou possíveis alterações na função dos genes; *BRCA1*, *ERCC2* (XP-D) e *ERCC6* (CSB). A alteração no gene *ERCC2* (XPD) foi classificada como deletéria pelo programa Provean, porém tolerada pelo programa Sift. Uma terceira avaliação foi feita utilizando o programa *Mutation Taster* que apontou a alteração como polimorfismo. Existe uma alteração no aminoácido 991, deletéria e não tolerada, no gene *BRCA1* que está descrita como benigna no Clinvar. As três alterações no gene *ERCC6* estão descritas na literatura: c.A3637G [p.R1213G] e c.A4238G [p.Q1413R] como associadas a um aumento no risco de câncer de pele não melanoma (96) e a troca c.A3289G [p.M1097V] a um aumento no risco de câncer de bexiga (97).

## -PACIENTES TTD01SP E TTDO1ES

O paciente TTD01ES nasceu em 1994, fototipo III, de acordo com a Classificação de Fitzpatrick. Os pais vieram de Vitória e os avós de Campos de Goytacazes (RJ). Não há histórico de casamento consanguíneo. Existem casos anteriores na família de dois irmãos gêmeos que faleceram após algumas semanas de vida. O primeiro diagnóstico clínico do

paciente foi aos 17 anos, há dois anos se encontra acamado. Segundo sua tia, quando criança ficava avermelhado por inteiro, sua pele é seca, porém sem hipo/hiperpigmentação ou manchas e queratoses. Aos dois anos passou a ter crises convulsivas. A tia relata já ter tirado um tumor do pescoço aos 4 anos de idade. Os cabelos são secos e esparsos, sobrancelhas rarefeitas, pele seca em tronco e membros, porém oleosa com lesões vesico-papulosas na face, pescoço e cintura escapular. Paciente acamado, afásico, apresentando tetraparesia espástica, com impossibilidade de medir força resultante de uma atrofia muscular importante.

Com relação a paciente TT01SP não temos os dados clínicos, o contato com a médica responsável está em andamento. Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa, através de ensaios de complementação com fibroblastos primários desse paciente, indicaram uma recuperação do fenótipo de sensibilidade à luz UV, com adenovírus portadores do gene *XPD*, indicando ser esse o gene afetado.

Para os dois pacientes estudamos as variantes nos genes relacionados à síndrome TTD; *ERCC2*, *ERCC3*, *GTF2H* e *MPLIK*, em que não foi encontrada nenhuma variante em regiões codificadoras ou em sítio de *splicing*, com alteração de função do gene e frequência alélica maior que 0,5. É muito provável que o gene *XPD* esteja envolvido no fenótipo desses pacientes, e uma nova análise dos dados, menos restrigente deverá ser feita na tentativa de encontrarmos essa mutação.

#### -PACIENTE XP05AM

Segundo o médico responsável Dr. Fábio Fransceconi, a paciente residente e nascida em Manaus tem 42 anos e fototipo de IV para V. Os primeiros tumores surgiram aos 26 anos de idade, foram seis tumores retirados ao longo dos anos, sempre CBC e CEC.

O sequenciamento da amostra não nos indicou nenhuma mutação candidata para o fenótipo do paciente. Analisamos as alterações encontradas nos genes *DDB2*, *POLH*, *UVSSA* e *XPC*, cujo fenótipo conhecido de XP é mais ameno e com frequência alélica menor que 0.5 (Tabela 14) e nenhuma alteração foi indicada como mutação da paciente.

Tabela 14 - Variantes encontradas para os genes com fenótipo mais leve de XP.

Gene	Chr	Posição	dbSNP_ID	Ref	Alt	Região	Genótipo	Varição	RefSeq_ID	Exon	cDNA	Proteína	Clínvar	#ESP6500
DDB2	chr11	47260319	rs901746	A	G	intronic	hom	-	-	-	c.1235-32A>G	-	-	0.3821
POLH	chr6	43582091	rs6941583	A	T	exonic	het	nonsynonymous	NM_006502	exon11	c.A1939T	p.M647L	-	0.1236
UVSSA	chr4	1348649	rs114396993	C	A	intronic	het	-	-	-	-	-	-	0.0157
UVSSA	chr4	1369885	rs11724369	G	A	exonic	het	synonymous	NM_020894	exon10	c.G1497A	p.A499A	-	0.2825
XPC	chr3	14188762	rs2733534	G	C	intronic	het	-	-	-	-	-	-	0.4272
XPC	chr3	14208625	rs3729587	G	C	intronic	het	-	-	-	-	-	-	0.334
XPC	chr3	14190268	rs2470353	G	C	intronic	het	-	-	-	-	-	-	0.4269
XPC	chr3	14220095	rs2607775	C	G	UTR5	het	-	NM_004628	-	c.-27G>C	-	-	0.4347
XPC	chr3	14220114	rs370091578	C	G	UTR5	het	-	NM_004628	-	c.-46G>C	-	-	0.0002
XPC	chr3	14193889	rs2227998	C	T	exonic	het	synonymous	NM_004628	exon11	c.G2061A	p.R687R	yes	0.2658

Para essa amostra a estatística de sequências alinhadas na região alvo foi de 5%, o que nos indica que o a etapa de enriquecimento durante o preparo da biblioteca não ficou boa. Essa amostra deverá ser sequenciada novamente para estudarmos melhor as alterações no DNA da paciente.

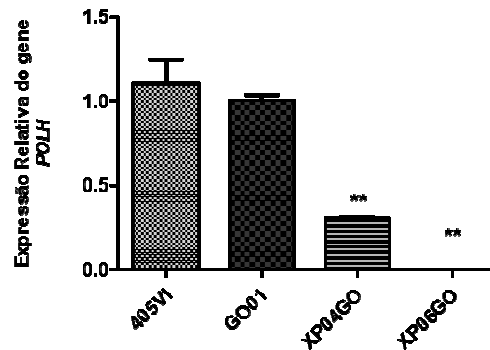
Assim, com a chegada de amostras de pacientes de todo o Brasil, aos poucos e juntamente com o trabalho realizado pelo Hospital AC Camargo, que também recebe amostras de pacientes XP de diferentes regiões, esperamos caracterizar geneticamente a distribuição desses pacientes no Brasil. Para todas as mutações indicadas será necessária confirmação pela metodologia Sanger, assim como o estudo mais detalhado do mRNA de algumas amostras em que a mutação candidata se encontra em sítio de *splicing*.

#### 2.4.4 Efeito das mutações em sítio de *splicing* no mRNA do gene *POLH*, intron 6 e intron 10.

Para avaliar a quantidade do mRNA transcrito do gene *POLH*, foi realizado o ensaio de PCR quantitativo (qRT-PCR). Tendo em vista que uma das mutações encontrada está localizada no intron, alterando uma base de sinalização na região de *splicing*, e considerando o nível reduzido de expressão da proteína Pol eta, encontrados nas células dos pacientes estudados, com iniciadores na junção dos exons 6 e 7, foi possível avaliar a expressão relativa do mRNA desse gene, em células desses pacientes.

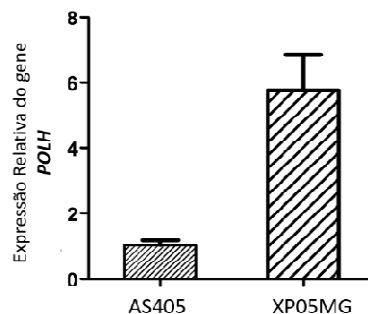
A linhagem afetada XP04GO apresentou 30% da expressão relativa desse gene quando comparado às linhagens controle, AS405 e GO01, diferente do paciente XP06GO em que a expressão do mRNA não foi detectada (figura 25). Os resultados foram obtidos utilizando o

método comparativo de Cts, após normalização baseada na expressão do gene endógeno *GAPDH*. Os iniciadores utilizados correspondem a região entre o exon 6 e 7.



**Figura 25** - Níveis de expressão do mRNA de *POLH* em células humanas são afetados pelas mutações em introns. RT-PCR para análise da expressão relativa do gene *POLH* para as linhagens; AS405 (selvagem), GO01, XP04GO e XP06GO. O RNA total foi isolado das células, em seguida as amostras foram tratadas com DNase (Promega®) para síntese do cDNA. O cDNA foi submetido a reação de PCR em tempo real, utilizando o iniciador para a região de junção entre o exon 6 e 7. Para quantificação utilizou-se o método comparativo de Cts, normalizados pela expressão endógena do gene *GAPDH*. O experimento foi realizado pelo menos três vezes independentemente.

Diferente do observado para as linhagens XP06GO (homozigota mutada no intron 6), a linhagem XP05MG (mutada no intron 10) tem um aumento de até seis vezes da expressão relativa comparado à linhagem controle AS405 (figura 26). A mutação no sítio de *splicing* do intron 10, pode estar afetando a região de poliadenilação na porção C-Terminal e, portanto, a estabilidade deste mRNA.

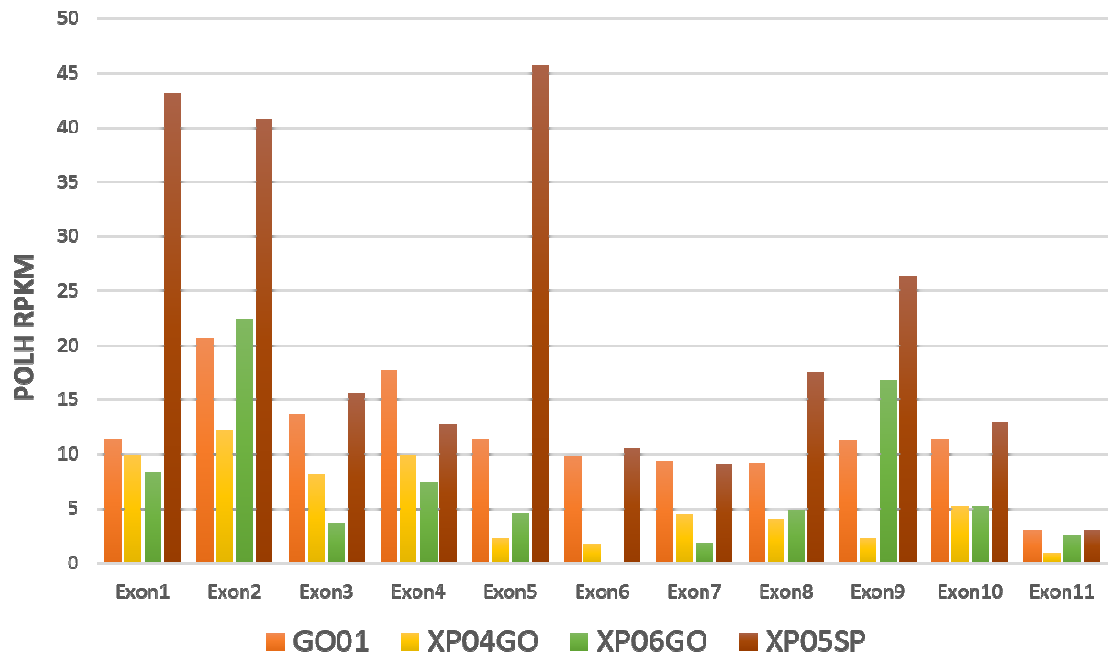


**Figura 26** - Aumento da expressão relativa do mRNA do gene *POLH* na linhagem XP05MG (XP-V), relativo ao controle AS405. As amostras foram analisadas como descrito na figura 6. Este resultado é representativo da média de 3 experimentos independentes.

### 2.4.5 RNA-Seq

Para melhor entender como essas mutações estão interferindo no processamento do mRNA desses pacientes, analisamos o transcriptoma das linhagens GO01, XP04GO, XP06GO e XP05MG. Para análise dos dados gerados utilizou-se o software da Lifescape™. Essa análise baseia-se no alinhamento das sequências geradas (leituras) com o sequenciamento da biblioteca de cDNA a um genoma referência, no caso hg19. Na figura 27 apresentamos o gráfico com a distribuição das regiões sequenciadas em cada exon do gene *POLH*. Para a amostra XP04GO (heterozigota composta para as mutações no exon 6 e 8), comparada com a amostra controle GO01, é possível ver uma redução na quantidade de *reads* em todos os exons, corroborando os dados de RT-PCR em que, para região da junção do exon 6/7, é possível ver uma redução de até 70% na expressão relativa do *POLH*.

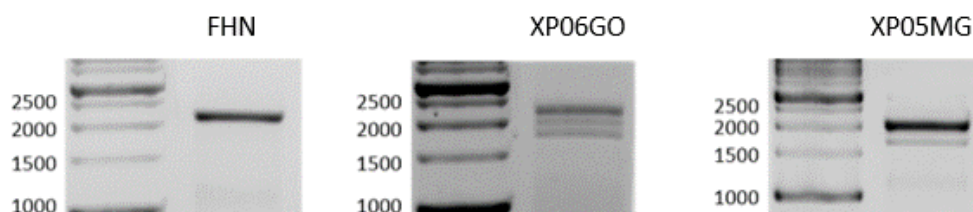
Para a amostra XP06GO (homozigota para o exon 6) é possível identificar, assim como para amostra GO01, um aumento na quantidade de leituras para o exon 2 e ausência de sequências no exon 6, o que confirma os resultados obtidos com RT-PCR, em que não houve amplificação da região de junção do exon 6/7. Considerando que nos exons seguintes existem regiões sequenciadas, é possível que exista uma nova isoforma com a deleção do exon 6 no mRNA dessa amostra. Já para a amostra XP05MG temos até 20x mais leituras que a amostra GO01 nos exon 1, 2 e 5, o que pode indicar uma maior estabilidade do RNA mensageiro desse alelo.



**Figura 27** - Quantidade de leituras de cada exon do mRNA do gene *POLH*, normalizadas pelo seu tamanho e por milhões de bases sequenciadas – RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*).

#### 2.4.6 PCR do gene *POLH*

Foi possível identificar que existem pelo menos três mRNA da *POLH* para a amostra XP06GO e dois mRNA para a amostra XP05MG (figura 28). Para a amostra XP05MG é possível observar uma banda mais forte confirmando os dados de qRT-PCR, em que há uma expressão relativa de até 6x maior quando comparado à amostra controle, assim como os dados do transcriptoma, em que observamos uma maior quantidade de leitura para os exons da *POLH* dessa amostra.



**Figura 28** - Análise do mRNA das amostras Gel de agarose 1% do PCR com o cDNA das amostras, controle (FHN) e XP-V; XP06GO (intron 6) e XP05MG (intron 10) para o gene *POLH* (2,2 kpb). Diferentes quantidades do volume total de PCR foram aplicadas para que se conseguisse visualizar as diferentes bandas de cada amostra; de 50µL da reação de PCR, aplicou-se 20 µL da amostra FHN, 40 µL da XP06GO e 5 µL da XP05MG.



## 2.5 DISCUSSÃO

Neste trabalho desenvolvemos estudos de identificação e distribuição dos alelos mutados no gene *POLH* para os pacientes e familiares da comunidade de Araras. Como desenvolvemos uma metodologia nova para diagnóstico molecular dos alelos ali encontrados, identificamos pacientes de outras regiões, como o caso do paciente XP133GO de Goiás Velho, a cerca de 140 km de Araras.

Entender o provável caminho dessas mutações terá grande importância para comunidades isoladas e com alta frequência de casamentos consanguíneos, em que mutações acabam se fixando, o que pode resultar em uma alta incidência de pacientes com doenças raras. Efeitos fundadores de mutações no gene *XPC*, por exemplo, já foram descritos na literatura; como na Ilha de Mayotte (Oceano Índico) , em que 32 pacientes possuem a mutação em sítio de *splicing* no gene *XPC*, c.2251-1G>C (1), na Guatemala com 12 pacientes mutados em *XPC* (98) e no norte da África com alta prevalência da mutações c.1643-1644delTG (56/66) nesse mesmo gene (84) tendo esse variante também sido encontrado no Brasil (82). Este mesmo trabalho também identificou no norte da África, a mutação *nonsense* c.682C4T (p.Arg228X) no gene *XPA* em 8 dos 66 pacientes (84), que ocorre em alta frequência nos pacientes XP do Japão devido a um efeito fundador do alelo (99). Em um estudo aqui no Brasil, conduzido pela Dra. Maria Isabel Achatz e Ms. Karina Santiago no Hospital AC Camargo, identificaram uma alta frequência da mutação de Mayotte no gene *XPC* (10/18), c.2251-1G>C (Karina et al, [comunicação pessoal]).

