

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

AUGUSTO MONTEIRO DE SOUZA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA REGIÃO DE ILHAS CpG DO
GENE SMO EM AMOSTRAS DE CARCINOMA BASOCELULAR NO ESTADO DA
PARAÍBA**

JOÃO PESSOA

2018

AUGUSTO MONTEIRO DE SOUZA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA REGIÃO DE ILHAS CpG DO
GENE SMO EM AMOSTRAS DE CARCINOMA BASOCELULAR NO ESTADO DA
PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador: Prof. Dr. Eleonidas Moura
Lima**

JOÃO PESSOA

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729a Souza, Augusto Monteiro de.

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS NA REGIÃO DE ILHAS
CpG DO GENE SMO EM AMOSTRAS DE CARCINOMA BASOCELULAR NO
ESTADO DA PARAÍBA / Augusto Monteiro de Souza. - João
Pessoa, 2018.

77 f. : il.

Orientação: Eleonidas Moura Lima Lima.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Câncer de pele. 2. CpG-SNPs. 3. Smoothened. 4.
marcadores moleculares. 5. DSAPS. I. Lima, Eleonidas
Moura Lima. II. Título.

UFPB/BC

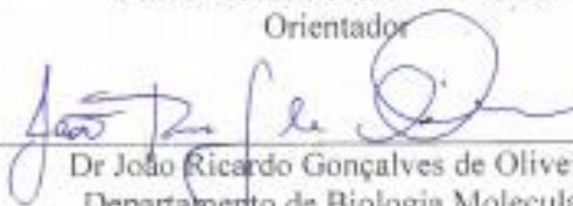
AUGUSTO MONTEIRO DE SOUZA

Dissertação de Mestrado Aprovado em: 30/11/2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Orientador



Dr. João Ricardo Gonçalves de Oliveira
Departamento de Biologia Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno

Prof. Dr. Augusto Cezar Vasconcelos de Freitas Junior
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Suplente Interno



Prof. Dr. Cynthia Germoglio Farias de Melo
Coordenação de Medicina
Faculdade de Ciências Médicas
Suplente Externo

DEDICATÓRIA

*A minha mãe Maria da Paz e a minhas
irmãs pelo amor incondicional e
carinho.*

“A doença é a zona noturna da vida, uma cidadania mais onerosa. Todos que nascem têm dupla cidadania, no reino dos sãos e no reino dos doentes. Apesar de todos preferirmos só usar o passaporte bom, mais cedo ou mais tarde nos vemos obrigados, pelo menos por um período, a nos identificarmos como cidadãos desse outro lugar”

Susan Sontag

AGRADECIMENTOS

Meu grande agradecimento ao meu orientador prof. Dr. Eleonidas Moura Lima que me fez enxergar que existe mais que pesquisa e resultados por trás de uma dissertação, mais vidas humanas. Você não foi somente orientador, mas, em alguns momentos, conselheiro, confidente e amigo. Você é referência profissional e pessoal para meu crescimento.

Ao professor Dr. Plínio Delatorre um grande exemplo de pesquisador e docente, um ser humano maravilhoso e tenho uma enorme gratidão.

A Dra. Sylvia Satomi Takeno Herrero, companheira de laboratório, que acreditou no meu potencial. Sempre disponível e disposta a ajudar, querendo que eu aproveitasse cada segundo dentro do mestrado para absorver algum tipo de conhecimento.

Aos meus colegas de laboratório, pelos momentos divididos juntos, que se tornaram verdadeiros amigos e mais leve meu trabalho. Obrigado por dividir comigo as angústias, alegrias. Ouvirem minhas bobagens e suportarem meu estresse.

Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro, ao Laboratório UNILAB/patologia Ivan Rodrigues/João Pessoa - PB pelo material doado e ao Dr Otávio da Clínica Dermatológica Santa Catarina; João Pessoa - PB – Brasil pelo apoio financeiro utilizado no estudo.

Gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular UFPB por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este sonho que era a minha DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Obrigado a todos os professores e funcionários. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA.

A minha mãe, Maria da Paz Monteiro meu eterno agradecimento. Sempre acreditou em minha capacidade e me acha “O MELHOR de todos”, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu. Obrigado pelo amor incondicional!

As minhas irmãs, Diciane Monteiro e Dayanne Monteiro, aos meus sobrinhos Itallo Bruno, João Pedro e Luiz Augusto meu agradecimento por sempre se orgulharem de mim e confiaram na minha capacidade.

Os meus tios, tias, primos e primas, que vibraram comigo, desde a aprovação da seleção, e sempre fizeram “propaganda” positiva a meu respeito.

RESUMO

O Carcinoma basocelular (BCC) é uma neoplasia cutânea que se origina de células basais epiteliais que perderam sua capacidade de diferenciação e queratinização normais. É um dos tipos de tumores de pele mais frequente. Os BCCs são caracterizados por uma regulação aberrante da via *Sonic Hedgehog*, tipicamente através da perda do receptor PTCH1 e ativação do receptor SMO, resultando na desregulação dos processos envolvidos no crescimento e proliferação celular. A alteração na via sinalização celular *Hedgehog* tem sido detectada em muitos cânceres humanos, sendo desregulada em mais de 30% dos cânceres humanos, incluindo BCC, meduloblastoma (MB), melanoma, mama, próstata, pulmão, pâncreas, câncer de colo e cervical. Os SNPs (Polimorfismo de Nucleotídeo de Base Única) ocorrem com frequência na população, essas variações no genoma podem ser alvo de estudo como propensas à susceptibilidade a doenças, incluindo o câncer. Estudos associaram uma série de SNPs em promotores associado ao silenciamento gênico induzido por metilação em vários tipos de cânceres. Os SNPs nas ilhas CpG, localizadas em regiões promotoras de genes, são propostos como associados a múltiplas doenças. O objetivo deste estudo foi realizar a genotipagem de SNPs na região promotora do gene SMO em amostras de BCC e determinar se há associação desses SNPs do gene em questão à susceptibilidade ao desenvolvimento de BCC. Foram analisadas 100 amostras de tecido parafinado de pacientes do Estado da Paraíba com diagnóstico histopatológico de BCC para cada polimorfismo. Os resultados foram obtidos pelo método DSASP - Dideoxy Single Allele-Specific PCR (*Didesoxi Único Alelo Específico* – PCR). Os softwares *Bioestat* - versão 5.3 e *Haploview* 4.2 foram utilizados para as análises estatísticas e aplicação de teste Qui-quadrado e Exato de Fisher considerando um nível de significância de 5%. As análises sugerem, que o SNP rs538312246 está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, portanto, não apresentou associação significativa com o BCC nas amostras analisadas ($X^2 = 2,343$ e $P < 0,1258$). Entretanto, os SNPs rs375350898 e rs75827493 localizado na região de Ilha CpG do promotor do gene SMO apresentaram associação significativa com o BCC nas amostras analisadas ($X^2 = 27,740/21,500$ e $P < 0,0001$), bem como, o SNP rs75827493 apresentou associação significativa com o BCC do subtipo nodular nas amostras analisadas ($P < 0,0069$). Nesse sentido, os SNPs rs375350898 e rs75827493 são potenciais marcadores moleculares para suscetibilidade ao BCC.

Palavras-chaves: Câncer de pele, CpG-SNPs, Smoothened, marcadores moleculares e DSAPS.

ABSTRACT

Basal Cell Carcinoma (BCC) is a cutaneous neoplasm that originates from epithelial basal cells that have lost their capacity for normal differentiation and keratinization. It is one of the most frequent types of skin tumors. BCCs are characterized by aberrant regulation of the Sonic Hedgehog pathway, typically through the loss of the PTCH1 receptor and activation of the SMO receptor, resulting in the deregulation of the processes involved in cell growth and proliferation. The change in the Hedgehog cell-signaling pathway has been detected in many human cancers, being deregulated in more than 30% of human cancers, including BCC, medulloblastoma (MB), melanoma, breast, prostate, lung, pancreas, cervical and cervical cancer. SNPs (Single Base Nucleotide Polymorphism) occur frequently in the population, such variations in the genome may be the subject of study as susceptible to disease susceptibility, including cancer. Studies have associated a number of SNPs in promoters associated with gene silencing induced by methylation in various types of cancers. SNPs on the CpG islands located in gene promoter regions are proposed as being associated with multiple diseases. The objective of this study was to perform genotyping of SNPs in the promoter region of the SMO gene in BCC samples and to determine if there is an association of these SNPs of the gene in question with the susceptibility to the development of BCC. One hundred samples of paraffined tissue from patients from the State of Paraíba with histopathological diagnosis of BCC were analyzed for each polymorphism. The results were obtained by DSASP - Dideoxy Single Allele - Specific PCR (Dideoxy Single Allele Specific - PCR). The software Bioestat - version 5.3 and Haploview 4.2 were used for the statistical analysis and application of Chi-square test and Fisher's exact test, considering a level of significance 5%. The analyses suggest that the SNP rs538312246 is Hardy-Weinberg equilibrium, therefore, it did not present significant association with BCC in the analyzed samples ($X^2 = 2,343$ and $P < 0,1258$). However, the SNPs rs375350898 and rs75827493 located in the CpG Island region of the SMO gene promoter were significantly associated with BCC in the analyzed samples ($X^2 = 27,740/21,500$ e $P < 0,0001$), as well as, the SNP rs75827493 showed a significant association with the BCC of the nodular subtype in the analyzed samples ($P < 0,0069$). Therefore, the results suggest that SNPs rs375350898 and rs75827493 are potential molecular markers for BCC susceptibility.

Key words: Skin cancer, CpG-SNPs, Smoothed, molecular markers and DSAPS.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCC - Carcinoma basocelular

CCE - Carcinoma de células escamosas

CPNM - Câncer de pele não melanoma

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DSASP - *Dideoxy Single Allele-specific PCR*

LBMEO - Laboratório Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética

MB – Meduloblastoma

MC - Melanoma cutâneo

NBCCS - Síndrome do carcinoma basocelular nevóide

PTCH1 - *Patched 1*

SMO - *Smoothened*

SNP - *Single nucleotide polymorphisms*

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

T_m - temperatura de *melting*

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

UV - Radiação ultravioleta

X² - *Qui-Quadrado*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Características do câncer através de suas capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento tumoral.	14
Figura 2: Fluxograma dos principais fatores de risco genotípico, fenotípico e ambiental para o BCC.	17
Figura 3: Esquematização da via <i>Hedgehog</i> de acordo com a ativação ou silenciamento.	21
Figura 4: Metilação na posição 5 da porção citosina, catalisada pela enzima DNA methyltransferases, na presença de S-adenosil-metionina (SAM) (A). CpGs não metilados dentro da região reguladora do promotor (marrom escuro) não a transcrição.	22
Figura 5: Sequência de nucleotídeos na região promotora do Genes SMO sem SNP's, retirada do banco de dados (ENSEMBL)	25
Figura 6: Sequência de nucleotídeos na região promotora do Genes SMO com possíveis SNP's, retirada do banco de dados (ENSEMBL)	25
Figura 7: Genótipo T/G do SNP rs75827493 com Tm 79,55°C para o alelo T. Essa temperatura representa o fragmento com os dois fragmentos de DNA obtido pela técnica DSASP.	36
Figura 8: Genótipo G/G do SNP rs75827493 com Tm 85,73°C para o alelo G. Essa temperatura representa o fragmento maior de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP.	37
Figura 9: Genótipo T/G do SNP rs375350898 com Tm 81,74°C para o alelo T Essa temperatura representa o fragmento com os dois fragmentos de DNA obtido pela técnica DSASP.	38
Figura 10: Genótipo T/Tdo SNP rs375350898 com Tm 80,09°C para o alelo T. Essa temperatura representa o fragmento menor de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP.	39
Figura 11: Genótipo G/G do SNP rs375350898 com Tm 89,79°C para o alelo G. Essa temperatura representa o fragmento maior de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP.	40
Figura 12: Genótipo G/G do SNP rs538312246 com Tm 89°,98C para o alelo G. Essa temperatura representa o fragmento maior de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP.	41
Figura 13: Genótipo A/A do SNP rs538312246 com Tm 83,14°C para o alelo A. Essa temperatura representa o fragmento menor de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP.	42
Figura 14: Genótipo A/G do SNP rs538312246 com Tm 83,14°C para o alelo A. Essa temperatura representa o fragmento com os dois fragmentos de DNA obtido pela técnica DSASP.....	43
Figura 15: (A) Representação da estrutura de desequilíbrio de ligação (DL) entre os CpG-SNP estudados. (B) Haplótipos formados por este bloco e respectivas frequências.	44

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2018-2019 do número de novos casos de câncer, de acordo com o sexo e a localização primária.	18
Tabela 2: Dados histopatológicos das amostras de pacientes com carcinoma basocelular.	27
Tabela 3: Distribuição da população estudada conforme: gênero, idade, sexo, localização e tipo histopatológico.	34
Tabela 4: Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNP no gene analisado.	35
Tabela 5: Polimorfismos estudados, posição no cromossomo, frequências esperadas e observadas, informações sobre o Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> , MAF (<i>Minor Allele Frequency</i>) e alelos analisados para cada polimorfismo.	44
Tabela 6: Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs75827493.	45
Tabela 7: Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica dos SNP's rs375350898 e rs538312246.	46

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1: Lista dos polimorfismos da região promotora do gene SMO, com a sequência dos iniciadores e complementares específicos, para cada polimorfismo a ser amplificado pelo método DSASP.....	31
Quadro 2: Protocolos para PCR assimétrica (técnica DSASP) e amplificação dos SNPs no gene estudado.....	32

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Câncer	14
1.2. Carcinoma basocelular.....	15
1.2.1 Características gerais.....	15
1.2.2. Etiologia e fatores de risco	16
1.2.3. Epidemiologia	17
1.3 Via <i>Hedgehog</i>	19
1.4 Metilação do DNA (Ilha CpG)	21
1.5 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP).....	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo Geral.....	26
2.2. Objetivos Específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Aspectos éticos.....	27
3.2. Amostras	27
3.3. Biologia Molecular	30
3.3.1. Extração do DNA	30
3.3.2. Validação <i>in silico</i>	30
3.3.2.1. Técnica e desenho dos Primers.....	30
3.3.3 Método Didesoxi Único Alelo Específico PCR (<i>Dideoxy single allele-specific PCR-DSASP</i>)	31
3.3.3.1As condições da PCR	31
3.3.3.2 As condições de hibridação	32
3.3.3.3 Análise da Curve Melting.....	32
3.4. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS	34
4.1 Dados Clínicos Histológicos dos pacientes estudados com BCC.....	34
4.2 Análise da frequência de genótipos de acordo com equilíbrio <i>Hardy-Weinberg</i>	35
4.2 Dados demográficos e histopatológicos SNPs nos genes relacionado com o risco de BCC.	45
5. DISCUSSÕES	47
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	57