Na população de Araras, houveram dois efeitos fundadores independentes: a introdução da variante no intron 6, provavelmente com a chegada dos fundadores da região de Portugal no início do século XVIII e a outra variante no exon 8, mais tarde, na década de 60, com os imigrantes da região de Hidrolândia (ao sul de Goiânia). A mutação no intron 6 foi descrita recentemente em quatro pacientes (95) e a substituição no exon 8 foi identificada em um paciente da Europa, Kosovo (86), com fenótipo extremamente grave. Aos 21 anos o paciente desenvolveu um rápido e progressivo tumor na face, onde teve que retirar grande parte da pele do rosto. Diferentemente do paciente de Araras, XP88GO, que só recentemente, aos 80 anos, apresentou algumas alterações mais graves, tais como: olho mais

avermelhado e há 6 meses retirou uma lesão na pele, segundo sua médica, maligna. As características clínicas entre esses pacientes variam muito, tendo-se em conta os diferentes hábitos de vida essa variação é esperada. Como é o caso das irmãs XP03GO e XP04GO que possuem a mesma mutação, porém fenótipos distintos. Por outro lado, pacientes que sempre desenvolveram atividades ao ar livre e no sol como XP88GO, XP85GO e XP39GO e apresentam fenótipos distintos, sendo o fenótipo do paciente XP88GO surpreendentemente brando (Munford, Castro et al, 2016 [*in press*]). Será extremamente interessante realizar estudos dos polimorfismos intrônicos nesses genomas para verificar se há relação entre as mutações encontradas em Araras, e as dos pacientes europeus. Outras mutações foram identificadas no mesmo gene (*POLH*): como no caso do alelo mutado no intron 10, c.1249-1 G>A, variante encontrada em dois pacientes de Goiânia (XP02GO e XP24GO) e um paciente de Minas Gerais, XP05MG e do alelo mutado no exon 5, c.C638G [p.S213X], na paciente XP136GO de Jataí (GO) e no paciente XP01RN de São João do Sabugi (RN).

Pacientes de diferentes grupos de complementação foram identificados com a inclusão de outras amostras no estudo. Como o caso da paciente XP137GO de Ipameri (GO), com características clínicas bem diferente dos pacientes XP-V relatados até então, a paciente possui um quadro grave de problemas de neurodegeneração, deficiência intelectual, macrocefalia e leve hiperpigmentação da pele. Foi identificada como provável mutação responsável pelo seu fenótipo uma alteração missense que gera um códon de parada de leitura no exon 5 do gene *XPA*, c.C646T [p.Q216X]. Até o momento, existe apenas um relato de paciente XP-A no Brasil, XPSPAC15F0, que mora em Belo Horizonte, Minas Gerais (85). A mutação é uma troca de C>T, no exon 5 c.C619T [p. R207X] que também caracteriza uma parada de leitura na proteína. Como descrito, além dos problemas neurológicos o paciente apresenta os problemas clássicos de pele relacionados a XP, assim como a paciente descrita neste trabalho.

Até o momento 29 mutações no gene *XPA* foram descritas (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php>), as quais resultam em um fenótipo clínico severo de fotossensibilidade e problemas neurológicos (100). Apenas uma mutação, p.R228X no exon 6, descrita em pacientes da Tunísia que apresentam um fenótipo brando sem neurodegeneração. Essa mutação está fora do domínio de ligação dessa proteína ao DNA (aa 98- 219), o que levou à hipótese de que exista uma atividade residual da proteína (99, 101).

No Japão se encontra a maior frequência de pacientes XP-A do mundo, onde representam aproximadamente 60% dos pacientes XP (102).

Em geral, pacientes XP-C são os mais frequentes no mundo, com 25 a 40% dos casos de XP (1). Como mencionado anteriormente, esses pacientes possuem predominantemente câncer de pele, sem casos de problemas neurológicos. No trabalho de Cartault é descrito um dos maiores clusters genéticos de XP, que se formou com o efeito fundador de um alelo nesse gene na ilha de Mayotte, uma colônia francesa na África Subsaariana (já mencionados nesse trabalho). Trinta e dois pacientes, dentre os 50.000 habitantes, foram descritos, a região de maior incidência de pacientes XP no mundo.

No Brasil identificamos quatro pacientes com mutações no gene *XPC*; seis alterações foram apontadas como provável mutação responsável pelo fenótipo dos pacientes; sendo duas trocas de nucleotídeos, c.G1969T [p.E657] e c.G2404A [p.G802S], duas deleções c.2564delT [p.L855fs] e c.1108delG [p.E370fs], e duas em sítio de *splicing*, c.780-2A>T e c.621+1G>A. Dessas, a mutação c.G1969T (XP01PE), já foi descrita na literatura por um trabalho do nosso grupo em um paciente de São Paulo, XP02SP (82). Essa paciente de São Paulo apresenta um fenótipo grave com os primeiros sintomas aos sete anos e aos doze já havia desenvolvido diversos tumores cutâneos em áreas expostas ao sol, assim como a paciente de Pernambuco, XP01PE, também com um fenótipo grave, com o primeiro caso de tumor aos dois anos de idade.

Dois alelos mutados foram identificados no gene *ERCC2* (XPD), na paciente TTD02SP; uma troca não sinônima no exon 18, c.T1742C [p.L581P], e uma em sítio de *splicing* c.949+5G>A no intron 10, ambas ainda não descritas na literatura. Como mencionado anteriormente, mutações nesse gene podem levar a fenótipos de XP, CS e TTD. Pacientes TTD com mutações nesse gene apresentam uma grande heterogeneidade, tanto dos sintomas clínicos quanto do fenótipo *in vitro* em resposta a UV. Camundongos XPD-*knockout* não são viáveis, indicando que esse é um gene essencial (33). Serão necessários futuros experimentos para avaliar o efeito dessas mutações no mRNA do gene e se existe alguma expressão dessa proteína.

No decorrer desse estudo criamos uma tabela, em que discriminamos as características clínicas necessárias para nos aprofundarmos nas análises genéticas e, dessa forma, conduzir o estudo de alguns pacientes em que as mutações com patogenicidade incerta ou que não

foram identificadas. Essa tabela (Apêndice B) se baseou no estudo de Fasshi et al com algumas modificações, em que é atribuído uma pontuação às características clínicas, dessa forma conseguiremos classificar fenótipos amenos e severos em função dessa pontuação (118).

Dessa forma, nosso estudo genético se estendeu aos pacientes de todo o Brasil e englobou outras doenças relacionadas a defeitos na via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeo, como CS e TTD. Caracterizamos ao todo 34 pacientes brasileiros que incluem; 34 XP, 1 CS e 1 TTD, sendo que entre os pacientes XP identificamos; 26 XP-V, quatro XP-C, um XP-A, um XP-E, um CSB e um XP-D/TTD. A distribuição desses pacientes no país está ilustrada na figura 29.



**Figura 29** - Mapa da distribuição dos pacientes descritos neste trabalho, XP (34), CS (2) e TTD (3) no Brasil. Os 34 pacientes XP estão distribuídos entre; 24 XP-V, 7 XP-C, 1 XP-A, 1 XPE e 1 XP-G, considerando os pacientes previamente caracterizados pelo nosso grupo de pesquisa, sendo; 3 pacientes XP-C de São Paulo (82), um paciente XP-G do Rio de Janeiro (103) e um XP-E de Manaus (Santiago et al., em preparação). Entre os pacientes CS e TTD, uma mutação em CSB e XPD (ERCC2), respectivamente.

No mundo o fenótipo mais frequente é XPC, porém neste trabalho existe um claro viés do efeito fundador das mutações no gene *POLH* em Goiás. Se avaliarmos conjuntamente os dados obtidos neste projetos com o que já temos descrito na literatura e o trabalho que vem sendo desenvolvido no Hospital AC Camargo obtemos uma distribuição de pacientes XP, CS e TTD em uma proporção mais parecida como é descrita em outros países (104). Resumindo, 80 pacientes foram caracterizados geneticamente, sendo 31 XP-C (~44%), 30 XP-V (~43%), 10

CSA (~14%), 2 XP-A (~3%), 1 XP-E (~1%), 1 TTD mutado em XPD (~1%), 3 XP-D (~3%), 3 XP-G (~3%) e um CS-B (~1%) (73, 75, 82, 85, 103). Futuros estudos ajudarão a compreender melhor a distribuição dessas mutações entre pacientes brasileiros, quando testes moleculares poderão ajudar no aconselhamento genético e confirmação de diagnósticos de outros pacientes além da comunidade de Araras.

## CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA CELULAR FRENTE AO DANO INDUZIDO POR CISPLATINA

---

### 3.1 INTRODUÇÃO

Estudos têm demonstrado que a Pol eta participa da translesão a danos induzidos pelo tratamento de células humanas com cisplatina (59, 105-107). Dessa forma, linhagens de células deficientes em Pol eta são normalmente sensíveis à cisplatina e umas das formas de caracterizarmos fenotipicamente as linhagens XP-V, tanto de Goiás, XP04GO, XP06GO e XP88GO, quanto de Minas Gerais, XP05MG, foi avaliando a sensibilidade ao tratamento com essa droga.

Esse quimioterápico é usado, principalmente, para tratamento de câncer de ovário, testículo e de células pequenas de pulmão (108). De forma geral, essa droga atua se ligando covalente ao DNA, formando monoaddutos, entre a dupla fita ou em uma mesma fita. Essas ligações causam graves distorções e lesões na dupla hélice de DNA (105). A alta reatividade de espécies de Cisplatina mono-aquadas promove sua ligação covalente ao DNA, formando monoaddutos (Pt-G). Esses monoaddutos se tornam um problema maior quando são convertidos a diadutos formando ligações cruzadas (*cross-links*) entre as fitas de DNA. A distorção causada por essas lesões formam um bloqueio físico durante a fase S do ciclo celular, no processo de replicação, impedindo a progressão da replicação e de outros processos como a transcrição celular (108).

Dessa forma, o bloqueio físico gera um contexto de instabilidade na célula na medida em que, com a forquilha de replicação parada, é exposto o DNA simples fita, suscetível ao ataque de nucleases, além de gerar uma força de tensão na região, podendo levar a dupla quebra do DNA (DSB, do inglês *Double-Strand Break*). Em uma última tentativa de recuperar o processo de replicação, as vias de reparo de dupla quebra no DNA, recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*) e não homóloga (NHEJ, do inglês *Non Homologous End-Joining*), são recrutadas. Caso as células consigam sobreviver às lesões, replicar seu genoma e se multiplicar, podem ocorrer alterações (mutações e aberrações cromossômicas) podendo resultar na formação de tumores. Em um contexto de tratamento de tumores, impedir que a célula tumoral consiga lidar com esse estresse replicativo, de modo a bloqueando essas formas de reparo ou de tolerância ao dano, é uma estratégia para potencializar o efeito de agentes genotóxicos.



## 3.2. Objetivo Específico

- Caracterizar respostas celulares de células XP-V frente a danos no DNA induzidos pelo tratamento com cisplatina.

## 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.3.1 *Preparo e uso da cisplatina*

A solução estoque de cisplatina (cat P4394, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi feita em tampão fosfato salino (PBS) em uma concentração de 500  $\mu$ M. Para completa solubilização da droga, a solução foi incubada a 37°C por 15 min, e em seguida filtrada. As células foram plaqueadas e 24 h depois tratadas com cisplatina em diferentes concentrações (5, 15 e 25  $\mu$ M) e coletadas 24 e 72 h após o tratamento. Para o co-tratamento com cafeína adicionou-se 1 mM da droga juntamente com a cisplatina, ao meio de cultura, 24 h após o plaqueamento, até o momento da coleta.

### 3.3.2 *Ensaio de viabilidade celular por XTT*

A citotoxicidade da Cisplatina foi avaliada através do ensaio de XTT, segundo especificações do fabricante. Este ensaio mede a viabilidade celular através da atividade metabólica mitocondrial e baseia-se na medida de conversão do sal de tetrazolium, XTT (concentração final 0,3 mg/mL), a um composto colorido cuja absorbância é medida por espectrofotômetro. A determinação da viabilidade celular foi feita a partir da subtração do valor de absorbância em 750 nm pela absorbância em 490 nm, sendo o valor correspondente ao controle não tratado considerado 100%. As células foram plaqueadas em microplaca de 12 poços a uma concentração de 20.000 células por placa e tratadas 24 h depois. Após 72 h de incubação foi adicionado 300  $\mu$ L do sal de tetrazolium juntamente com o desacoplador de elétrons, diluídos em DMEM sem *phenol red*. A absorbância de cada poço foi medida em microplaca de 96 após 3 h de incubação com o sal. A viabilidade das células em cada concentração da droga foi expressa como a porcentagem entre a média da absorbância de células tratadas e não tratadas. A significância estatística de cada parâmetro foi avaliada pelo método Two-away ANOVA, com  $P < 0,05$  considerado estatisticamente significante.

### *3.3.3 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo*

Aproximadamente 100.000 células foram plaqueadas (placas de 60 mm de diâmetro), tratadas com 5 ou 25  $\mu\text{M}$  de Cisplatina, com ou sem cafeína (1 mM), e coletadas juntamente com seu sobrenadante em 24 h. As amostras foram, então, centrifugadas (290 g, 5 min), lavadas uma vez com PBS, as células precipitadas foram fixadas com etanol 70% gelado por no mínimo 24 h e em seguida, marcadas com uma solução de iodeto de propídio (PI), contendo Triton X-100 (0,1% v/v), RNase A (0,2 mg/mL) e PI (20 mg/mL). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 40 min, protegidas da luz, e em seguidas lavadas com PBS e transferidas para placa de 96 poços para análise. A intensidade de fluorescência de cada amostra foi adquirida e quantificada em citômetro de fluxo Guava Cytosoft (Merck-Millipore, Darmstadt, DE), o que permitiu determinar a quantidade de DNA por célula(109).