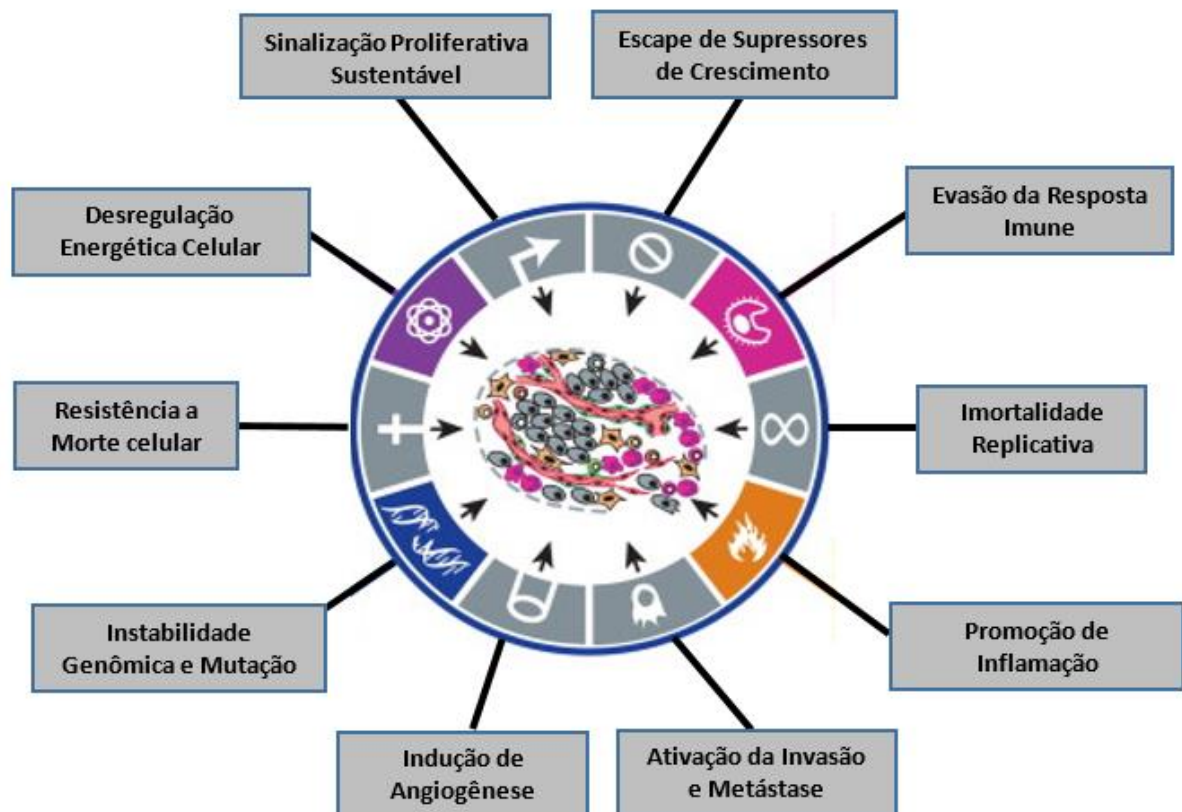
INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer se origina através de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem grupos de genes relacionados à proliferação celular e seu controle, bem como aos relacionados a manutenção da estabilidade genômica (KNUDSON, 1971; BAYLIN et al, 1986; VOGELSTEIN e KINZLER, 1993).

Hanahan e Weinberg (2011) descreveram as características do câncer através de sua capacidade biológica adquirida durante o processo do desenvolvimento tumoral, constituem um princípio sistematizado para entender as complexidades das doenças neoplásicas. Incluem a sustentação da sinalização proliferativa, evitando os supressores de crescimento, resistindo à morte celular, permitindo a imortalidade replicativa, induzindo a angiogênese e ativando a invasão e a metástase (figura 1).

Figura 1: Características do câncer através de suas capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento tumoral.



Fonte: Hanahan e Weinberg, 2011 (Adaptado)

A instabilidade do genoma, gera a diversidade genética que acelera sua aquisição e a inflamação. O progresso conceitual da última década acrescentou duas características, a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição imunológica.

De acordo com Hanahan e Weinberg (2011) o desenvolvimento gradual de células tumorais é ocasionado por uma sequência de mutações que ocorrem aleatoriamente, alterações epigenéticas do DNA que afetam os genes que controlam a proliferação, sobrevivência celular e outras características associadas ao fenótipo celular maligno.

Sendo a progressão tumoral um evento que tem a contribuição sucessiva de mutações que se acumulam na célula, é necessário evitar esse descontrole por mecanismos existentes na célula. As implicações são simples e claras: se a quebra da integridade genômica é um ingrediente essencial na formação de tumores humanos, pode através do enfraquecimento da maquinaria celular provocar a ativação de oncogenes ou a inativação de supressores tumorais (WEINBERG, 2008).

O desenvolvimento celular do câncer pode depender do envolvimento de diversos fatores externos como tabaco, químicos, radiação e organismos infecciosos. De fatores internos como mutações herdadas, hormônios, condições imunes e mutações que afetam o metabolismo. Esses fatores podem estimular ou inibir mecanismos de sinalização celular, podendo a célula desenvolver mecanismos autônomos de multiplicação (HEJMADI, 2010).

1.2. Carcinoma basocelular

1.2.1 Características gerais

O Carcinoma basocelular (BCC) é uma neoplasia cutânea que se origina de células basais epiteliais pluripotentes imaturas, que perderam sua capacidade de diferenciação, queratinização normal e dos anexos cutâneos (ALMEIDA et al., 2009). O BCC é um dos tipos de tumores malignos de pele mais frequente e as lesões proeminentes, apresentam lento crescimento podendo ter comportamento invasivo, no entanto, são raros os casos de metástase (NARALA e COHEN, 2016).

O tipo mais comum de câncer de pele é o Carcinoma basocelular (BCC), seguido pelo carcinoma de células escamosas (CCE) e o melanoma cutâneo (MC) (KOSINIAK-KAMYSZ et al., 2012) sendo este considerado o mais fatal. A incidência de ambos os cânceres de pele melanoma e não melanoma tem aumentado em todo o mundo, neste sentido, é de grande importância obter um profundo conhecimento de câncer de pele, especialmente sua etiologia. Muitos estudos demonstraram que a incidência de câncer de pele varia muito entre diferentes

países e diferentes etnias, sugerindo que fatores genéticos desempenham papéis importantes no desenvolvimento de câncer de pele (WUNING et al., 2014).

O BCC apresenta diferenças em seu comportamento biológico que pode ser explicado pela presença de fatores intrínsecos do próprio tumor como:

Padrão de crescimento tumoral;

Potencial de recorrência e metástase;

Padrão histológico;

Fatores genéticos.

Fatores extrínsecos, como o local de origem, a terapia escolhida e o estado imunológico do paciente com neoplasia, também são importantes (MENDAÇOLLI et al., 2015).

Do ponto de vista histopatológico, observam-se padrões de crescimento variáveis que conferem as diferenças de BCC em seu comportamento biológico. A classificação baseada em padrões de crescimento tem maior significado biológico e considera a existência dos tipos nodular, superficial, infiltrativo, esclerodermiforme, micronodular e padrão misto utilizado na definição de subtipos histológicos de alto e baixo risco de BCC (MENDAÇOLLI et al., 2015; CHINEM e MIOT, 2011).

Os BCCs de alto risco são caracterizados por uma probabilidade aumentada de extensão subclínica, excisão incompleta, invasão agressiva e incluem os tipos; superficial, infiltrativo ou esclerodermiforme e micronodular. Wollina e Tchernev (2013) revelaram que o estadiamento do BCC depende de três parâmetros, tamanho (diâmetro), profundidade de invasão e disseminação metastática estando dividido em 4 estágios, de acordo com o grau de estadiamento:

Estágio I: Tumores <2 cm, limitados à pele;

Estágio II: ≥ 2 cm, limitados à pele e ao tecido adiposo subcutâneo;

Estágio III: Invasão de músculo, cartilagem, osso, linfáticos e invasão perineural;

Estágio IV: Metástases distantes.

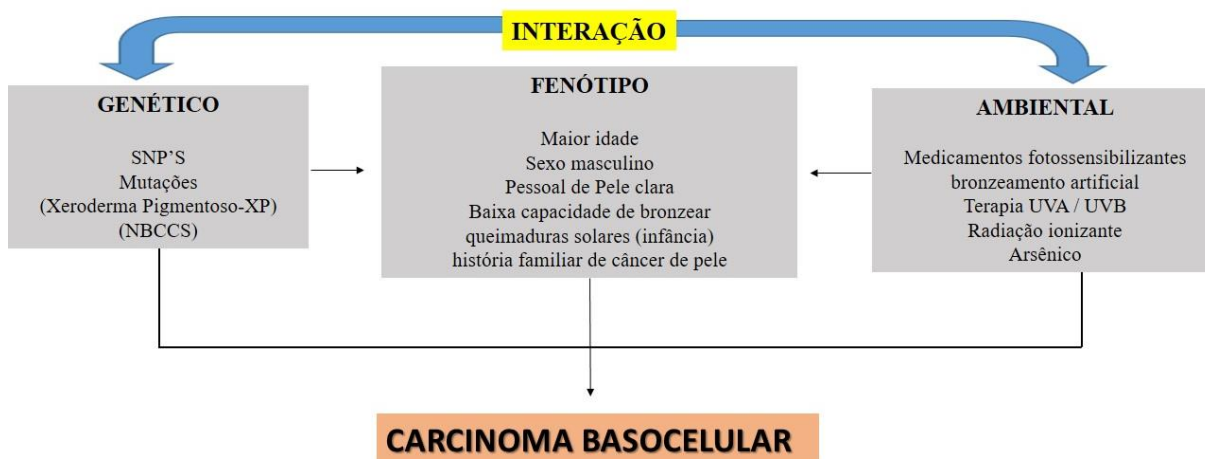
1.2.2. Etiologia e fatores de risco

O risco de desenvolvimento de câncer de pele depende de uma combinação de fatores ambientais e predisposições genéticas pessoais (KOSINIAK-KAMYSZ et al., 2012). Muitos estudos demonstraram que a incidência de câncer de pele está relacionada à etnia, idade, gênero, exposição à radiação ultravioleta (UV) e a capacidade individual de reparação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (CHINEM; MIOT, 2011). Os fatores genéticos também podem

desempenhar um papel importante no desenvolvimento do BCC e nas últimas décadas têm sido explorado o papel da via *Hedgehog* em sua patogênese (PELLEGRINI et al., 2017).

Para Verkouteren et al (2017), o BCC é uma doença complexa porque a probabilidade de desenvolvimento deste tumor depende da interação entre constitucional e predisposição (características genóticas, fenóticas e ambiental) e exposição subsequente a fatores de risco ambientais. O Fluxograma abaixo esquematiza os fatores mais importante (genético, fenotípico e ambiental) para o desenvolvimento de BCC (Figura 2).

Figura 2: Fluxograma dos principais fatores de risco genotípico, fenotípico e ambiental para o BCC.



Fonte: VERKOUTEREN et al (2017)

1.2.3. Epidemiologia

O Carcinoma basocelular é o tipo de câncer de pele mais comum (ASGARI et al., 2015). Existem vários subtipos principais de câncer de pele, incluindo melanoma cutâneo e câncer de pele não melanoma (CPNM) que consiste em carcinoma de células basais (BCC) e carcinoma de células escamosas (CCE) (WUNING et al., 2014). A incidência de BCC está fortemente associada à exposição à radiação UV. Os tumores desenvolvem-se principalmente na pele exposta ao sol de idosos com fotótipos de pele clara, raramente são encontrados em superfícies palmoplantar ou em crianças e nunca aparecem na mucosa. Outros fatores de risco incluem radiações ionizantes, arsênio e supressão imunológica (VERKOUTEREN et al., 2017).

O BCC é a neoplasia maligna cutânea mais frequente e corresponde a 70-80% desses tumores. (CHINEM e MIOT, 2011). O fato de que quase 80% de todos os BCCs estão localizados nas peles expostas ao sol, ou seja, cabeça, pescoço e mãos. O papel da radiação ultravioleta é essencial para a formação desse tipo de câncer. (LOVATT, 2005)

No Brasil, estimam-se 85.170 mil casos novos de câncer de pele não melanoma entre homens e 80.410 mil nas mulheres para cada ano do biênio 2018-2019 (Tabela 1). Esses valores

correspondem a um risco estimado de 82,53 casos novos a cada 100 mil homens e 75,84 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

O câncer de pele não melanoma é o mais incidente em homens nas Regiões Sul (160,08/100 mil), Sudeste (89,80/100 mil) e Centro-Oeste (69,27/100 mil). Nas demais Regiões, Nordeste (53,75/100 mil) e Norte (23,74/100 mil), encontra-se na segunda posição. Entre as mulheres, é o mais incidente em todas as regiões do país, com um risco estimado de (97,46/100 mil) na Região Sul; (95,16/100 mil) no Sudeste; (92,66/100 mil) na Região Centro-Oeste; (45,59/100 mil) na Região Nordeste; e (27,71/100 mil) na Região Norte. (INCA, 2018).

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2018-2019 do número de novos casos de câncer, de acordo com o sexo e a localização primária.

LOCALIZAÇÃO NEOPLASIA MALIGNA	ESTIMATIVAS DOS NOVOS CASOS (2018-2019)			
	Homens		Mulheres	
	Estados Casos	Capitais	Estados Casos	Capitais
PELE NÃO MELANOMA	85.170	17.020	80.410	17.230
PRÓSTATA	68.220	15.720	-	-
MANA FEMININO	-	-	59.700	19.920
COLO DO ÚTERO	-	-	16.370	4.620
CÓLON E RETO	17.380	5.630	18.980	6.820
ESTOMAGO	13.540	3.240	7.750	2.210
CAVIDADE ORAL	11.200	2.770	3.500	1.010
TRAQUEIA/PULMÃO	18.740	4.520	12.530	3.710
LARINGE	6.390	1.540	1.280	420
BEXIGA	6.690	1.920	2.790	890
ESÔFAGO	8.240	1.450	2.550	540
OVÁRIO	-	-	6.150	2.140
LEUCEMIA	5.940	1.480	4.860	1.190
PELE MELANOMA	2.920	800	3.340	880

Fonte: INCA 2018

O câncer de pele não melanoma é o tumor mais incidente entre homens e mulheres no Brasil (Tabela 01), em relação à mortalidade, em 2015, foram 1.137 óbitos em homens e 821 nas mulheres (BRASIL, 2017). Mesmo com a baixa letalidade do câncer de pele não melanoma, sua elevada incidência pode explicar uma ocorrência de óbitos quase semelhante ao câncer de pele melanoma (INCA, 2018). O número de novos casos de câncer de pele não melanomas estimados para o País, no ano de 2010, é de cerca de 115.000, correspondendo a aproximadamente 2,2% das consultas dermatológicas, sendo o risco estimado de 56 casos novos a cada 100 mil homens e 61 a cada 100 mil mulheres (CHINEM; MIOT, 2011). Entretanto, os índices variam de acordo com a região e a composição étnica da população. A estimativas para o ano 2018 de número de casos novos de câncer de pele não melanoma na região da Paraíba é de 2.590, ocupando o 4º lugar de incidência na região nordeste (INCA, 2018).

1.3 Via *Hedgehog*

A via de sinalização *Hedgehog* foi inicialmente descoberta em estudos para compreender o desenvolvimento animal e com propósito de analisar o padrão de segmentação de *Drosophila melanogaster* (NÜSSLEIN-VOLHARD e WIESCHAUS, 1980). A via *Hedgehog* é um mecanismo de sinalização evolutivamente conservado que permite respostas graduais de células e tecidos para controlar processos biológicos fundamentais como: especificação do destino celular, padronização tecidual, regulação da proliferação e manutenção da homeostase tecidual de organismos em desenvolvimento e adultos. A ativação da via, também é essencial para o desenvolvimento adequado da pele e seus apêndices, onde o aumento da ativação dessa via pode levar à hiperproliferação da epiderme, defeitos na diferenciação e câncer (ATWOOD et al., 2015).

Para Varjosalo e Taipale (2008) a via *Hedgehog* desempenha um papel crucial na padronização e organogênese durante o desenvolvimento precoce. Essa via de sinalização é importante na diferenciação das células embrionárias, no desenvolvimento do tecido e formação de órgãos, também tem papel pós-embrionários na reparação e regeneração de tecidos, na manutenção de células-tronco neurais, hematopoiéticas, pele, próstata e de bexiga (PETROVA e JOYNER, 2014). Além disso, a ativação da via *Hedgehog* tem papéis patológicos no crescimento de numerosos cânceres (TEGLUND e TOFTGARD 2010).

Alberts et al. (2010) relataram que as proteínas *Hedgehog* são moléculas de sinalização secretadas que atuam como mediadores locais e morfógenos em muitos tecidos em desenvolvimento, tanto em invertebrados como em vertebrados. Ela é modificada pela ligação covalente de lipídeos e depende para sua ação, de proteoglicanos secretados ou ligados à membrana onde ativam proteínas reguladoras gênicas latentes pela inibição de sua proteólise. Elas também desencadeiam uma mudança de repressão transcricional para ativação, onde a sinalização excessiva ao longo da via nas células adultas podem levar ao câncer.