### *3.3.4 Imunomarcção para $\gamma\text{H2AX}$ por citometria de fluxo*

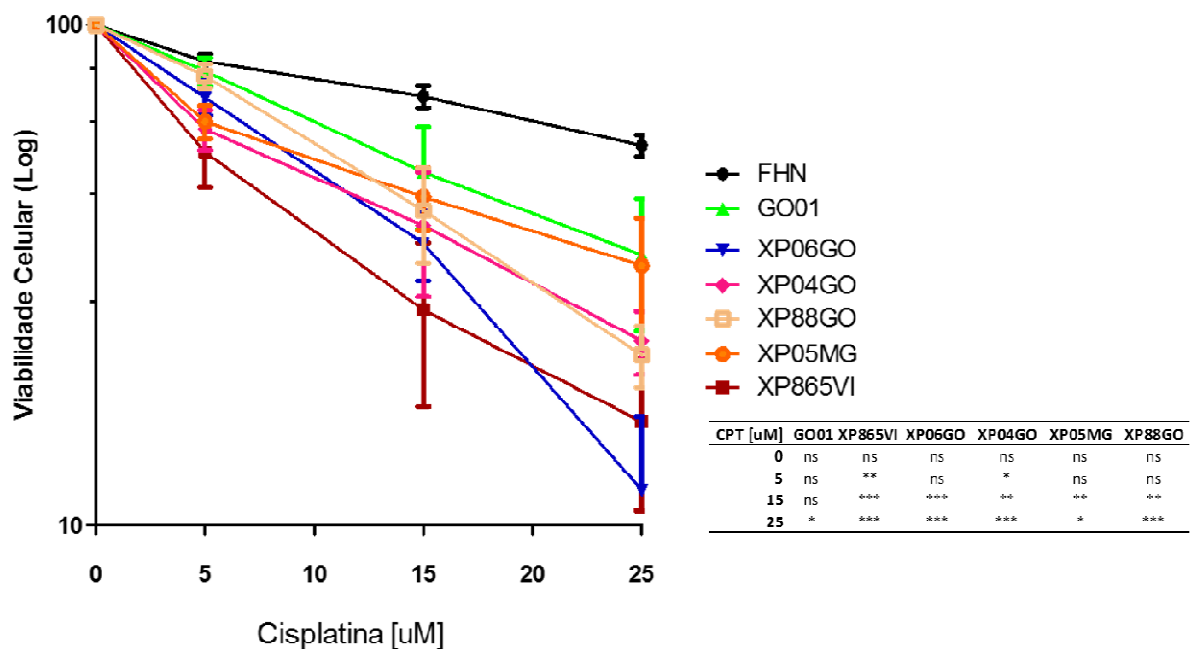
Foram plaqueadas 100.000 células em placa de 60 mm de diâmetro. Após 24 h de plaquemano as células foram tratadas com 5 e 25 $\mu\text{M}$  de cisplatina, com ou sem cafeína (1 mM) e coletadas 24 h depois. Para a coleta as células foram lavada com PBS, tripsinizadas e precipitadas após centrifugação (290 g, 5 min). Para separação e fixação das células utilizou-se formaldeído a 1%, diluído em PBS, e mantidas por 15 min no gelo. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 1 mL de etanol a 70% por 24 h à -20 °C. No dia da imunomarcção as amostras foram centrifugadas e lavadas com 500  $\mu\text{L}$  da solução 1 (BSA 1%, Triton X-100 0,2% em PBS). Em seguida foi adicionado ao precipitado celular 500  $\mu\text{L}$  da solução 1, o qual foi incubado por 5 min em temperatura ambiente sob leve agitação para bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos, seguido pela incubação com 50  $\mu\text{L}$  da diluição do anticorpo primário monoclonal IgG, mouse, anti- $\mu\text{H2AX}$  Ser 139 (Millipore), na proporção 1:300 e incubado por 16 h a 4 °C. Nova centrifugação foi realizada e ao precipitado celular adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução 1 com anticorpo secundário anti-mouse FITC (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:200 e incubado em temperatura ambiente por 1 h mantido no escuro. Após esse tempo, ao final da nova lavagem com 500  $\mu\text{L}$  da solução 1, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de PI e as amostras mantidas no escuro a temperatura ambiente por 30 min. Por último, as amostras foram lavadas com PBS e transferidas para placa de leitura no citômetro de fluxo Guava Cytosoft (Merck-Millipore).

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Sensibilidade das linhagens XP-V frente ao tratamento com cisplatina

##### *Efeito na viabilidade Celular (XTT)*

Investigamos a sensibilidade de células primárias frente ao tratamento com Cisplatina, através do ensaio de XTT. Os resultados indicam, em geral, um aumento de sensibilidade das linhagens XP-V em resposta ao dano induzido pelo tratamento (Figura 30).



**Figura 30** - Efeito de cafeína na sensibilidade de células humanas, deficientes ou proficientes em XPV. Células XP-V são mais sensíveis a cisplatina. Efeito da cisplatina nas linhagens normais (FHN e GO01) e XP-V (XP865VI, XP06GO, XP04GO, XP88GO e XP05MG). Ensaio de viabilidade celular (XTT) após 72 h de tratamento com 5, 15 e 25  $\mu$ M. Análise estatística realizada pelo método Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni, comparando todas as linhagens ao controle FHN, com  $p < 0.0001$ . O gráfico é resultado da média de quatro experimentos independentes.

Como mencionado anteriormente, a cafeína é um agente que aumenta a sensibilidade de linhagens XP-V frente a danos no DNA. Dessa forma, avaliamos o efeito do co-tratamento Cisplatina e cafeína, como mostra a figura 31 a seguir. Porém, diferente do esperado, a cafeína não aumentou a sensibilidade das linhagens XP-V primárias: XP06GO, XP88GO e XP05MG.

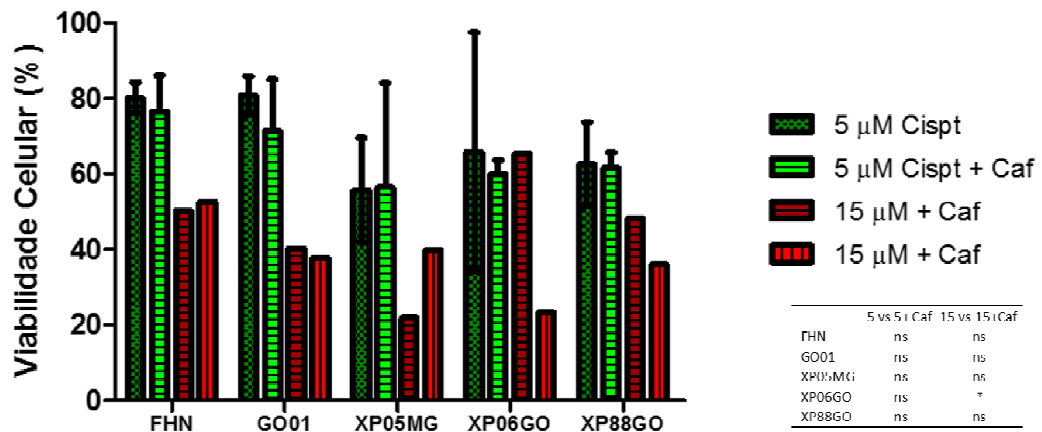


Figura 31 - Ensaio de viabilidade celular (XTT) após 72h de tratamento com 5 e 15  $\mu\text{M}$  de cisplatina, com e sem cafeína (1mM), para avaliar o efeito do co-tratamento nas linhagens primárias controle, FHN e GO01 e XP-V; XP06GO e XP88GO. A análise estatística foi realizada utilizando o método Two-way ANOVA com pós teste de Bonferroni, comparando o tratamento de cada linhagem com e sem cafeína. O gráfico é resultado da média de dois experimentos independentes.

A sensibilidade ao co-tratamento com cafeína é um ensaio clássico de caracterização fenotípica de linhagens XP-V frente ao tratamento com UVC. Avaliamos esse efeito em que foi observado sensibilidade à cafeína (Figura 32). É possível que para cisplatina, em linhagens primárias, esse efeito não seja o mesmo.

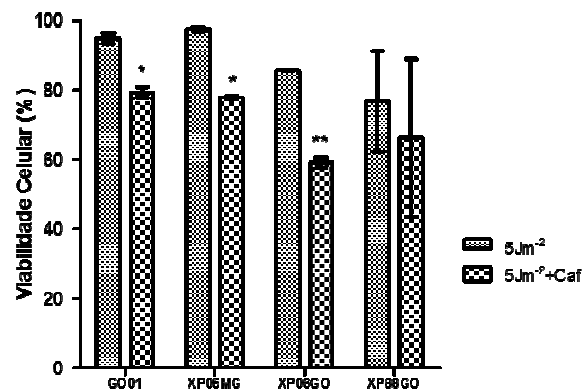
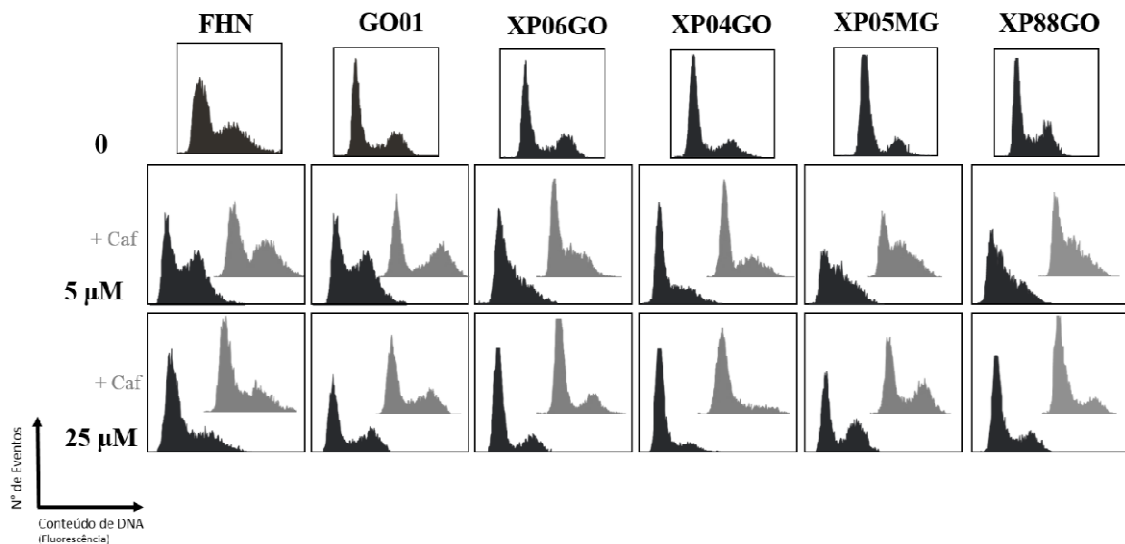


Figura 32 - Sensibilização de viabilidade de células XP-V irradiadas com luz UVC. Ensaio de viabilidade celular (XTT) para avaliar o efeito do co-tratamento de UVC e cafeína (72h) nas linhagens: GO01 (normal) e XP-V: XP05MG, XP06GO e XP88GO. Este gráfico representa dois experimentos independentes.

### 3.3.4 Efeito da cisplatina no ciclo celular

Avaliamos o efeito da cisplatina no ciclo celular através da marcação com PI para leitura em citômetro de fluxo. Após 24 h de tratamento com 5  $\mu\text{M}$  de CisPt é possível observar um bloqueio em fase G1/S nas linhagens XP-V: XP06GO, XP04GO, XP05MG e XP88GO. Curiosamente, esse efeito não é observado após tratamento com 25  $\mu\text{M}$  de cisplatina, na qual todas as células estão aparentemente bloqueadas em G1 ou, no caso de XP05MG, também em G2, provavelmente devido a ser uma dose muito alta para todas as células, não permitindo passagem por fase S ou mesmo mitose. Diferente do esperado, o co-tratamento com cafeína, novamente, não indica nenhuma alteração do ciclo celular no efeito da Cispt (figura 33).



**Figura 33** - Cisplatina provoca bloqueio de fase S em células XP-V. Histogramas representativos mostrando o efeito do tratamento com cisplatina no ciclo celular das linhagens controle FHN e GO01 e linhagens XP-V; XP06GO, XP04GO, XP05MG e XP88GO. Após 24 h de tratamento com cisplatina (5 e 25  $\mu\text{M}$ ), com e sem cafeína (1 mM) as células foram coletadas e marcadas com PI para análise por citometria de fluxo. Os histogramas são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes. As escalas dos eixos X e Y foram mantidas as mesmas para todos os histogramas.

### 3.3.5 Efeito na fosforilação da histona gH2AX em células tratadas com cisplatina

Uma das sinalizações da resposta ao dano no DNA é a fosforilação da histona H2AX, que gera gH2AX, típico de estresse genotóxico (110). Para estudar essa resposta nessas células, após o tratamento (24 h) com cisplatina (5 e 25  $\mu\text{M}$ ), com e sem cafeína, fizemos a imunomarcagem para essa histona fosforilada, analisada por citometria de fluxo (Figura 34). Verificamos uma clara indução de gH2AX nas células tratadas com cisplatina, independente da presença de cisplatina. Porém, após quantificarmos a porcentagem de células positivas, quadrante superior direito, para marcação total de gH2AX não observamos diferença entre as linhagens controle e XP-V (figura 35A).

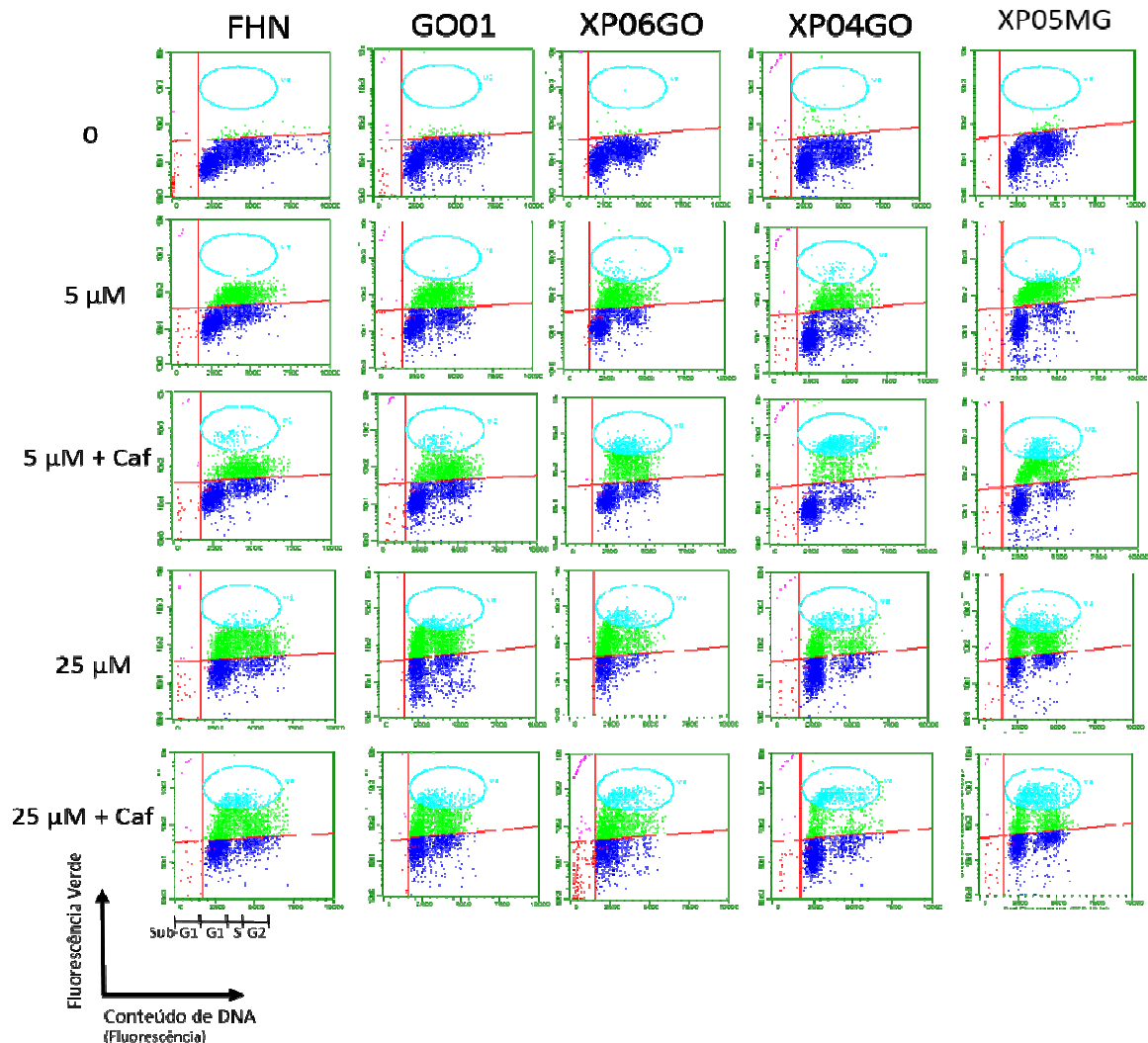
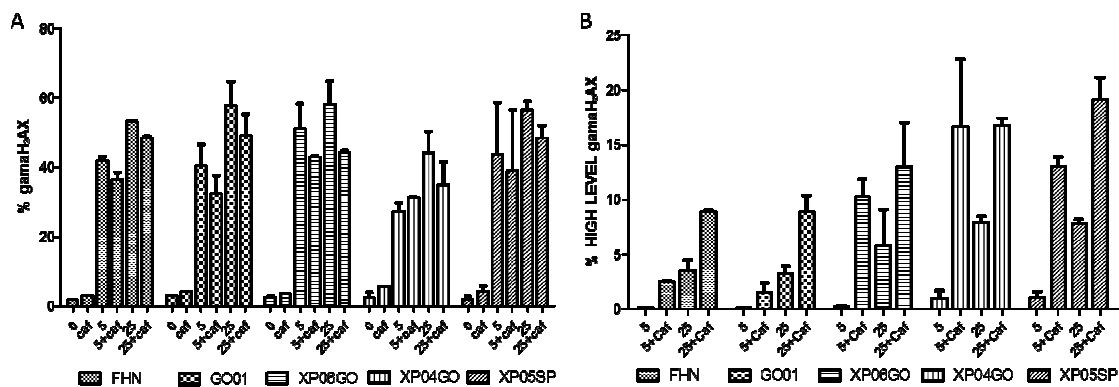


Figura 34 - Efeito de cisplatina na indução de gH2AX em células humanas. Histogramas representativos para imunomarcagem da histona H2AX fosforilada (gH2AX) detectadas por citometria de fluxo após 24 h de tratamento com 5 e 25  $\mu\text{M}$ , com e sem cafeína (1 mM). As células marcadas com maior fluorescência comparadas à amostra não tratada foram consideradas positivas para a imunomarcagem para H2AX. O círculo em azul representa a marcação *High-Level* da histona H2AX fosforilada. Este experimento é representativo de 3 experimentos independentes.

Porém, ao quantificarmos a marcação da fluorescência mais forte (*high-level*), identificada na figura 34 como uma elipse azul turquesa, podemos observar um aumento diferencial entre as linhagens controle e XP-V, assim como um grande aumento dessa marcação após co-tratamento com cafeína nas linhagens XP-V (Figura 35B).



**Figura 35** - Indução de gH2AX em altos níveis é maior em células XP-V tratadas com cisplatina. Gráfico da quantificação de células positivas para marcação com gH2AX. A. Quantificação total de células positivas para H2AX fosforilada. B. Quantificação da marcação *High-Level* da histona H2AX fosforilada. Os gráficos são representativos de 2 experimentos independentes sendo cada um em duplicata.

### 3.4 DISCUSSÃO

É conhecido que linhagens com deficiência na proteína Pol eta são mais sensíveis à Cisplatina quando comparadas a linhagens controle. Com o objetivo de caracterizarmos esse efeito nas linhagens XP-V em estudo, avaliamos a sensibilidade a esse quimioterápico através do ensaio de XTT. Assim, como é descrito na literatura, as linhagens: XP06GO, XP04GO e XP05MG e a linhagem XP-V controle, XP865VI, são pouco mais sensíveis ao tratamento quando comparadas a sensibilidade do controle, FHN. Provavelmente essa sensibilidade seria maior em células transformadas com SV40, pela redução na atividade de p53 (80). Esse aumento de sensibilidade se dá provavelmente devido ao fato de que Pol eta é a principal polimerase de síntese translesão envolvida no *bypass* de danos induzidos pelo tratamento com Cispt, tanto dos adutos de purinas, cerca de 90% das lesões induzidas por essa droga, quanto dos ICLs (5-8%) (54, 111). Dessa forma, a ausência dessa proteína nas linhagens XP-V leva ao aumento da sensibilidade à droga. Em 2012, Zhao e colaboradores demonstraram através de cristalografia que a translesão do aduto gerado pelo tratamento com Cispt é dependente da inserção do primeiro dCTP oposto ao *cross-link* Pt-GG pela Pol eta. Inibir a atividade de translesão da Pol eta é um mecanismo alvo nos estudos envolvendo quimioterapia de tumores, que tem como objetivo reduzir a resistência ao tratamento com cisplatina (60).

Outra resposta conhecida é o efeito da cafeína em linhagens XP-V, como mencionado anteriormente na introdução geral. O co-tratamento com esse agente aumenta a sensibilidade das linhagens XP-V frente ao dano induzido, tanto por UV, quanto por Cisplatina (54). As mesmas linhagens foram testadas indicando esse aumento de sensibilidade à irradiação UV, na presença de cafeína (Munford, Castro et al, 2016 [*in press*]). Assim, esperávamos observar o mesmo efeito no tratamento com cisplatina nas linhagens XP-V em estudo, porém esse efeito não foi observado. O efeito da cafeína em células XP-V é um clássico ensaio de caracterização fenotípica dessas linhagens frente ao dano induzido por UVC. Porém, esses estudos foram conduzidos em linhagens transformadas. É possível que para linhagens primárias essa resposta não seja a mesma no tratamento com cisplatina. O *status* de p53 é uma variável importante a ser avaliada nesse tipo de resposta. Uma das funções de p53 envolve a recuperação das forquilhas de replicação paradas frente ao dano no



DNA. De fato, evidências demonstraram que células transformadas por SV40, diferentemente de fibroblastos primários, não conseguem restaurar a replicação frente aos danos induzidos por UV, o que leva ao acúmulo de duplas quebras do DNA nos locais de forquilhas paradas durante a fase S de replicação (112). Normalmente as transformações celulares envolvem a inativação desse fator de transcrição, o que sensibiliza as células com um aumento na instabilidade genética e indução de morte celular em resposta a danos no DNA (80, 113). Em nosso laboratório as linhagens XP-V primárias utilizadas nesse trabalho foram transformadas por HPV16 (E6 e E7) pela Dra. Veridiana Munford. De fato, experimentos preliminares com essas células mostraram um grande aumento de sensibilidade dessas linhagens após o tratamento com cisplatina e esse estudo está sendo foco de estudo em nosso grupo de pesquisa.

Uma importante resposta ao dano no DNA é a parada no ciclo celular (*checkpoint*). As linhagens deficientes em Pol eta encontram problemas na replicação do DNA com lesão durante a fase S (114). Além disso, mecanismos de *checkpoints* atuam em diferentes fases do ciclo para que o DNA seja reparado, antes que a célula progrida em mitose com DNA danificado (115). Como pudemos concluir em nossos experimentos, diferente das linhagens controle, FHN e GO01, as linhagens XP-V, após 24 h de tratamento com cisplatina, estão paradas em G1/S, o que nos indicam que essas células estão com problemas para replicar seu conteúdo de DNA ou simplesmente bloqueadas em G1. Com relação ao efeito da cafeína, novamente não houve nenhuma alteração da resposta no ciclo em função do co-tratamento cisplatina e cafeína. Na dose mais alta de cisplatina, 25  $\mu$ M, não ocorre esse efeito de parada em S, provavelmente exista um fator de saturação de danos, o que pode resultarem um aumento de morte celular por apoptose em tempos mais tardios.

Outra resposta celular ao dano no DNA é controlada pela família das proteínas fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K); ATM (do inglês *Ataxia telangiectasia mutated*), ATR (do inglês *Ataxia telangiectasia- and Rad3- related*) e DNA-PK. Essas quinases fosforilam proteínas envolvidas na ativação da parada do ciclo celular (como mencionado acima), assim como a cauda C-terminal da histona H2AX (Ser-139). A fosforilação dessa histona, gerando gH2AX, é uma das sinalizações para o recrutamento de proteínas de reparo em locais com lesão no DNA. Camundongos *knockout* para esse gene são mais sensíveis à agentes que induzem dupla quebra no DNA (DSB, do inglês *Double-Strand break*), como radiação gama e etoposideo (110).

Porém, o papel dessa sinalização no recrutamento de NER e nas forquilhas de replicação paradas é pouco conhecido, sendo a indução de gH2AX um excelente marcador de estresse genotóxico.

Nas linhagens XP-V em estudo pudemos observar um aumento na marcação para gH2AX (*high-level*), o que pode ser representativo de um aumento de quebras duplas no DNA em replicação em consequência do tratamento com cisplatina. Essa marcação é ainda maior no co-tratamento com cafeína. Dessa forma, a deficiência em Pol eta pode resultar em maior colapso de forquilhas na presença de um inibidor de ATR (no caso, cafeína). Por um bom tempo gH2AX foi considerado apenas um marcador de DSB. Atualmente sabe-se que existem diferentes níveis dessa marcação; por exemplo em foci e pan-nuclear (116) /*high-level* (117), que decorrem dos diferentes tipos de lesões, que a célula sofreu, tanto para dupla quebra quanto para simples quebra do DNA, assim como das diferentes fases do ciclo em que essa marcação é avaliada. Em 2010 o grupo do Cleaver mostrou que a marcação mais forte para gH2AX (*high-level* ou pan-nuclear), presente nas células durante a fase S de replicação seriam uma sinalização de DSB (116) . Essa conclusão veio a partir dos experimentos de co-localização da marcação mais forte dessa histona com a proteína 53BP1. Para as marcações em foci não houve co-localização com a proteína. Em nosso trabalho, o aumento da marcação *high-level* para gama-H2AX nas linhagens XP-V no co-tratamento cisplatina e cafeína pode ser indicativo de DSB, experimentos de co-localização com 53BP1, juntamente como um ensaio de cometa neutro, poderiam confirmar essa hipótese.

Desde a descoberta dessas síndromes genéticas raras, XP, CS e TTD, as linhagens desses pacientes têm sido largamente utilizadas em estudos para compreensão do papel das proteínas de reparo frente aos danos induzido por agente genotóxicos. Por exemplo, polimerases de translesão estão envolvidas no *bypass* de lesões induzido pela cisplatina e alguns estudos apontam que a Pol eta é a principal polimerase da família Y envolvida na tolerância a esse tipo de dano. Nosso estudo com cisplatina nas linhagens XP-V em questão ajudou na caracterização de fibroblastos de pacientes brasileiros, em concordância com os dados da literatura, que mostram que essas células XP-V são mais sensíveis em função da deficiência de translesão aos danos induzidos pelo tratamento com esse agente quimioterápico.

## CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

## 4.1. Conclusões

- Duas mutações foram identificadas no gene *POLH*, uma em sitio de *splicing* no intron 6, c.764+1 G>A, e uma troca não sinônima no exon 8, c.C907T [p.R303X], responsáveis pelo fenótipo clínico XP-V nos pacientes de Araras/Faina (GO). Com 17 pacientes, em cerca de mil habitantes, é uma das regiões com maior densidade de pacientes XP no mundo com grande heterogeneidade de fenótipos clínicos entre eles. Os dados indicam dois efeitos fundadores para introdução dos alelos naquela comunidade.
- Outros pacientes foram incluídos no estudo que abrangeu outras duas síndromes relacionadas a defeitos em NER, como CS e TTD. Desta forma, um total de 34 pacientes brasileiros foram caracterizados ao nível genético: 34 XP, 1 CS e 1 TTD, sendo que entre os pacientes XP identificamos; 26 XP-V, 4 XP-C, um XP-A, um XP-E, um CSB e um XP-D/TTD.
- Neste trabalho avaliamos o efeito do tratamento com a cisplatina nas linhagens primárias deficientes em Pol eta. Conforme é descrito pela literatura, essas linhagens foram mais sensíveis ao tratamento quando comparadas as linhagens controle FHN e GO01. Essa via de tolerância ao dano é essencial na capacidade de sobrevivência celular, assim como na restauração da forquilha de replicação parada frente ao dano.

## 4.2. Considerações finais

*Um bebê pela manhã é levado para seu banho de sol diário e minutos depois sua pele se torna avermelhada com bolhas e queimaduras.* Há aproximadamente 140 anos, Kaposi identificou esses sintomas em diversos pacientes e caracterizou uma síndrome genética, Xeroderma Pigmentosum. Atualmente sabemos que essa fotossensibilidade na pele, entre outros sintomas, característico de paciente XP, é resultado da exposição à radiação UV, componente da luz solar, e a ausência de proteínas relacionadas à defeitos nas vias de reparo ou tolerância de lesões no DNA. Uma vez feito o diagnóstico clínico, a família pode ser esclarecida com relação aos problemas da exposição à UV e orientada quanto a utilização de protetores solares, roupas que protegem contra UV, assim como a escola pode ser direcionada e adaptada a esses pacientes. Apesar de uma vida no escuro, esses pacientes,

também chamados de “crianças na lua”, terão uma grande melhora na qualidade de vida com a redução na incidência de tumores de pele e conseqüentemente de intervenções cirúrgicas ao longo da vida.

Um resultado importante deste estudo foi a contribuição para aposentadoria dos pacientes, tanto de Araras, quanto de Faina. Para pacientes com fenótipo clínico mais ameno os pedidos de aposentadoria eram indeferidos pela Secretaria de Saúde Pública de Goiás e o diagnóstico genético os ajudou nesse processo, já que se trata de um dado incontestável de que são portadores de XP. A disseminação do estudo genético e o conhecimento da doença levou a melhor compreensão da necessidade de cuidados frente a exposição solar entre os pacientes da comunidade. A presidente da associação, Gleice Machado (mãe de um dos pacientes) passou a distribuir panfletos de como se cuidar e proteger do sol em toda a comunidade e regiões vizinhas. Além disso, ela conquistou o direito de receber do estado protetores solar com a enzima de reparo (Eryfotona®), que são distribuídos aos pacientes em quantidade abundante, estimulando o uso diário.

Acreditamos que a continuidade de estudos diagnósticos em outros pacientes do país deve ser mantida. Em termos sociais, esse diagnóstico molecular permite apoio junto à comunidade, assim como auxilia no esclarecimento de como os pacientes e seus familiares podem prevenir pelo menos parte de seus sintomas (aqueles que afetam a diretamente a pele). Abre-se também perspectivas de realizar aconselhamento genético aos pacientes. Em termos científicos, esses dados contribuem para o conhecimento da frequência e distribuição de pacientes no país. É interessante observar que muitas das mutações encontradas em pacientes brasileiros ainda não foram relatadas na literatura, o que simplesmente indica o quanto nossa população foi pouco estudada para essas síndromes relacionadas a NER. Espera-se que novas mutações possam contribuir com o conhecimento dos mecanismos moleculares responsáveis pelos fenótipos celulares e mesmo clínicos dos pacientes. Por outro lado, a identificação de mutações que já foram relatadas, como no caso dos pacientes de Araras, pode ser investigada para se conhecer a eventual origem dessas mutações, com esclarecimento da história desses efeitos fundadores.

Ainda hoje não existe nenhum protocolo de terapia, exceto prevenção à luz solar, para esses pacientes. Estudos, como os descritos aqui, trazem a investigação científica mais próxima à comunidade de pacientes e familiares, mas é difícil entender hoje como

poderemos ajudá-los em termos terapêuticos. De qualquer forma, esses estudos podem trazer ao menos informações e algumas explicações sobre o que os afeta, o que é o mínimo que podemos oferecer a eles. Lembramos que muito do que sabemos sobre a origem do processo de carcinogênese devemos a pacientes XP, e cada vez mais fica claro que graças a eles (e também a pacientes com outras síndromes relacionadas a NER) estamos começando a entender porque envelhecemos. Esperamos que esses estudos poderão trazer melhor compreensão e eventual esperança de uma melhor qualidade de vida para os pacientes e seus familiares.