Os BCCs são caracterizados por uma regulação ascendente aberrante da via *Sonic Hedgehog*, tipicamente através da perda do receptor *Patched 1* (PTCH1) ou ativação do receptor acoplado à proteína G *Smoothed* (SMO) (AMAKYE, JAGANI e DORSCH, 2013), resultando na desregulação de fatores de transcrição GLI que são processos envolvidos no crescimento e proliferação celular.

A relação da ativação da via *Hedgehog* e o câncer tem sido estudado desde relatos de mutações germinativas na perda de função no PTCH em pacientes com Síndrome do carcinoma basocelular nevíide (NBCCS), também denominada de Síndrome de Gorlin. NBCCS é uma

doença autossômica dominante que é caracterizada por anormalidades do desenvolvimento múltiplo e tem uma predisposição para tumores, especificamente BCC, meduloblastoma (MB), rabdomiossarcoma embrionário e meningioma. (HAHN et al., 1996).

Mutações somáticas no PTCH 1 foram identificadas em 90% dos casos esporádicos BCC e mutações de ganho de função em SMO foram detectados no BCC. Em particular, mutações recorrentes em SMO. Estudos funcionais demonstraram que essas mutações, leva à ativação aberrante da sinalização de *Hedgehog* promovendo o desenvolvimento de tumores (BIJLSMA e ROELINK, 2010; GAILANI et al., 1996; OTSUKA et al., 2015). Recentemente, mutações na via *Hedgehog* foram identificados em estudos de sequenciamento de todo o genoma através de uma ampla gama de cânceres. Otsuka et al (2015), observaram em seu estudo que mutações somáticas no PTCH 1 foram detectadas em outros tipos de câncer.

Vários estudos relatam que genes-alvo estão envolvidos em mecanismos de *feedback* com via *Hedgehog* como:

- Regulação do ciclo celular pela CYCLIN D1/2;
- Proliferação celular por exemplo, PDGFR, MYC;
- Apoptose (por exemplo, BCL2);
- Angiogênese (por exemplo, VEGF, ANG).

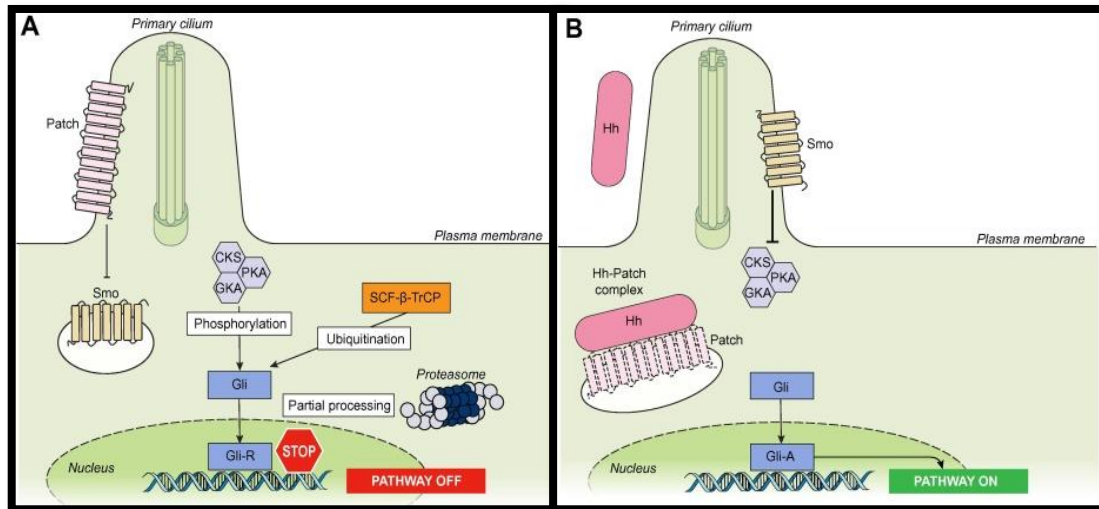
Essas vias apresentam um amplo espectro de mecanismos pelo qual a sinalização de *Hedgehog* pode estar envolvida na carcinogênese (STECCA e RUIZ, 2010; GONNISSEN, ISEBAERT e HAUSTERMANS, 2015), é subsequentemente silenciada na maioria dos tecidos adultos, mas pode ser reativada após lesão para promover a reparação e regeneração. Além disso, a sinalização de *Hedgehog* aberrante, tem sido detectada em muitos cânceres humanos, o que sugere um papel amplo na carcinogênese.

Nos últimos anos, a via de sinalização de *Hedgehog* demonstrou ser um elemento essencial na iniciação do tumor ou na evolução tumorais mais avançados. Estudos mostraram que essa via de sinalização se apresentou desregulada em mais de 30% dos cânceres humanos, incluindo carcinoma basocelular (BCC), meduloblastoma (MB), melanoma, mama, próstata, pulmão, pâncreas, câncer de colo e cervical (SZKANDERA, 2013).

A via *Hedgehog* uma das principais vias de desenvolvimento é uma rede muito complexa que compreende sinalização tanto canônica e não canônica. Ativação da sinalização *Hedgehog* canônica ocorre quando um dos ligantes, ou seja, o *Sonic Hedgehog*; *Desert Hedgehog* ou *Indian Hedgehog* se liga ao receptor PTCH 1, isto alivia a repressão de PTCH 1 por SMO, resultando na acumulação de SMO. Uma vez ativado, facilita a ativação dos fatores de

transcrição GLI que translocam para o núcleo e promove a transcrição de genes para o crescimento e proliferação celular (YANG et al., 2010) (figura 3).

Figura 3: Esquematisação da via *Hedgehog* de acordo com a ativação ou silenciamento.



Fonte: Machado e Diehl (2018).

Na figura 03 Machado e Diehl (2018) descreve a via *Hedgehog* que é uma via de transdução de sinal complexa e fortemente regulada que pode ser simplificada em quatro componentes principais: o ligante *Hedgehog*, o receptor PTCH 1, o transdutor de sinal SMO e o fator de transcrição da Gli.

Na visão de Weinberg (2008), a secreção de altos níveis do ligante *Hedgehog* por várias células tumorais, ativa a alça de sinalização autócrina que resulta na ativação constitutiva da sinalização e na emissão contínua de Gli intacta na qual, é ativadora da transcrição. Segundo Weinberg (2008), a presença de altos níveis de *Hedgehog* em cerca de 70% dos carcinomas pancreáticos humanos sugere a ativação da via (*Hedgehog* -SMO-PTCH 1-GLI) é parte integral dos programas de crescimento neoplásico desses tumores, enquanto essa via de sinalização parece ter um pequeno papel na manutenção.

1.4 Metilação do DNA (Ilha CpG)

As ilhas CpG são regiões do DNA com uma alta quantidade de Citosina (C) e Guanina (G). Em genomas humanos, as ilhas CpG (mais de 40%) são encontradas na região promotora. A metilação do DNA é a alteração epigenética mais estudada. Nela ocorre a adição de um radical metil na citosina base adjacente à guanina (KASAI e KAWAI, 2009). As Ilhas CpG's e a metilação do DNA é uma importante ferramenta no controle de várias funções do genoma.