## REFERÊNCIAS\*

---

1. Cartault F, Nava C, Malbrunot AC, Munier P, Hebert JC, N'guyen P, et al. A new XPC gene splicing mutation has led to the highest worldwide prevalence of xeroderma pigmentosum in black Mahori patients. *DNA Repair (Amst)*. 2011;10(6):577-85.
2. Kaposi M, Fagge CH, Hebra F. *On Diseases of the Skin, Including the Exanthemata*. Oxford:: The New Sydenham Society; 1874. 425 p.
3. Kelner A. Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*, with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation. *J Bacteriol*. 1949;58(4):511-22.
4. Dulbecco R. Experiments on photoreactivation of bacteriophages inactivated with ultraviolet radiation. *J Bacteriol*. 1950;59(3):329-47.
5. Menck CF. Shining a light on photolyases. *Nat Genet*. 2002;32(3):338-9.
6. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature*. 2003;421(6921):436-40.
7. Sancar A, Rupert CS. Cloning of the *phr* gene and amplification of photolyase in *Escherichia coli*. *Gene*. 1978;4(4):295-308.
8. Pettijohn DE, Hanawalt PC. Deoxyribonucleic acid replication in bacteria following ultraviolet irradiation. *Biochim Biophys Acta*. 1963;72:127-9.
9. Cleaver JE. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature*. 1968;218(5142):652-6.
10. Friedberg EC. The discovery that xeroderma pigmentosum (XP) results from defective nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 2004;3(2):183, 95.
11. Moraes MC, de Andrade AQ, Carvalho H, Guecheva T, Agnoletto MH, Henriques JA, et al. Both XPA and DNA polymerase eta are necessary for the repair of doxorubicin-induced DNA lesions. *Cancer Lett*. 2012;314(1):108-18.
12. Menck CF, Munford V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? *Genet Mol Biol*. 2014;37(1 Suppl):220-33.
13. Sarasin A. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutat Res*. 1999;428(1-2):5-10.
14. Crick F. The double helix: a personal view. *Nature*. 1974;248(5451):766-9.
15. Costa RM, Chiganças V, Galhardo RaS, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*. 2003;85(11):1083-99.
16. Friedberg EC, McDaniel LD, Schultz RA. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14(1):5-10.

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: [http://nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

17. Schuch AP, Yagura T, Makita K, Yamamoto H, Schuch NJ, Agnez-Lima LF, et al. DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes. *Environ Mol Mutagen*. 2012;53(3):198-206.
18. Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*. 1985;40(2):359-69.
19. Laugel V, Dalloz C, Durand M, Sauvanaud F, Kristensen U, Vincent MC, et al. Mutation update for the CSB/ERCC6 and CSA/ERCC8 genes involved in Cockayne syndrome. *Hum Mutat*. 2010;31(2):113-26.
20. Hanawalt PC, Spivak G. Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(12):958-70.
21. Foustieri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, Mullenders LH. Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell*. 2006;23(4):471-82.
22. Sugawara K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 1998;2(2):223-32.
23. Velmurugu Y, Chen X, Slogoff Sevilla P, Min JH, Ansari A. Twist-open mechanism of DNA damage recognition by the Rad4/XPC nucleotide excision repair complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(16):E2296-305.
24. Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle J, et al. Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *J Med Genet*. 2011;48(3):168-76.
25. Nance MA, Berry SA. Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet*. 1992;42(1):68-84.
26. Laugel V, Dalloz C, Tobias ES, Tolmie JL, Martin-Coignard D, Drouin-Garraud V, et al. Cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome: three additional cases with CSB mutations, new diagnostic criteria and an approach to investigation. *J Med Genet*. 2008;45(9):564-71.
27. Itoh T, Ono T, Yamaizumi M. A new UV-sensitive syndrome not belonging to any complementation groups of xeroderma pigmentosum or Cockayne syndrome: siblings showing biochemical characteristics of Cockayne syndrome without typical clinical manifestations. *Mutat Res*. 1994;314(3):233-48.
28. Fujiwara Y, Ichihashi M, Kano Y, Goto K, Shimizu K. A new human photosensitive subject with a defect in the recovery of DNA synthesis after ultraviolet-light irradiation. *J Invest Dermatol*. 1981;77(3):256-63.
29. Horibata K, Iwamoto Y, Kuraoka I, Jaspers NG, Kurimasa A, Oshimura M, et al. Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(43):15410-5.
30. Itoh T, Yamaizumi M. UVs syndrome: establishment and characterization of fibroblastic cell lines transformed with simian virus 40 DNA. *J Invest Dermatol*. 2000;114(1):101-6.



31. Itoh T, Fujiwara Y, Ono T, Yamaizumi M. UVs syndrome, a new general category of photosensitive disorder with defective DNA repair, is distinct from xeroderma pigmentosum variant and rodent complementation group I. *Am J Hum Genet.* 1995;56(6):1267-76.
32. Spivak G, Itoh T, Matsunaga T, Nikaido O, Hanawalt P, Yamaizumi M. Ultraviolet-sensitive syndrome cells are defective in transcription-coupled repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *DNA Repair (Amst).* 2002;1(8):629-43.
33. Cleaver JE, Lam ET, Revet I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet.* 2009;10(11):756-68.
34. Nagase T, Kikuno R, Ishikawa K, Hirose M, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 2000;7(2):143-50.
35. Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, et al. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Genet.* 2012;44(5):586-92.
36. Zhang X, Horibata K, Saijo M, Ishigami C, Ukai A, Kanno S, et al. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat Genet.* 2012;44(5):593-7.
37. Ogi T, Nakazawa Y, Sasaki K, Guo C, Yoshiura K, Utani A, et al. [Molecular cloning and characterisation of UVSSA, the responsible gene for UV-sensitive syndrome]. *Seikagaku.* 2013;85(3):133-44.
38. Pollitt RJ, Jenner FA, Davies M. Sibs with mental and physical retardation and trichorrhexis nodosa with abnormal amino acid composition of the hair. *Arch Dis Child.* 1968;43(228):211-6.
39. Lehmann AR. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie.* 2003;85(11):1101-11.
40. Price VH, Odom RB, Ward WH, Jones FT. Trichothiodystrophy: sulfur-deficient brittle hair as a marker for a neuroectodermal symptom complex. *Arch Dermatol.* 1980;116(12):1375-84.
41. Itin PH, Sarasin A, Pittelkow MR. Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44(6):891-920; quiz 1-4.
42. Stefanini M, Lagomarsini P, Arlett CF, Marinoni S, Borrone C, Crovato F, et al. Xeroderma pigmentosum (complementation group D) mutation is present in patients affected by trichothiodystrophy with photosensitivity. *Hum Genet.* 1986;74(2):107-12.
43. Stefanini M, Lagomarsini P, Giliani S, Nardo T, Botta E, Peserico A, et al. Genetic heterogeneity of the excision repair defect associated with trichothiodystrophy. *Carcinogenesis.* 1993;14(6):1101-5.
44. Weeda G, Eveno E, Donker I, Vermeulen W, Chevallier-Lagente O, Taïeb A, et al. A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. *Am J Hum Genet.* 1997;60(2):320-9.
45. Lehmann AR. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev.* 2001;15(1):15-23.

46. Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, Hoogstraten D, Theil A, Wijgers N, et al. A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet.* 2004;36(7):714-9.
47. Schäfer A, Gratchev A, Seebode C, Hofmann L, Schubert S, Laspe P, et al. Functional and molecular genetic analyses of nine newly identified XPD-deficient patients reveal a novel mutation resulting in TTD as well as in XP/CS complex phenotypes. *Exp Dermatol.* 2013;22(7):486-9.
48. Swagemakers SM, Jaspers NG, Raams A, Heijnsman D, Vermeulen W, Troelstra C, et al. Pollitt syndrome patients carry mutation in TTDN1. *Meta Gene.* 2014;2:616-8.
49. Corbett MA, Dudding-Byth T, Crock PA, Botta E, Christie LM, Nardo T, et al. A novel X-linked trichothiodystrophy associated with a nonsense mutation in RNF113A. *J Med Genet.* 2015;52(4):269-74.
50. Jung EG. New form of molecular defect in xeroderma pigmentosum. *Nature.* 1970;228(5269):361-2.
51. Cleaver JE. Xeroderma pigmentosum: variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light. *J Invest Dermatol.* 1972;58(3):124-8.
52. Lumb JR, Sideropoulos AS, Shankel DM. Inhibition of dark repair of ultraviolet damage in DNA by caffeine and 8-chlorocaffeine. Kinetics of inhibition. *Mol Gen Genet.* 1968;102(2):108-11.
53. Lehmann AR, Kirk-Bell S, Arlett CF, Paterson MC, Lohman PH, de Weerd-Kastelein EA, et al. Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(1):219-23.
54. Yamada K, Takezawa J, Ezaki O. Translesion replication in cisplatin-treated xeroderma pigmentosum variant cells is also caffeine-sensitive: features of the error-prone DNA polymerase(s) involved in UV-mutagenesis. *DNA Repair (Amst).* 2003;2(8):909-24.
55. Masutani C, Araki M, Yamada A, Kusumoto R, Nogimori T, Maekawa T, et al. Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *EMBO J.* 1999;18(12):3491-501.
56. Waters LS, Minesinger BK, Wiltrout ME, D'Souza S, Woodruff RV, Walker GC. Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73(1):134-54.
57. Kannouche P, Strydom A. Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie.* 2003;85(11):1123-32.
58. Wang Y, Woodgate R, McManus TP, Mead S, McCormick JJ, Maher VM. Evidence that in xeroderma pigmentosum variant cells, which lack DNA polymerase eta, DNA polymerase iota causes the very high frequency and unique spectrum of UV-induced mutations. *Cancer Res.* 2007;67(7):3018-26.
59. Cruet-Hennequart S, Gallagher K, Sokol AM, Villalan S, Prendergast AM, Carty MP. DNA polymerase eta, a key protein in translesion synthesis in human cells. *Subcell Biochem.* 2010;50:189-209.

60. Zhao Y, Biertümpfel C, Gregory MT, Hua YJ, Hanaoka F, Yang W. Structural basis of human DNA polymerase  $\eta$ -mediated chemoresistance to cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(19):7269-74.
61. Inui H, Oh KS, Nadem C, Ueda T, Khan SG, Metin A, et al. Xeroderma pigmentosum-variant patients from America, Europe, and Asia. *J Invest Dermatol*. 2008;128(8):2055-68.
62. Kannouche P, Broughton BC, Volker M, Hanaoka F, Mullenders LH, Lehmann AR. Domain structure, localization, and function of DNA polymerase eta, defective in xeroderma pigmentosum variant cells. *Genes Dev*. 2001;15(2):158-72.
63. Friedberg EC, Wagner R, Radman M. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science*. 2002;296(5573):1627-30.
64. Gratchev A, Strein P, Utikal J, Sergij G. Molecular genetics of Xeroderma pigmentosum variant. *Exp Dermatol*. 2003;12(5):529-36.
65. Bienko M, Green CM, Crosetto N, Rudolf F, Zapart G, Coull B, et al. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science*. 2005;310(5755):1821-4.
66. Baldeck N, Janel-Bintz R, Wagner J, Tissier A, Fuchs RP, Burkovics P, et al. FF483-484 motif of human Pol $\eta$  mediates its interaction with the POLD2 subunit of Pol $\delta$  and contributes to DNA damage tolerance. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(4):2116-25.
67. Pozhidaeva A, Pustovalova Y, D'Souza S, Bezsonova I, Walker GC, Korzhnev DM. NMR structure and dynamics of the C-terminal domain from human Rev1 and its complex with Rev1 interacting region of DNA polymerase  $\eta$ . *Biochemistry*. 2012;51(27):5506-20.
68. Despras E, Delrieu N, Garandeau C, Ahmed-Seghir S, Kannouche PL. Regulation of the specialized DNA polymerase eta: revisiting the biological relevance of its PCNA- and ubiquitin-binding motifs. *Environ Mol Mutagen*. 2012;53(9):752-65.
69. Yang W. An overview of Y-Family DNA polymerases and a case study of human DNA polymerase  $\eta$ . *Biochemistry*. 2014;53(17):2793-803.
70. Medeiros JS, da Silva EO, de Mello RJ, Fittipaldi Jr H, de Carvalho MW. [Cockayne syndrome in two brothers]. *J Pediatr (Rio J)*. 1995;71(6):344-8.
71. Guardiola A, Alvares-da-Silva CR, Grisolia JR, Silbermann R. [Cockayne syndrome. Case report]. *Arq Neuropsiquiatr*. 1999;57(1):106-10.
72. Karam SM, Costa JC, Jardim L, Pires RF, Lehmann AR, Giugliani R. Cockayne syndrome: report of a Brazilian family with confirmation of impaired RNA synthesis after UV-irradiation. 2000.
73. Bertola DR, Cao H, Albano LM, Oliveira DP, Kok F, Marques-Dias MJ, et al. Cockayne syndrome type A: novel mutations in eight typical patients. *J Hum Genet*. 2006;51(8):701-5.
74. Sant'Anna GRd, Piller RGL, Oliveira Mad, Duarte DA. Cockayne Syndrome: Case Report 1ed: *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde*; 2012. p. 57-62.
75. Resende C, Loureiro S, Cardoso E, Fonseca S, Sá J, Simões F. Cockayne's syndrome: report of two cases. *Porto Alegre (RS)*; 2012.

76. Barata AM, Souza RO, Tavares FLS, Gonçalves CS, Garcia LL, Almeida CP, et al. Cockayne syndrome: a case report. 2014.
77. Oliveira CRD, Elias L, Barros ACdM, Conceição DBd. Anesthesia in Patient with Xeroderma Pigmentosum. Case Report. 1 ed: Rev Bras Anestesiol; 2003. p. 46 - 51.
78. Sá BCSd, Rezze GG, Scramim AP, Landman G, Neves RI. Cutaneous melanoma in childhood and adolescence: retrospective study of 32 patients. São Paulo: Melanoma Research; 2004. p. 487–92
79. Pasquale G, Storti LR, Favato NM, Lipay MVN, Alves CAXdM. Clinical and genetic evaluation of patients with xeroderma pigmentosum in Jundiaí – SP Jundiaí; 2011.
80. Cleaver JE, Afzal V, Feeney L, McDowell M, Sadinski W, Volpe JP, et al. Increased ultraviolet sensitivity and chromosomal instability related to P53 function in the xeroderma pigmentosum variant. *Cancer Res.* 1999;59(5):1102-8.
81. Cardoso CL, Fernandes LMPdSR, Rocha JF, Soares CT, Barreto JA, Damante JH. Xeroderma Pigmentosum – A case report with oral implications. 2012.
82. Leite RA, Marchetto MC, Muotri AR, Vasconcelos DeM, de Oliveira ZN, Machado MC, et al. Identification of XP complementation groups by recombinant adenovirus carrying DNA repair genes. *J Invest Dermatol.* 2009;129(2):502-6.
83. Chavanne F, Broughton BC, Pietra D, Nardo T, Browitt A, Lehmann AR, et al. Mutations in the XPC gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences at the cell, protein, and transcript levels. *Cancer Res.* 2000;60(7):1974-82.
84. Soufir N, Ged C, Bourillon A, Austerlitz F, Chemin C, Sary A, et al. A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from north Africa. *J Invest Dermatol.* 2010;130(6):1537-42.
85. Santiago KM, França de Nóbrega A, Rocha RM, Rogatto SR, Achatz MI. Xeroderma pigmentosum: low prevalence of germline XPA mutations in a Brazilian XP population. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):8988-96.
86. Opletalova K, Bourillon A, Yang W, Pouvelle C, Armier J, Despras E, et al. Correlation of phenotype/genotype in a cohort of 23 xeroderma pigmentosum-variant patients reveals 12 new disease-causing POLH mutations. *Hum Mutat.* 2014;35(1):117-28.
87. Tanioka M, Masaki T, Ono R, Nagano T, Otoshi-Honda E, Matsumura Y, et al. Molecular analysis of DNA polymerase eta gene in Japanese patients diagnosed as xeroderma pigmentosum variant type. *J Invest Dermatol.* 2007;127(7):1745-51.
88. Gordon D. Viewing and editing assembled sequences using Consed. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2003;Chapter 11:Unit11.2.
89. Machado M, Magalhães WC, Sene A, Araújo B, Faria-Campos AC, Chanock SJ, et al. Phred-Phrap package to analyses tools: a pipeline to facilitate population genetics re-sequencing studies. *Investig Genet.* 2011;2(1):3.
90. Machado G. Nas asas da esperança: A história de dor e resistência da comunidade de Araras. Second Edition ed. Goiania - GO: Kelps; 2011. 146 p.

91. DiGiovanna JJ, Kraemer KH. Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J Invest Dermatol.* 2012;132(3 Pt 2):785-96.
92. Webb S. Xeroderma pigmentosum. *BMJ.* 2008;336(7641):444-6.
93. Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ, Jaspers NG, Fawcett H, Raams A, et al. Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):815-20.
94. Andrade-Lima LC, Andrade LN, Menck CF. ATR suppresses apoptosis after UVB irradiation by controlling both translesion synthesis and alternative tolerance pathways. *J Cell Sci.* 2015;128(1):150-9.
95. Calmels N, Greff G, Obringer C, Kempf N, Gasnier C, Tarabeux J, et al. Uncommon nucleotide excision repair phenotypes revealed by targeted high-throughput sequencing. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11:26.
96. Wheless L, Kistner-Griffin E, Jorgensen TJ, Ruczinski I, Berthier-Schaad Y, Kessing B, et al. A community-based study of nucleotide excision repair polymorphisms in relation to the risk of non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol.* 2012;132(5):1354-62.
97. Chang DW, Gu J, Wu X. Germline prognostic markers for urinary bladder cancer: obstacles and opportunities. *Urol Oncol.* 2012;30(4):524-32.
98. Cleaver JE, Feeney L, Tang JY, Tuttle P. Xeroderma pigmentosum group C in an isolated region of Guatemala. *J Invest Dermatol.* 2007;127(2):493-6.
99. Nishigori C, Moriwaki S, Takebe H, Tanaka T, Imamura S. Gene alterations and clinical characteristics of xeroderma pigmentosum group A patients in Japan. *Arch Dermatol.* 1994;130(2):191-7.
100. Messaoud O, Ben Rekaya M, Cherif W, Talmoudi F, Boussen H, Mokhtar I, et al. Genetic homogeneity of mutational spectrum of group-A xeroderma pigmentosum in Tunisian patients. *Int J Dermatol.* 2010;49(5):544-8.
101. Sato M, Nishigori C, Yagi T, Takebe H. Aberrant splicing and truncated-protein expression due to a newly identified XPA gene mutation. *Mutat Res.* 1996;362(2):199-208.
102. Hirai Y, Kodama Y, Moriwaki S, Noda A, Cullings HM, Macphee DG, et al. Heterozygous individuals bearing a founder mutation in the XPA DNA repair gene comprise nearly 1% of the Japanese population. *Mutat Res.* 2006;601(1-2):171-8.
103. Soltys DT, Rocha CR, Lerner LK, de Souza TA, Munford V, Cabral F, et al. Novel XPG (ERCC5) mutations affect DNA repair and cell survival after ultraviolet but not oxidative stress. *Hum Mutat.* 2013;34(3):481-9.
104. Kleijer WJ, Laugel V, Berneburg M, Nardo T, Fawcett H, Gratchev A, et al. Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(5):744-50.
105. Vaisman A, Masutani C, Hanaoka F, Chaney SG. Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta. *Biochemistry.* 2000;39(16):4575-80.

106. Bassett E, King NM, Bryant MF, Hector S, Pendyala L, Chaney SG, et al. The role of DNA polymerase  $\eta$  in translesion synthesis past platinum-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer Res.* 2004;64(18):6469-75.
107. Chen YW, Cleaver JE, Hanaoka F, Chang CF, Chou KM. A novel role of DNA polymerase  $\eta$  in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Res.* 2006;4(4):257-65.
108. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-20.
109. Batista LF, Kaina B, Meneghini R, Menck CF. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat Res.* 2009;681(2-3):197-208.
110. Revet I, Feeney L, Bruguera S, Wilson W, Dong TK, Oh DH, et al. Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(21):8663-7.
111. Tomicic MT, Aasland D, Naumann SC, Meise R, Barckhausen C, Kaina B, et al. Translesion polymerase  $\eta$  is upregulated by cancer therapeutics and confers anticancer drug resistance. *Cancer Res.* 2014;74(19):5585-96.
112. Squires S, Coates JA, Goldberg M, Toji LH, Jackson SP, Clarke DJ, et al. p53 prevents the accumulation of double-strand DNA breaks at stalled-replication forks induced by UV in human cells. *Cell Cycle.* 2004;3(12):1543-57.
113. Laposa RR, Feeney L, Crowley E, de Feraudy S, Cleaver JE. p53 suppression overwhelms DNA polymerase  $\eta$  deficiency in determining the cellular UV DNA damage response. *DNA Repair (Amst).* 2007;6(12):1794-804.
114. Cordonnier AM, Fuchs RP. Replication of damaged DNA: molecular defect in xeroderma pigmentosum variant cells. *Mutat Res.* 1999;435(2):111-9.
115. Cruet-Hennequart S, Villalan S, Kaczmarczyk A, O'Meara E, Sokol AM, Carty MP. Characterization of the effects of cisplatin and carboplatin on cell cycle progression and DNA damage response activation in DNA polymerase  $\eta$ -deficient human cells. *Cell Cycle.* 2009;8(18):3039-50.
116. de Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L, Cleaver JE. A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(15):6870-5.
117. Quinet A, Vessoni AT, Rocha CR, Gottifredi V, Biard D, Sarasin A, et al. Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome. *DNA Repair (Amst).* 2014;14:27-38.
118. Fassihi H, Sethi M, Fawcett H, Wing J, Chandler N, Mohammed S, et al. Deep phenotyping of 89 xeroderma pigmentosum patients reveals unexpected heterogeneity dependent on the precise molecular defect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(9):E1236-45.

## APÊNDICES

---

**A** – Artigo aceito para publicação: A genetic cluster of xeroderma pigmentosum variant patients with two different founder mutations. British Journal of Dermat.

**B** – Tabela com características clínicas necessárias ao estudo de caracterização genética dos pacientes com deficiência em NER.

- Anexo – [Artigo *in press*]

A - Munford V\*, **Castro LP\***, Souto R, Lerner LK, Brandstetter VJ, Quayle C, et al A genetic cluster of xeroderma pigmentosum variant patients with two different founder mutations. British Journal of Dermat. 2016 [*in press*].

\* Os autores contribuíram igualmente neste trabalho



Received Date : 20-Apr-2016  
Revised Date : 11-Aug-2016  
Accepted Date : 19-Sep-2016  
Article type : Original Article

## **A genetic cluster of xeroderma pigmentosum variant patients with two different founder mutations**

Running head: One genetic cluster and two XP-V founder mutations.

V. Munford<sup>1\*</sup>, L.P. Castro<sup>1\*</sup>, R. Souto<sup>2</sup>, L.K. Lerner<sup>1</sup>, J. Brandstetter Vilar<sup>1</sup>, C. Quayle<sup>1</sup>, H. Asif<sup>1</sup>, A.P. Schuch<sup>1,3</sup>, T.A. de Souza<sup>1</sup>, S. Ienne<sup>1</sup>, F.I.A. Alves<sup>1</sup>, L.M.S. Moura<sup>1</sup>, P.A.V. Galante<sup>4</sup>, A.A. Camargo<sup>4</sup>, R. Liboredo<sup>5</sup>, S.D.J. Pena<sup>5</sup>, A. Sarasin<sup>6</sup>, S.C. Chaibub<sup>7</sup> and C.F.M. Menck<sup>1\*\*</sup>

1. Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
2. Secretariat of Health, GO, Brazil.
3. Federal University of Santa Maria, Department of Biology, Santa Maria, RS, Brazil
4. Molecular Oncology Center, Hospital Sírio-Libanês, São Paulo, Brazil
5. Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.
6. UMR 8200 CNRS, Institut Gustave Roussy and University Paris-Saclay, Villejuif, France
7. General Hospital of Goiania, GO, Brazil.

\* These authors contributed equally to this work

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/bjd.15084

This article is protected by copyright. All rights reserved.

\*\* Corresponding author: Carlos F. M. Menck, Department of Microbiology, ICB, USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Ed. Biomédicas 2, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. 55.11.3091.7499. E-mail: cfimmenck@usp.br

This work was supported by FAPESP (São Paulo, Brazil, Grants # 2014/15982-6 and # 2013/08028-1), CNPq and CAPES (Brasília, DF, Brazil), and CNRS (France).

The authors declare no conflicts of interest.

#### **What's already known about this topic?**

- Genes related to Xeroderma Pigmentosum (*XPA-XPG*; and *XPV/POLH*) are known, and different alleles have been described for this rare disease.
- However, few genetic clusters have been observed for this syndrome.
- Genotype/phenotype correlation is thought to depend on the gene mutated and the mutation itself.

#### **What does this study add?**

- The community involved in this study carries two different pathogenic alleles in the *XPV/POLH* gene as a result of two distinct founder events.
- We discuss the potential origins for those alleles that were mapped in more than 50 individuals.
- With 17 patients, this region is one of its densest known areas of XP patients, with highly heterogeneous clinical phenotypes despite the sunny location.

We believe this work would fit in the General Dermatology section.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

**Abstract**

**Background:** Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare human syndrome associated with hypersensitivity to sunlight and a high frequency of skin tumors at an early age. We identified a community in the state of Goiás (central Brazil), a very sunny and tropical region, with a high incidence of XP (17 patients among approximately 1,000 inhabitants).

**Objectives:** To identify the gene mutations in the affected community and map the distribution of the affected alleles, correlating the mutations with clinical phenotypes.

**Methods:** Functional analyses of DNA repair capacity and cell cycle responses after ultraviolet exposure were investigated in cells from local XP patients, allowing the identification of the mutated gene, which was then sequenced to locate the mutations. A specific assay was designed for mapping the distribution of these mutations in the community.

**Results:** Skin primary fibroblasts showed normal DNA damage removal but abnormal DNA synthesis after ultraviolet irradiation and deficient expression of the Pol $\eta$  protein, which is encoded by the *POLH* gene. We detected two different *POLH* mutations: one at the splice donor site of intron 6, c.764 +1 G>A, and the other in exon 8, c.907 C>T, p.Arg303X. The mutation at intron 6 is novel, whereas the mutation at exon 8 was previously described in Europe. Thus, these mutations were likely brought to the community long ago, suggesting two founder effects for this rare disease.

**Conclusions and relevance:** This work describes a genetic cluster involving the *POLH* gene, and, particularly unexpected, with two independent founder mutations, including one that likely originated in Europe.

**Keywords:** Genetic cluster, xeroderma pigmentosum variant (XP-V), *POLH*, DNA repair, UV light.

## INTRODUCTION

Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare autosomal recessive disorder that is primarily characterized by high sensitivity to the ultraviolet (UV) component of sunlight. The estimated incidence of this syndrome varies between countries, with one case per one million births in the United States and Europe, while its incidence is much higher in Japan (1/100,000) and North Africa (1/50,000).<sup>1-3</sup> The hypersensitivity to sunlight observed in XP patients is manifested by hypo- and hyperpigmentation, xerosis, numerous skin lesions and, in particular, an increased incidence of skin cancer in areas exposed to light; skin cancer rates in XP patients under the age of 20 are 10,000 times higher than those in the general population.<sup>4-6</sup> In addition to skin problems, approximately 20% of XP patients have neurological complications; furthermore, clinical characteristics associated with premature aging are common among XP patients.<sup>4,7</sup>

The wide range in clinical characteristics and number of lesions depends on the gene involved and the type of mutation responsible for the syndrome. XP is caused by mutations in one of eight different genes, seven of which are related to classic complementation groups (XP-A to XP-G) that affect nucleotide excision repair (NER), while the eighth, the variant form (XP-V), results from defective translesion synthesis (TLS).<sup>8,9</sup>

The variant form of XP (XP-V; OMIM#278750) accounts for approximately 20% to 25% of all XP patients, who are normally diagnosed after the second or third decade of life. XP-V patients carry mutations in *POLH* that result in a defective DNA polymerase eta (Pol $\eta$ ). Pol $\eta$  is a translesion DNA polymerase that belongs to the Y family of DNA polymerases. The gene is located on chromosome 6, and encodes a 3,464-bp mRNA (NM\_006502) with an open reading frame of 2,139 bp (the first methionine is located in exon 2).<sup>10</sup> The main

function of Pol $\eta$  is to replicate damaged DNA in an error-free manner.<sup>11</sup> In the absence of Pol $\eta$ , replication forks are blocked for longer periods, and other translesion polymerases act less efficiently and in a more mutagenic way when replicating UV-induced pyrimidine dimers.<sup>12,13</sup> The increased mutagenesis in XP-V cells after UV irradiation is responsible for the induction of tumors in these patients.<sup>10</sup>

Although much effort has been made to assist and study XP patients in developed countries, XP patients and families in non-developed countries face near abandonment. Paradoxically, these poor countries tend to be located in the tropics, where the incidence of UV in sunlight is much stronger and more harmful to them.<sup>14</sup> The lack of medical care, misinformation and prejudice experienced by affected individuals reduce their quality of life.<sup>4</sup> Few studies have identified genetic mutations in XP patients in tropical countries.<sup>15-17</sup> Our group identified a community in west-central Brazil (Araras Village, municipality of Faina, State of Goias, Fig. S1), where many patients had been diagnosed with XP, indicating the existence of a genetic cluster.<sup>18</sup> Skin biopsies from these patients were obtained to establish cell cultures to characterize the disease, and two different mutated *POLH* alleles were detected. Seventeen individuals were identified as XP-V patients. The clinical phenotypes of the patients were very heterogeneous, and despite the strong sunlight in that region, some of the patients were more than 70 years old. The two mutated alleles revealed distinct founder origins from many centuries ago. This genetic cluster of two pathogenic mutations in the *POLH* gene likely represents one of the densest known areas of XP patients and provides an opportunity to better understand XP clinical phenotypic variation. Direct molecular diagnosis of the mutations in these patients has enabled genetic counseling and has helped the patients obtain better health care support.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patients' characterization**

Some of the clinical characteristics of these patients have been previously described.<sup>18</sup> The present study initially included cells from three XP patients, XP03GO.br, XP04GO.br (sisters) and XP06GO.br, and three unaffected individuals, XP06GO.br's parents (GO01.br and GO05.br) and another member of the community (GO07.br) (Table S1). The genetic mutations were identified, and approximately 50 individuals from the community (including the XP cases) were analyzed for molecular diagnosis. All human samples, including biopsies, saliva, and pictures, were collected with written informed consent and were processed under the project approval (*Parecer # 1007 CEP, OF. CEPESH 045-13*) by the Ethics Committee for Human Research of the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, SP, Brazil.

### **Cell cultures**

Primary fibroblast cultures were obtained from skin biopsies of areas not exposed to the sun (see above). Other primary fibroblasts were also included in this study: 405VI (normal repair), XP202VI (XP-C) and XP865VI (XP-V) cells. Culture conditions were previously detailed<sup>13</sup> and are presented in the Supplement.

### **Cellular responses to UV irradiation**

Cells were irradiated with UV light, and viability was evaluated to measure their capacity to address UVC-induced DNA lesions. Cells were exposed to UVC light at doses between 2 to 20 J/m<sup>2</sup> and were treated with or without caffeine (1.5 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as previously described.<sup>19,20</sup> The viability of cells harvested three days after UV irradiation was tested using the XTT assay (Cell Proliferation Kit II, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The capacity of these cells to remove DNA lesions was characterized

based on unscheduled DNA synthesis (UDS). Cell cycle and apoptosis assays via cytometry were performed as previously described.<sup>14,21,22</sup> Polη expression was evaluated via Western blotting. The details of these methods are presented in the Supplement.