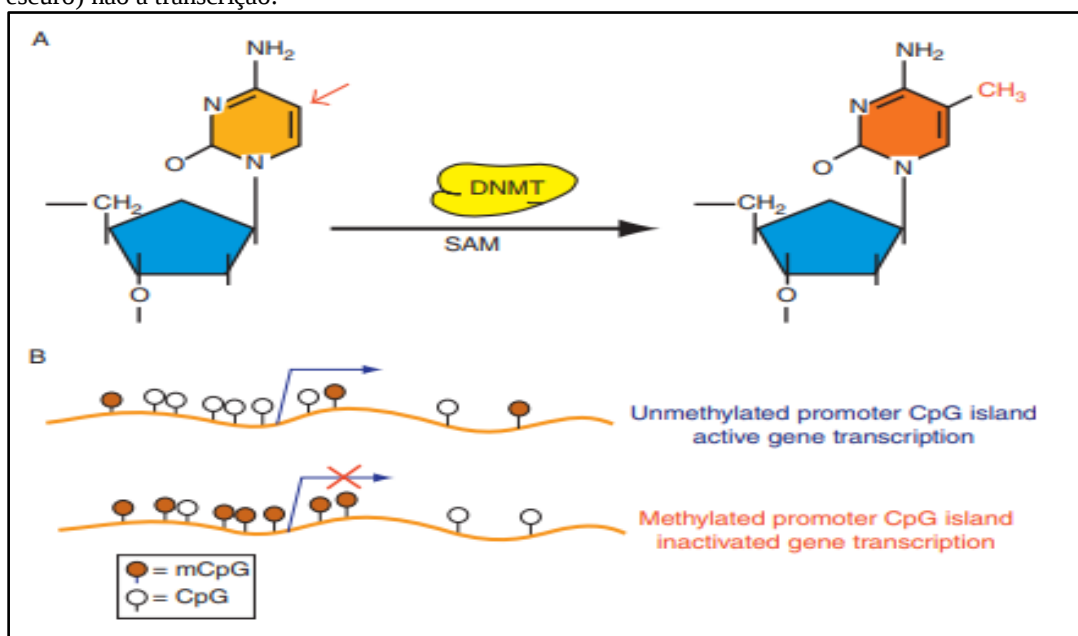
Regiões reguladoras de muitos genes são enriquecidas com CpG, sequências essas que podem ser modificadas por ações enzimáticas através de metilação da citosina (GARDINER e FROMMER, 1987). Kulis e Esteller (2010), observaram dois tipos de alterações tumorais: hipermetilação das de ilhas CpG dos promotores resultando no silenciamento transcricional de genes supressores de tumores e a hipometilação genômica.

A metilação do DNA exerce uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma. Ushijima e Asada (2010) e Denis et al., (2011), relataram que a metilação é um processo essencial durante a morfogênese, para que ocorra desenvolvimento normal, controlando várias funções do genoma como:

- 1- Recombinação durante a meiose;
- 2- Controle da replicação;
- 3- Controle o DNA viral;
- 4- inativação do cromossoma X;
- 4- Estabilização e manutenção da expressão gênica;
- 5- Regulação da diferenciação celular.

A metilação do DNA é a mais estudada dos subcampos da epigenética e na maioria dos eucariotos é caracterizada pela adição enzimática de um grupo metil à posição citosina-5. Isso geralmente ocorre em dinucleotídeos CpG e as DNA metiltransferases, figura 4 (KULIS e ESTELLER, 2010; TOLLEFSBOL, 2011).

Figura 4: Metilação na posição 5 da porção citosina, catalisada pela enzima DNA methyltransferases, na presença de S-adenosil-metionina (SAM) (A). CpGs não metilados dentro da região reguladora do promotor (marrom escuro) não a transcrição.



Fonte: KULIS e ESTELLER, 2010

Geralmente as ilhas CpG não são metilados se os genes são expressos, a metilação desses ilhas desempenha um papel crucial na expressão gênica. As ilhas CpG são marcadores para genes em organismos que contêm 5-metilcitosina em seus genomas (GARDINER e FROMMER, 1987).

Atualmente são necessárias novas ferramentas tecnológicas e diversos *softwares* para detectar as ilhas CpGs em genomas. Muitos algoritmos diferentes foram propostos, a maioria deles com base nos critérios de Gardiner-Frommer (1987). De acordo com os autores, uma ilha CpG é definida como uma região genômica com no mínimo 200bp com as CpG definidas com intervalos de sequência onde o valor Observado/Esperado é maior que 0,6 e o conteúdo de GC é superior a 50%. (WANG e LEUNG, 2004)

Mais de 50% dos genes humanos incluem CpG em suas regiões promotoras. As ilhas CpG são, muitas vezes, não metilado, porém há o aumento do número de CpG que foram relatados como metilado em tecido normal (GARDINER e FROMMER, 1987).

Os dinucleotídeos de Ilhas CpG estão presente no promotor e regiões exônicas de aproximadamente 40% dos genes de mamíferos, em contrapartida, outras regiões do genoma de mamíferos contêm poucos dinucleotídeos CpG e são metilados (SHEN, 2007). A diminuição da ocorrência de CpG é melhor explicado pelo fato de que as citosinas metiladas são *hotspots* plausíveis de mutações, levando a depleção de CpG durante a evolução (TAKAI e JONES, 2002). Ponger, Duret e Mouchiroud (2001), relataram um grande número de experimentos e demonstraram a metilação do promotor sendo assim, as ilhas CpG desempenham um papel importante no:

- 1- Silenciamento de genes;
- 2- Impressão genômica;
- 3- Inativação do cromossomo X;
- 4- Silenciamento de parasitas intragenômicos;
- 5- Carcinogênese.

1.5 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)

Single nucleotide polymorphisms (SNP) são variações em um único nucleotídeo gerando sequências alteradas (alelos), onde o alelo menos frequente cerca de 1% ou mais (BROOKES, 1999). São os tipos mais comum de variação genética humana. Cada SNP representa uma pequena variação ou diferença na sequência de DNA de uma única pessoa. Essas variações relevantes no DNA são frequentemente na forma de alterações únicas de um nucleotídeo

(GIAMPAOLI et al., 2012). Isso indica que polimorfismos não são mutações pontuais, mas mutações que se estabeleceram em pelo menos 1% na população.

Diversos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de identificar conjuntos de SNPs como marcadores para predisposição de doenças multifatoriais, através de estudos de associação ou por mapeamento de pontos de desequilíbrio de ligação em todo genoma (TAKAHASHI et al., 2008). Alterações genéticas como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes envolvidos na via *Hedgehog*, podem resultar em indivíduos susceptível ao desenvolvimento de BCC.

O SNP exemplifica o polimorfismo mais comum, podendo surgir a cada 1000 pares de bases do genoma humano, e é normalmente encontrado em áreas que rodeiam genes codificadores de proteínas, regiões reconhecidas como críticos para a ligação e regulação de microRNA e expressão do gene/proteína. (KARKI et al., 2015; STRACHAN e READ, 2012). Essas variações no genoma podem ser alvo de estudo à susceptibilidade a doenças.

Polimorfismos (variações na sequência do DNA) ocorrem com frequência na população e podem explicar a variação individual no risco da doença. A descoberta de milhões de polimorfismos genéticos no genoma humano possibilitou o estudo dessas variações nas sequências do DNA para a avaliação de risco e tratamento de doenças, incluindo câncer (ERIN et al., 2017).

Pesz (2014), relatou vários estudos que investigaram a influência de vários SNPs no desenvolvimento de BCC. O mesmo autor também observou em seu estudo que um único gene não pode revelar associações de que um único SNP pode transmitir um efeito suficiente no desenvolvimento do BCC, contudo pode haver um efeito aditivo ou mais pares de SNPs que podem influenciar o risco de BCC.

Outros estudos associaram uma série de polimorfismos de nucleotídeo único em promotores com a ocorrência de silenciamento induzido por metilação em grandes séries de cânceres (FENNELL et al., 2018).

Os SNPs CpG em regiões promotoras de genes, são propostos como associados a múltiplas doenças. Até o momento, nenhum estudo se concentrou nas associações entre CpG-SNPs em promotores de SMO e no risco de carcinoma Basocelular.

Tendo em vista que polimorfismos de nucleotídeo único localizado em dinucleotídeos CpG podem gerar ou eliminar um sítio de ilha CpG, essa alteração pode afetar os mecanismos de expressão gênica possibilitando a ativação ou inativação do gene.

As figuras 5 e 6 representam a região promotora do gene SMO obtida da plataforma de banco de dados <https://www.ensembl.org/index.html>, onde é possível observar a região

promotora do gene SMO sem e com mutações (respectivamente as figuras 5 e 6), é plausível que a presença de SNPs possibilitou a mudança na configuração de ilhas CpG.