#### **DNA extraction, PCR and sequencing**

DNA was extracted from primary fibroblast cultures with the Qiagen Genomic DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany), and samples were collected from 50 individuals using saliva collectors from an Oragene DNA self-collection kit (DNA Genotek Inc., Ottawa, Canada, CA). DNA and RNA samples were sequenced using Sanger and next-generation sequencing (NGS) methods for the identification of mutations in the *POLH* gene. Details on the methods employed and the data analyses are described in the Supplement.

#### **TaqMan<sup>®</sup> allelic discrimination assays, pedigree and ancestry inference**

This molecular test uses mutation-specific TaqMan<sup>®</sup> probes (Applied Biosystems/Thermo Fisher, Pittsburgh, PA, USA) that anneal specifically to the complementary sequence between the forward and reverse primer sites. The amplification reaction was performed with 60 ng of genomic DNA using a 7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher). TaqMan<sup>®</sup> Genotyper software allowed allelic discrimination. After many heterozygotes were identified among the patients' relatives, a genealogy tree was designed utilizing Cyrillic Software 2000 (version 3 Cyrillic, Oxfordshire, UK). LASER version 2.01 (locating ancestry from sequence reads; <http://www.sph.umich.edu/csg/chaolong/LASER/LASER-2.01.tar.gz>) was used for ancestry inference, with details described in the Supplement.

## RESULTS

### Cellular characterization

Six primary fibroblast cell cultures were established from skin biopsies of Araras' individuals for the cellular and molecular assays. Three cultures were obtained from patients clinically diagnosed with XP, two from the parents of a patient, and one from a non-affected female from the community (Table S1). Consistent with the mild phenotypes of the patients, cell survival assays indicated a small, if any, sensitivity of the patients' cells to UV irradiation compared to control cell lines. However, in the presence of caffeine, cells from two affected patients, XP04GO.br and XP06GO.br, showed increased sensitivity to UVC irradiation, similar to XP865VI (XP-V) cells.<sup>23</sup> The UV sensitivity of the cells from unaffected individuals (GO01.br and GO05.br) was similar to that of control cells (405VI) (Fig. 1).

The sensitivity of these cells to UV irradiation was confirmed by flow cytometry. The proportion of subG1 cells, an indication of apoptosis, was slightly higher in UV-irradiated XP cells maintained with caffeine than in control cells. The results also indicate that XP cells display strong cell cycle arrest at the G1-S phase after treatment with UV irradiation and caffeine (Fig. S2), likely reflecting the cells' inability to replicate past DNA lesions, consistent with a deficiency in Pol $\eta$  activity. NER capacity was tested by UDS, a classical test for XP diagnosis. The results indicated normal UDS for XP cells, similar to 405VI control cells, while XP202VI (XP-C, negative control) cells were unable to perform UDS (Fig. S3). These cells also removed lesions as control cells, indicating that these XP patients do not suffer from NER deficiency (data not shown), reinforcing the initial hypothesis that the disease could be related to Pol $\eta$ , the variant form of XP.



### **Analysis of protein expression and identification of mutations in the *POLH* gene**

Western blotting revealed that the fibroblasts of the XP patients from Araras exhibit deficient Polh expression (Fig. 2(a)). Sequencing data revealed the presence of two different mutant *POLH* alleles, confirmed by direct Sanger sequencing (Fig. 2b): a substitution at the splice donor site of intron 6, c.764 +1 G>A (“intron 6” mutation), and a premature stop codon for the protein at exon 8, c.907 C>T, p.Arg303X (“exon 8” mutation). Patient XP06GO.br had the intron 6 mutation in homozygosis, and his parents were also carriers (Fig. 2bI); the sisters XP03GO.br and XP04GO.br were compound heterozygotes for the intron 6 and exon 8 mutations (Fig. 2bII). Evaluation of mRNA levels by RT-PCR showed that in the cells from XP06GO.br (homozygous for this mutation), no mRNA linked exons 6 and 7 (Fig. S4), indicating that mRNA processing for this gene is strongly affected or, alternatively, mRNA is degraded due to nonsense-mediated mRNA decay.

The two mutations segregated independently, indicating that these two patients were compound heterozygous for the two mutations. Moreover, expression analysis indicated that mRNA levels were highly reduced in cells from XP04GO.br (Fig. S4), and RNA-seq revealed that only the allele containing the exon 8 mutation was expressed, possibly due to skipping of exon 8 in the other allele (results not shown). The intron 6 and exon 8 variants have been deposited in the locus-specific database LOVD – Leiden Open Variation Database ([www.lovd.nl/POLH](http://www.lovd.nl/POLH)) with DB-IDs POLH\_000014 and POLH\_000010 (previously reported<sup>24</sup>), respectively.

### **Molecular characterization and genealogy**

A TaqMan<sup>®</sup> genotyping assay (Fig. S5) was designed to evaluate the distribution of the two mutations among the community members. Among the 50 genotyped individuals, 17 were XP patients, and 33 were not affected. Considering only patients, eleven were homozygous for the intron 6 mutation, one was homozygous for the exon 8 mutation, and five were compound heterozygotes (Table 1). Among the non-affected individuals, seven were wild type, twenty were intron 6 carriers, and six were exon 8 carriers.

Two genealogy trees were built for the Araras family (Fig. 3) and for an Afro-descendent family who lived in the main town, Faina (Fig. S6), 24 miles away from Araras. The patients from Faina were homozygotes for the intron 6 mutation. These two families reported that they are not related, likely because any memories of ancestry have been lost from the oral history.

The relationship between one of the patients and the main family was uncertain, so he was not included in the genealogy. Figure 3 also includes died XP patients. Based on reports from the community, fourteen XP patients had died from the disease.

The mutation at exon 8 was previously reported in two affected patients in Europe. One of those patients (a compound heterozygote) was classified as not severely affected, while the second one (homozygous for this mutation) was classified as badly affected. Exome sequencing was performed to identify possible ancestry for these families. Samples from the European patients were also analyzed. Continental ancestry analyses (Fig. 4) showed that the patients homozygous for either mutation exhibited a typical Brazilian admixture of European, African and Amerindian origin.<sup>25</sup> However, patients with the exon 8 mutation, especially the

only homozygote (XP88GO.br), appeared to have slightly higher levels of European ancestry (Fig. 4b) than those with the intron 6 mutation (Fig. 4a).

### **Patients' descriptions**

Despite the high frequency of consanguineous marriages, the strong heterogeneity of clinical symptoms in the patients was notable. Although detailed clinical features could not be obtained, the overall severity of the disease in the 17 patients is summarized in Table 1 (pictures Fig. S7). In general, the clinical features of these patients were relatively mild, even though they experience very strong sunlight where they live. The first signs reported by the patients were similar: freckles, xerosis, and hypo- and hyperpigmentation in the skin on sun-exposed areas. Most of the patients had ocular problems, including photophobia and conjunctival telangiectasia, as many have interpalpebral conjunctival melanosis, lagophthalmos/ectropion, pterygia, pinguecula and keratopathy, which are also described for other XP patients.<sup>26</sup> In most cases, the first signs appeared once a child reached school age, as they had to walk under the strong sunlight with no protection. Notably, at least for patient XP06GO.br, his mother reported he had acute sunburn, including blistering, when he was a baby, which is not commonly observed for XP-V patients.<sup>26</sup>

Darker skin protects some of these patients, but one of them has strong photophobia. Interestingly, some patients lived longer than 70 years. However, the death of relatively young patients (less than 20 years old) due to XP has also been reported. Two of the patients, XP39GO.br and XP52GO.br, had major skin grafts on their faces due to recurrent surgical interventions. There was no clear association between genotype and clinical phenotype. In a case of three siblings, compound heterozygotes, XP03GO.br, XP04GO.br and XP39GO.br, the first had three lesions removed with no melanoma onset; in contrast, her sister had already had several malignant tumors removed from her nose and lower lip, a second-degree

melanoma onset on her right wrist and a recent lesion on her back. Their brother, XP39GO.br, unfortunately died in 2015 (40 years old) due to a brain tumor with unknown origin, possibly a melanoma metastasis. In this family, four out of six siblings were XP, and one of them died of XP when he was 21 years old. Patient XP88GO.br, 82 years old, was the only patient homozygous for the exon 8 allele. This patient had highly pigmented skin but very few episodes of skin lesions. Recently, he had a skin squamous-cell carcinoma removed, thus displaying a mild phenotype, differing drastically from the European patients carrying the same mutation.<sup>24</sup> In the cases of the two other genotypes (intron 6 homozygotes and compound heterozygotes), mild, medium and more severe clinical phenotypes were observed. In addition, we must consider that the patients did not use any sunscreen protection until a few years ago. Importantly, as expected for XP variants, none presented symptoms of developmental problems or neurological deficiency, which has been observed for some XP patients with mutations affecting the NER pathway.<sup>4</sup>

## DISCUSSION

Here, we describe a population of XP patients in a sunny, isolated location. All patients lived relatively close and had family ties, although they were not always recognized. Patient cells indicated low sensitivity to UV light and efficient UDS, indicating that these patients did not have an NER defect. The increased sensitivity to UV irradiation in the presence of caffeine and the arrest in G1/S phase are classical features of XP-V cells,<sup>27</sup> confirmed by the absence of (or nearly undetectable) Pol $\eta$  expression.

Two different pathogenic mutations in the *POLH* gene were found. All patients carried these mutations as homozygotes or as compound heterozygotes. Most patients carried a mutation at the splice site at the first base of intron 6, which affects the correct processing of

exons 6 and 7. A previously reported patient, XP31BE, carried a different mutation at the same position: a G to C substitution.<sup>19,28</sup> The second mutation generates a stop codon in exon 8 and may be translated into a truncated and inactive protein. The same mutation was recently reported in two European XP patients<sup>24</sup> suggesting a familial connection between them, although an independent origin cannot be discarded.

By developing a specific PCR assay to detect both mutations, all XP patients in the community and the heterozygote carriers were genotyped. These data, together with patient interviews, provided the basis for creating a genealogy for the community. This genotyping assay is very simple and has already been employed for genetic counseling for recently formed couples of close relatives (such as III.3 and III.4); out of two babies, only one was a carrier of the intron 6 mutation.<sup>1,29</sup>

Although some patients carried the intron 6 mutation and lived nearby (24 miles away), they could not be directly linked to the main family. The phenotype of these patients appeared less severe due to their black ethnic origin, which confers natural protection, as shown previously.<sup>3</sup>

The exon 8 mutation clearly arrived in this community later, in the mid-1960s, from Hidrolandia (~200 miles away). Only one patient, born in Hidrolandia, was diagnosed as homozygous for this mutation. Interestingly, this patient (XP88GO.br) is an 82-year-old male, and although he worked as a farmer and had badly affected skin, he had developed his first skin tumor only recently. The difference in the clinical phenotype of this patient and that of the patient described in Europe (severe XP) is difficult to explain, although it may simply reflect the different genetic backgrounds of the patients.

Finally, this work describes the identification of a genetic cluster of two different mutated alleles of the *POLH* gene within a community in a sunny country. Two different founder histories are apparent: the exon 8 mutation most likely derives from the European

colonization, and the intron 6 mutation is novel and deserves further investigation. Founder effects for XP disease have been previously described in a community of native Indians in Guatemala<sup>9</sup> and in a black population on the French Comorian Islands.<sup>3</sup> In addition, a very prevalent mutation detected in European and Northern African patients was estimated to have originated close to twelve hundred years ago in the Mediterranean region.<sup>23</sup> These three mutations affect the *XPC* gene, while a mutation in the *XPA* gene is very common in the Japanese population.<sup>30</sup> This work describes two founder mutations for the *POLH* gene, and, as these are rare events, the misfortune for this small community is noted. The acknowledgement of the genetic cause of the disease and the need for sun protection has led the patients to protect themselves with high-sun protection factor (SPF) sunscreen with photolyases (provided by the state of Goias beginning in 2015). The patients and their families state that this sunscreen helps them tolerate the strong sunlight in the region. The possibility of molecular diagnosis and local efforts by members of the community led to the official granting of pensions to affected patients and to health care improvements for these communities.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP (São Paulo, Brazil, Grants # 2014/15982-6 and # 2013/08028-1); CNPq and CAPES (Brasília, DF, Brazil), and CNRS (France). We thank the Core Facility for Scientific Research - USP (CEFAP-USP/GENIAL) for providing NGS. We are thankful to Mrs. Maria Helena Oliveira for technical support in the DNA Repair laboratory, for the XP patients of the Araras Village community and the ABRAXP, the Brazilian XP support group, for their contribution to this research.

## REFERENCES

1. DiGiovanna JJ, Kraemer KH. Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J Invest Dermatol* 2012; **132**:785-96.
2. Kleijer WJ, Laugel V, Berneburg M, *et al.* Incidence of DNA repair deficiency disorders in Western Europe: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst)* 2008; **7**:744-50.
3. Cartault F, Nava C, Malbrunot AC, *et al.* A new XPC gene splicing mutation has led to the highest worldwide prevalence of xeroderma pigmentosum in black Mahori patients. *DNA Repair (Amst)* 2011; **10**:577-85.
4. Menck CF, Munford V. DNA repair diseases: what do they tell us about cancer and aging? *Genet Mol Biol* 2014; **37**:220-33.
5. Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, *et al.* Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterises the role of DNA repair. *J Med Genet* 2011; **48**:168-76.
6. Kraemer KH, DiGiovanna JJ. Forty years of research on xeroderma pigmentosum at the US National Institutes of Health. *Photochem Photobiol* 2015; **91**:452-9.
7. Cleaver JE. Historical aspects of xeroderma pigmentosum and nucleotide excision repair. *Adv Exp Med Biol* 2008; **637**:1-9.
8. Costa RM, Chiganças V, Galhardo Rda S, *et al.* The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 2003; **85**:1083-99.
9. Cleaver JE, Feeney L, Tang JY, *et al.* Xeroderma pigmentosum group C in an isolated region of Guatemala. *J Invest Dermatol* 2007; **127**:493-6.
10. Masutani C, Araki M, Yamada A, *et al.* Xeroderma pigmentosum variant (XP-V) correcting protein from HeLa cells has a thymine dimer bypass DNA polymerase activity. *EMBO J* 1999; **18**:3491-501.

11. Sale JE, Lehmann AR, Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**:141-52.
12. Lehmann AR, Kirk-Bell S, Arlett CF, *et al.* Xeroderma pigmentosum cells with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**:219-23.
13. Quinet A, Vessoni AT, Rocha CR, *et al.* Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome. *DNA Repair (Amst)* 2014; **14**:27–38.
14. Schuch AP, Yagura T, Makita K, *et al.* DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes. *Environ Mol Mutagen* 2012; **53**:198-206.
15. Leite RA, Marchetto MC, Muotri AR, *et al.* Identification of XP complementation groups by recombinant adenovirus carrying DNA repair genes. *J Invest Dermatol* 2009; **129**:502-6.
16. Ortega-Recalde O, Vergara JI, Fonseca DJ, *et al.* Whole-exome sequencing enables rapid determination of xeroderma pigmentosum molecular etiology. *PLOS ONE* 2014; **8**:e64692.
17. Santiago KM, França de Nóbrega A, Rocha RM, *et al.* Xeroderma pigmentosum: low prevalence of germline XPA mutations in a Brazilian XP population. *Int J Mol Sci* 2015; **16**:8988- 96.
18. Chaibub S. High incidence of Xeroderma Pigmentosum in a countryside community in the state of Goiás, Brazil. *Surg. Cosmet Dermatol* 2011; **3**:81-3.
19. Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ, *et al.* Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**:815-20.