Figura 5: Sequência de nucleotídeos na região promotora do Genes SMO sem SNP's, retirada do banco de dados (ENSEMBL)



CGCGGGGCGGCGGCAGGCGGGGTCACCAGATCCCCCTAGCCCGGGCCCCTCCAGGCGCCA
 GGGACGCTGACGCTCGCGCTCTTCTCTCTCGCCTCCCCCTCCCCACCTCTCGCTCCTTC
 GTCCAGTCCCTCCCCAGCCTCGGCGCAGGGGGGGCGGGCTTGGCTCGCGAGGCCCGTG
 CATTCCAGAGAGCCAGCGAGCTAGAGCAACAAAGGAGCGGGTCCGCGCGGGGAGAGT
 TCGGGGGGCTGCGGCGCGCTGGGGCGAAGGTGGCTGCTGGGC CGCGGGCTGGCGCGGGGG
 CGGAGCGGAGCTGCACTCGCACCCC CGGCCCGCGTCTGGCCTCCCTCGCGGGGCGGGGA
 GGTGGCTTTAATGGTGGGAGAGGGAATGGGGCTGGGGATTGGGGGCCAGGGGTCTCCTA
 GGGCTGAAGACAACCTTGATTGCGAGGCTAGGGCTTGGGGAGTCTGTCATCCCGTTCCGG
 GCCTCCCGCAGCCCAACATGGGCCCCCGGGTTCCAAAGTTTGCGAAGTTGGGCGCCGAGGGG
 CCGGGGCGCGCGGAGCGTCCGGGGGGGCCCGGGCCCGGATTCTCTGGGCGCACAGGTCCG

Fonte: ENSEMBL, 2018

Figura 6: Sequência de nucleotídeos na região promotora do Genes SMO com possíveis SNP's, retirada do banco de dados (ENSEMBL)



CGYVGGGCGGCRGMAGGYRGGGTCACCARATCCYSVTMRCCMRGGYYYCTCYMGGCKCYA
 GGGACSTRWHGSTCSYGCTCTTCYTCTCTYGCCTCHYCTCCCYACCTCTCYKCTCYTTC
 KTCCARTYCYTCCCCMARCCTYSGSGCAKRGGGGCMGGGCTTGGCWCBGSGAGGCCBKTR
 YVTTCYAGRARCYCAGCGAGCTAGAGCAACARAGRAGCYGGGTCRCGRCGCGGGAGAGT
 TCSSGGRGCTGCRGCGCGCTGGGGCGAAGRTGGCTGCYGGGC CGCKGRCYGGBGCGGGGG
 CGRAGYYGGAGCTGCACTYSYAYS CYCGRCCCR CGWMTGSCCTCCCTCKMGGKGYGSRGW
 RRTGGBTTTAATKGTGGGAGAGRGRATGGRGCTKGGRAYTGGRGKCCYAGGRGTCTCCTR
 GGRCTGAAGACAACCTTGATTGCGAGGSTAGRGCTGGRGAGTCTGTCATYCCGTTYRG
 GCCTCCCGCAGCCCAAYATGGGCCSSSGGTWSCRAAGWYTGCRAAGYTGGGCGCCGAGGGS
 CCGGGGYGCGMRGMGMGYCSNKGGDGCCCGGRYCYGKMTTCTCYGGGMGRCAGRYCGC

Fonte: ENSEMBL, 2018

Através dessa perspectiva em nosso trabalho, surgiu a necessidade do estudo de polimorfismos em ilhas CpG na região promotora dos genes SMO em amostras de material parafinado de Carcinoma Basocelular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar a genotipagem dos SNPs na região promotora do gene SMO, rs75827493, rs375350898 e rs538312246 em amostras de Carcinoma basocelular.

2.2. Objetivos Específicos

- 1 - Estabelecer a frequência alélica dos SNPs rs75827493, rs375350898 e rs538312246 em amostras de Carcinoma basocelular;
- 2 - Estimar a associação dos SNPs do gene em questão à susceptibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma basocelular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Atendendo às resoluções nº 196/96 e 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos e armazenamento de material biológico, o presente estudo faz parte do projeto temático aprovado pelo este estudo está em vias de apreciação no Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba – UFPB sob o código CAAE:36522614.2.3001.5883.

3.2. Amostras

O projeto compreende um estudo retrospectivo onde foram utilizadas 100 amostras de tecido parafinado com tempo superior a cinco anos do banco de laudos expedidos pelo Laboratório UNILAB/patologia Ivan Rodrigues/João Pessoa - PB, com diagnóstico histopatológico de Carcinoma Basocelular, sem distinção de sexo biológico, etnia ou classe social e que possuam informações clínico-patológicas (tabela 2).

Tabela 2: Dados histopatológicos das amostras de pacientes com carcinoma basocelular.

Amostra	Sexo	Idade	Localização da neoplasia	Tipo Histológico
BCC PB 01	Feminino	78	Orelha esquerda	Esclerodermiforme
BCC PB 02	Masculino	66	Orelha esquerda	Nodular ulcerado
BCC PB 03	Masculino	65	Região molar direita	Nodular pigmentado
BCC PB 06	Feminino	78	Orelha esquerda	Nodular
BCC PB 08	Masculino	66	Orelha esquerda	Nodular ulcerado
BCC PB 12	Masculino	78	Orelha direita	Nodular ulcerado
BCC PB 13	Feminino	57	Partes moles de nariz à esquerda	Esclerodermiforme
BCC PB 14	Masculino	83	Canto interno do olho esquerdo	Nodular pigmentado
BCC PB 15	Feminino	74	Orelha direita	Nodular
BCC PB 16	Feminino	78	Partes moles de nariz à esquerda	Nodular pigmentado
BCC PB 17	Masculino	70	Partes moles de orelha direita	Nodular
BCC PB 18	Feminino	53	Partes moles de nariz	Basoescamoso nodular
BCC PB 19	Masculino	85	Partes moles de nariz esquerdo	Superficial
BCC PB 20	Feminino	74	Região Molar esquerda	Nodular pigmentado
BCC PB 21	Feminino	57	Região maxilar esquerda	Infiltrado tecido fibroso
BCC PB 22	Masculino	51	Ombro direito	Nodular
BCC PB 23	Masculino	78	Joelho direito	Nodular
BCC PB 24	Feminino	63	Dorso do nariz	Nodular
BCC PB 25	Feminino	72	Região claviclar esquerda	Nodular

Continua

Amostra	Sexo	Idade	Localização da neoplasia	Tipo Histológico
BCC PB 26	Masculino	78	Região molar esquerda	Superficial
BCC PB 28	Masculino	78	Ponta Nasal	Nodular
BCC PB 29	Masculino	53	Pálpebra inferior do olho esq.	Nodular
BCC PB 30	Masculino	92	Região do esterno	Nodular
BCC PB 36	Feminino	72	Partes moles nariz	Nodular
BCC PB 37	Feminino	58	Partes moles nariz direito	Superficial multifocal
BCC PB 38	Feminino	68	Partes moles nariz	Nodular
BCC PB 39	Feminino	61	Região molar esquerda	Superficial pigmentado
BCC PB 40	Feminino	59	Órbita esquerda (canto lateral)	Superficial pigmentado
BCC PB 42	Masculino	45	Ombro direito	Superficial multifocal
BCC PB 43	Feminino	69	Dorso do Nasal	Nodular
BCC PB 47	Feminino	58	Sulco nasolabial esquerdo	Nodular
BCC PB 48	Feminino	58	Partes moles do nariz	Nodular
BCC PB 49	Masculino	47	Nariz esquerdo	Nodular
BCC PB 50	Masculino	81	Abdômen	Nodular
BCC PB 51	Masculino	77	Orelha direita	Ulcerado
BCC PB 52	Masculino	70	Nariz à direita	Nodular
BCC PB 53	Masculino	77	Nariz à direita	Ulcerado
BCC PB 54	Feminino	55	Braço direito	Superficial, multifocal
BCC PB 56	Feminino	80	Pescoço	Nodular
BCC PB 57	Masculino	94	Pele esternal	Superficial
BCC PB 58	Feminino	74	Região infra palpebral	Nodular
BCC PB 60	Feminino	74	Dorso nasal	Nodular
BCC PB 62	Feminino	80	Região molar esquerda	Nodular
BCC PB 71	Feminino	70	Peitoral esquerdo	Nodular pigmentado
BCC PB 72	Masculino	53	Região frontal esquerda	Não identificado
BCC PB 73	Masculino	54	Nariz	Nodular
BCC PB 75	Masculino	77	Dorso do nasal	Nodular
BCC PB 77	Feminino	71	Canto interno do olho esquerdo	Nodular
BCC PB 78	Feminino	71	Região molar direita	Esclerodermiforme
BCC PB 79	Masculino	62	Face esquerda	Nodular
BCC PB 80	Masculino	73	Região molar esquerda	Nodular ulcerado
BCC PB 81	Masculino	39	Pele Fronte	Superficial
BCC PB 82	Feminino	67	Dorso nasal	Nodular
BCC PB 122	Feminino	65	Órbita	Nodular
BCC PB 124	Feminino	48	Nariz	Superficial
BCC PB 125	Masculino	85	Nariz	Nodular
BCC PB 131	Masculino	51	Região peitoral	Nodular
BCC PB 133	Masculino	63	Região cervical	Nodular pigmentado
BCC PB 134	Masculino	60	Região fronto-temporal	Nodular
BCC PB 135	Masculino	88	Nariz	Nodular
BCC PB 136	Masculino	95	Periorbitaria esquerda	Nodular