20. Andrade-Lima LC, Andrade LN, Menck CF. ATR suppresses apoptosis after UVB irradiation by controlling both translesion synthesis and alternative tolerance pathways. *J Cell Sci* 2015; **128**:150-9.
21. Soltys DT, Rocha CR, Lerner LK, *et al.* Novel XPG (ERCC5) mutations affect DNA repair and cell survival after ultraviolet but not oxidative stress. *Hum Mutat* 2013; **34**:481-9.
22. Meunier JR, Sarasin A, Marrot L. Photogenotoxicity of mammalian cells: a review of the different assays for in vitro testing. *Photochem Photobiol* 2002; **75**:437- 47.
23. Soufir N, Ged C, Bourillon A, *et al.* A prevalent mutation with founder effect in xeroderma pigmentosum group C from North Africa. *J Invest Dermatol* 2010; **130**:1537-42.
24. Opletalova K, Bourillon A, Yang W, *et al.* Correlation of phenotype/genotype in a cohort of 23 xeroderma pigmentosum-variant patients reveals 12 new disease-causing POLH mutations. *Hum Mutat* 2014; **35**:117-28.
25. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLOS ONE* 2011; **6**:e17063.
26. Fassihi H, Sethi M, Fawcett H, *et al.* Deep phenotyping of 89 xeroderma pigmentosum patients reveals unexpected heterogeneity dependent on the precise molecular defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; **113**:E1236-45.
27. Kannouche P, Strydom A. Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie* 2003; **85**:1123-32.
28. Inui H, Oh KS, Nadeem C, *et al.* Xeroderma pigmentosum-variant patients from America, Europe, and Asia. *J Invest Dermatol* 2008; **128**:2055-68.
29. Webb S. Xeroderma pigmentosum. *BMJ* 2008; **336**:444-6.

families of –III.1 and –III.2, and –II.3 and –II.4 (Family A). Compound heterozygotes (in yellow), which carry both the intron 6 and exon 8 mutations, start to appear when family of 0.25 and 0.26 arrived at Araras (Family B) from Hidrolandia (a town 200 miles South in the state of Goias), representing the second founder effect exon 8 mutation (the only exon 8 homozygous patient, I.31, in green). Red arrows indicate patients whose cells were cultured and investigated. The genealogy does not present all family individuals, as we emphasize only those related to the patients.

**Figure 4:** Ancestry of the individuals from the Araras community. Polymorphisms identified by exome sequencing enabled a detailed description of their ancestry. The colors indicate the positions relative to different populations in the world. The dark grey symbols (X) represent each tested individual in the reference principal components analysis (PCA) space constructed using HGDP. Each color symbolizes a major continental group, as indicated in the figure. (a) Symbols represent patients carrying the intron 6 mutation: [a]GO01.br, [b]GO05.br, [c]GO32.br, [d]GO36.br, [e]GO48.br, [f]GO99.br, [g]XP06GO.br, [h]XP08GO.br, [i]XP100GO.br, [j]XP11GO.br, [k]XP33GO.br, [l]XP52GO.br, [m]XP63GO.br, [n]XP56GO.br, [o]XP03GO.br, and [p]XP04GO.br. Homozygous samples are highlighted in red. (b) Symbols represent patients carrying the exon 8 mutation: [1]GO10.br, [2]GO118.br, [3]GO29.br, [4]GO67.br, [5]GO89.br, [6]XP03GO.br, [7]XP04GO.br, [8]XP56GO.br, [9]XP63GO.br and [10]XP88GO.br. The homozygous sample is highlighted in red.

families of –III.1 and –III.2, and –II.3 and –II.4 (Family A). Compound heterozygotes (in yellow), which carry both the intron 6 and exon 8 mutations, start to appear when family of 0.25 and 0.26 arrived at Araras (Family B) from Hidrolandia (a town 200 miles South in the state of Goias), representing the second founder effect exon 8 mutation (the only exon 8 homozygous patient, I.31, in green). Red arrows indicate patients whose cells were cultured and investigated. The genealogy does not present all family individuals, as we emphasize only those related to the patients.

**Figure 4:** Ancestry of the individuals from the Araras community. Polymorphisms identified by exome sequencing enabled a detailed description of their ancestry. The colors indicate the positions relative to different populations in the world. The dark grey symbols (X) represent each tested individual in the reference principal components analysis (PCA) space constructed using HGDP. Each color symbolizes a major continental group, as indicated in the figure. (a) Symbols represent patients carrying the intron 6 mutation: [a]GO01.br, [b]GO05.br, [c]GO32.br, [d]GO36.br, [e]GO48.br, [f]GO99.br, [g]XP06GO.br, [h]XP08GO.br, [i]XP100GO.br, [j]XP11GO.br, [k]XP33GO.br, [l]XP52GO.br, [m]XP63GO.br, [n]XP56GO.br, [o]XP03GO.br, and [p]XP04GO.br. Homozygous samples are highlighted in red. (b) Symbols represent patients carrying the exon 8 mutation: [1]GO10.br, [2]GO118.br, [3]GO29.br, [4]GO67.br, [5]GO89.br, [6]XP03GO.br, [7]XP04GO.br, [8]XP56GO.br, [9]XP63GO.br and [10]XP88GO.br. The homozygous sample is highlighted in red.

**Table 1: Clinical features and genotypes from all seventeen XP patients from Araras.**

Patient	Genealogy ID	Sex	Birth	Origin	Severity of symptoms*	Skin Phototype	Skin lesions removed	Skin graft	
Intron 6 homozygote									
1	XP06GO.br	IV.2 (A)	Male	2002	Araras (GO)	Mild	I	<10	No
2	XP110GO.br	III.1 (A)	Male	1997	Araras (GO)	Mild	III	<10	No
3	XP100GO.br	III.2 (A)	Male	1992	Araras (GO)	Mild	III	<10	No
4	XP78GO.br	-	Male	1983	Matrinchã (GO)	Mild	V	<10	No
5	XP33GO.br	I.8 (B)	Female	1981	Faina (GO)	Mild	IV	<10	No
6	XP08GO.br	I.3 (B)	Male	1976	Faina (GO)	Mild	IV	<10	No
7	XP45GO.br	II.22 (A)	Female	1975	Araras (GO)	Mild	II	<10	No
8	XP52GO.br	II.17 (A)	Male	1969	Araras (GO)	Severe	III	>50	Yes <sup>1</sup>
9	XP25GO.br	II.16 (A)	Male	1968	Araras (GO)	Mild	III	<10	No <sup>2</sup>
10	XP11GO.br	I.20 (A)	Female	1949	Araras (GO)	Medium	III	>10	No <sup>3</sup>
11	XP85GO.br	I.4 (A)	Male	1936	Araras (GO)	Severe	III	>50	Yes <sup>4</sup>
Intron 6 and Exon 8 heterozygotes									
12	XP63GO.br	III.7 (A)	Male	1981	Araras (GO)	Mild	IV	<10	No
13	XP56GO.br	III.6 (A)	Male	1979	Araras (GO)	Mild	III	<10	No
14	XP03GO.br	II.31 (A)	Female	1978	Araras (GO)	Mild	III	<10	No
15	XP39GO.br	II.29 (A)	Male	1975	Araras (GO)	Severe	III	>50	Yes <sup>5</sup>
16	XP04GO.br	II.28 (A)	Female	1974	Araras (GO)	Medium	III	>10	Yes <sup>6</sup>
Exon 8 homozygote									
17	XP88GO.br	I.31 (A)	Male	1934	Hidrolândia (GO)	Mild	II	<10	No

A and B represents the genealogy ID from Araras or Faina families, respectively.

<sup>1</sup> He carries a prosthesis in his face.

<sup>2</sup> He has a scar on his face.

<sup>3</sup> She has a severe scar on her face, with her chin surgically removed. several surgical events on his face, with many major scars.

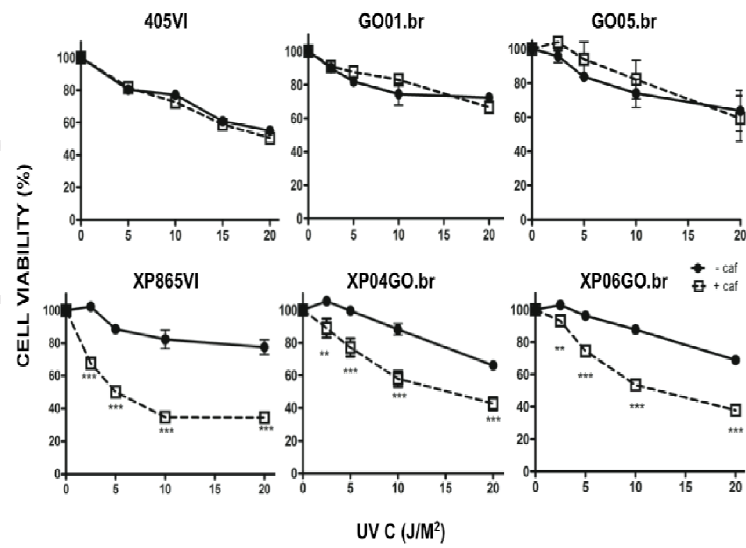
<sup>5</sup> The area all over his right cheek and eye were removed, carried a prosthesis. Deceased in 2015.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

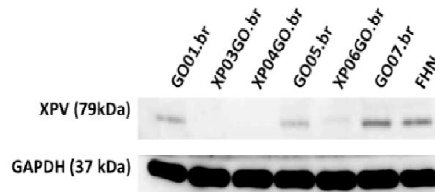
<sup>6</sup> She has a graft area at her nose. She was diagnosed with several melanoma.

\* For patients' symptoms, mild were considered those who presented up to 10 lesions; medium who presented 10 to 50 lesions, and with striking surgeries in their faces; severe who presented more than 50 lesions, and with striking surgeries in their faces.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

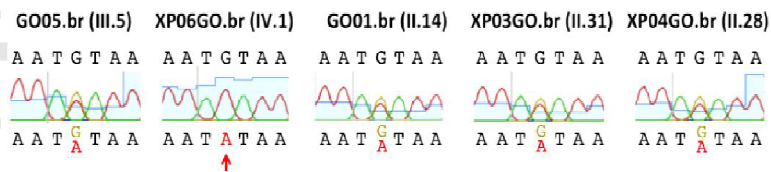


a



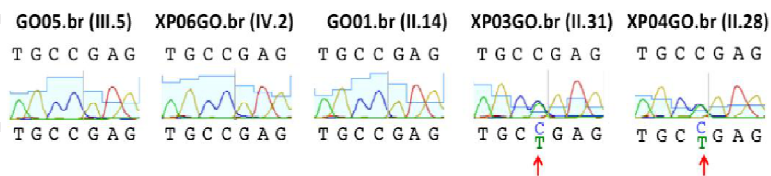
bI

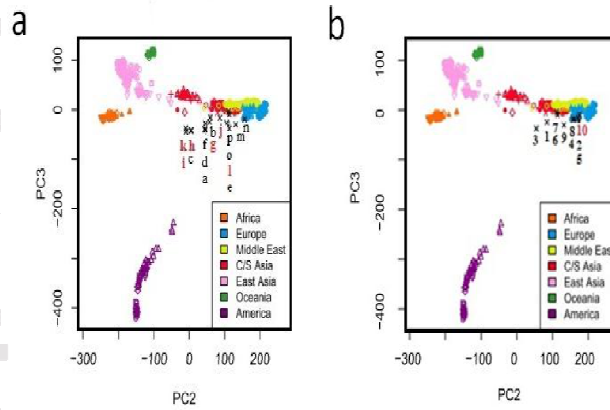
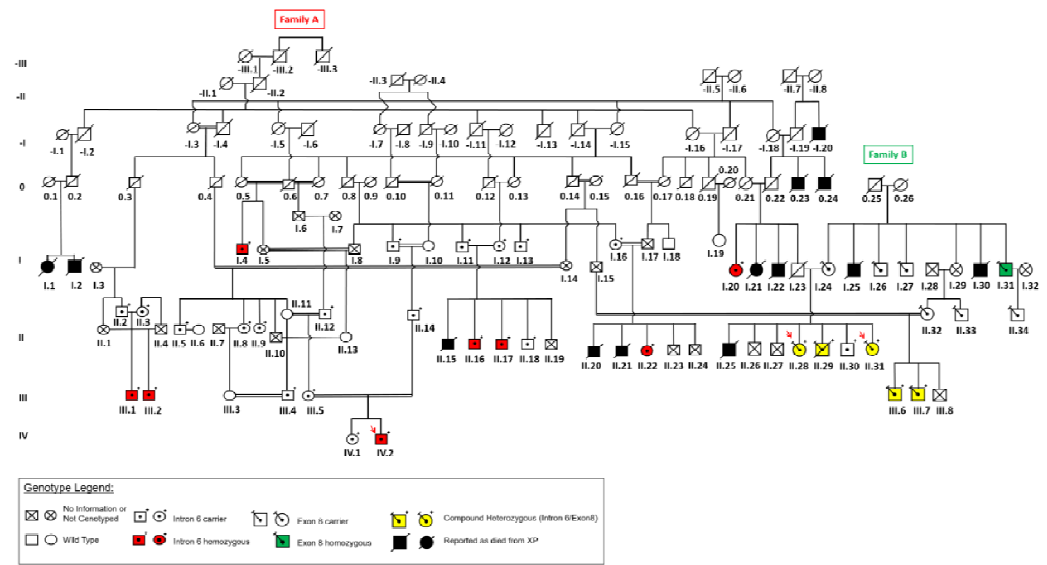
Intron 6 ( Chr6: g.43568829)



bII

Exon 8 ( Chr6: g.43572374)





## - Anexo -

## B - Tabela com características clínicas necessárias ao estudo de caracterização genética dos pacientes com deficiência em NER.

Nome do Paciente:

Diagnóstico clínico do paciente:

<b>Pontos para gravidade Dermatológica (19 pontos)</b>				
1	<b>Idade dos primeiros sintomas</b>	meses: 4 pts	1-5: 3 pts	5-15: 2 pts >16: 1 pt
2	<b>Idade do primeiro diagnóstico</b>	meses: 4 pts	1-5: 3 pts	5-15: 2 pts >16: 1 pt
3	<b>Tem queimaduras após exposição ao sol?</b>			
4	<b>Hiper/hipopigmentação</b>			
5	<b>Idade do Primeiro Tumor</b>	meses: 4 pts	1-5: 3 pts	5-15: 2 pts >16: 1 pt
6	<b>Tipo do primeiro tumor</b>			
7	<b>Quantos tumores já teve</b>	>50: 3 pts	[10:50]: 2 pts	<10: 1 pt
8	<b>Já teve melanoma</b>	4 pts		
9	<b>Tipos dos tumores que já teve</b>			
			n° de Epitelioma (SBB/CBB)	
			n° de Melanoma Maligno (MM)	
10	<b>Tipos de outras lesões que já teve</b>			
11	<b>Total de exposição ao sol durante o dia (De 1 a 4 de acordo com a descrição abaixo)</b>			

- 1- Nunca me exponho ao sol  
 2- Me exponho quando é necessário, mas tomo os devidos cuidados  
 3- Me exponho quando necessário sem tomar os devidos cuidados  
 4- Me exponho sempre e nunca me preocupei com isso

<b>Pontos para gravidade Oftalmológica (12 pontos)</b>	
1	Fotofobia 1 pt
2	Melanose conjuntival interpalpebral 2 pts
3	Hiperemia conjuntival 1 pt
4	Vasos da Conjuntiva "tortuosos" 1 pt
5	Pterígio 1 pt
6	Pinguecula (antes dos 50a) 1 pt
7	Lagofalmo / ectrópio 1 pt
8	Ceratopatia 1 pt
9	Cicatrização da córnea / Neovascularização 1 pt
10	Câncer na superfície ocular 2 pts

<b>Pontos para gravidade Neurológica (8 pontos)</b>	
1	Neuropatia Periférica (motor ou sensorial) 1 pt
2	Patologia Cerebelar 1 pt
3	Perda auditiva neurosensorial 1 pt
4	Cognição prejudicada 1 pt
5	Disfagia/alimentação por gastrostomia endoscópica 1 pt
6	Resposta pupilar anormal / movimentos anormais dos olhos 1 pt
7	Ajuda para andar (ou em cadeiras de roda 2 pontos) 1 pt