Continua

Amostra	Sexo	Idade	Localização da neoplasia	Tipo Histológico
BCC PB 138	Masculino	69	Pescoço	Nodular ulcerado
BCC PB 139	Feminino	66	Nariz	Nodular
BCC PB 141	Masculino	88	Olho	Nodular
BCC PB 142	Masculino	88	Tórax	Nodular
BCC PB 143	Feminino	52	Nariz	Nodular
BCC PB 144	Feminino	52	Ombro direito	Superficial, multifocal
BCC PB 145	Masculino	88	Nariz	Nodular
BCC PB 146	Feminino	67	Região periorbital	Nodular ulcerado
BCC PB 149	Feminino	83	Nariz	Nodular
BCC PB 150	Masculino	43	Fúrcula esternal	Superficial, multifocal
BCC PB 151	Masculino	43	Frontal esquerda	Superficial, multifocal
BCC PB 152	Masculino	43	Pescoço	Superficial, multifocal
BCC PB 153	Masculino	43	Ombro	Superficial, multifocal
BCC PB 155	Feminino	83	Nariz	Nodular
BCC PB 156	Feminino	63	Periórbita	Nodular esclerodermiforme
BCC PB 157	Feminino	78	Temporal esquerda	Nodular/superficial
BCC PB 158	Masculino	58	Ombro	Nodular ulcerado
BCCPB 159	Masculino	53	Ombro	Superficial
BCCPB 160	Masculino	53	Pescoço	Superficial
BCCPB 161	Masculino	72	Mandibular	Nodular
BCCPB 162	Feminino	55	Nariz	Nodular
BCCPB 163	Masculino	62	Nariz	Esclerodermiforme
BCCPB 164	Masculino	69	Região zigomática direita	Nodular
BCCPB 166	Feminino	68	Temporal esquerda	Nodular
BCCPB 168	Feminino	68	Dorso da mão direita	Nodular
BCCPB 171	Masculino	59	Malar direita	Nodular
BCCPB 172	Feminino	69	Região frontal	Nodular pigmentado
BCCPB 173	Feminino	77	Região temporal esquerda	Superficial, multifocal
BCCPB 176	Feminino	67	Face	Nodular
BCCPB 177	Masculino	70	Nariz	Nodular
BCCPB 178	Masculino	79	Nariz	Nodular, pigmentado
BCCPB 179	Masculino	83	Antebraço esquerdo	ceratose actínica
BCCPB 180	Feminino	67	Face	Nodular
BCCPB 181	Feminino	41	Região peitoral	Nodular
BCCPB 183	Feminino	52	Malar esquerda	Nodular
BCCPB 184	Feminino	57	Nariz	Nodular
BCCPB 185	Masculino	78	Nariz	Nodular ulcerado
BCCPB 186	Masculino	58	Nariz	Nodular
BCCPB 187	Feminino	76	Lábio superior direito	Nodular

Fonte: Souza (2018)

No estudo, os dados clínico-patológicos das amostras foram autorizados pelos pacientes ou seus responsáveis legais ratificando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Todas as mostras foram codificadas com o intuito de resguardar o direito à privacidade dos seus doadores.

3.3. Biologia Molecular

3.3.1. Extração do DNA

As amostras foram submetidas à extração do DNA, no Laboratório Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO) do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

As amostras de tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA segundo Shang-Rong Shi et al (2002 com modificações). Foi utilizado de 5 - 8 cortes histológicos com 3µm de espessura cada. Os cortes histológicos foram adicionados em microtubos de 1,7mL e sofreram lavagens de xilol aquecido para retirada da parafina do tecido como descrito por Shang-Rong Shi et al (2002). Após o processo de lavagem por xilol, foi adicionado a amostra seca 1mL de tampão de Extração (Tris/HCL 0,01M; Sacarose 0,32M; MgCl₂ 5mM; Triton X-100 1%, KCl 50mM, NP-40 0,45%; Tween 20 0,45%) e 5µL de proteinase K (10 mg/mL) mantendo as amostras aquecidas a 55°C por 3 horas.

Decorrido este tempo, foram adicionados 1,5mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Neste novo passo a mistura sofreu inversões suaves por aproximadamente 5 minutos para a completa homogeneização. A solução homogeneizada foi centrifugada a 3000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de centrífuga, onde foram adicionados 1,5mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Este microtubo também sofreu inversões suaves até sua homogeneização. Para precipitação do DNA, foi adicionado 1ml de álcool gelado onde foi realizada a centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. O DNA foi desidratado em estufa a 60°C e após a secagem, o DNA foi ressuscitado em 500µl de água Milli-Q estéril.

3.3.2. Validação *in silico*

3.3.2.1. Técnica e desenho dos *Primers*

Para o genotipagem dos polimorfismos de interesse, foi utilizada a técnica do método de genotipagem *Dideoxy Único Alelo Específico PCR (Dideoxy Single Allele-specific PCR-DSASP)* desenvolvida por Lima et al (2015). Os iniciadores foram desenhados por validação *in silico* com auxílio de bancos de dados e software de análise de alinhamento de sequência como: *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>;

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), **Ensembl** (<http://www.ensembl.org>), **GeneRunner** (<http://www.generunner.net/>) e BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

3.3.3 Método Didesoxi Único Alelo Específico PCR (*Dideoxy single allele-specific PCR-DSASP*)

O método DSASP é uma técnica de genotipagem que consiste em desenhar um iniciador (*Primer*) e sequência complementares específicos, ele apresenta alta sensibilidade e pode ser usada para qualquer polimorfismo de base única. A genotipagem pelo método DSASP deve considerar as seguintes recomendações:

1. O ddNTP específico deve ser incorporado na posição do SNP do alelo de interesse.
2. A incorporação do ddNTP específico nunca deve ocorrer entre o SNP de interesse e o primer.
3. O produto de amplificação por PCR assimétrica foi hibridizado com a sua sequência complementar e gerou fragmentos de cadeia dupla com tamanhos e temperatura de *melting* (T_m) diferentes; cada fragmento ou T_m corresponde ao seu alelo específico, o que permite a discriminação do alelo.

O método DSASP encontra-se em vias de padronização para os SNPs dos genes *SMO* rs75827493, rs375350898 e rs538312246. Quadro 1.

Quadro 1: Lista dos polimorfismos da região promotora do gene *SMO*, com a sequência dos iniciadores e complementares específicos, para cada polimorfismo a ser amplificado pelo método DSASP.

SNP'S	ALELO	PRIMER / SEQUÊNCIA COMPLEMENTAR
rs75827493	G/T	5'GCGCTGGGGCGAAGGTGGCTGCT3' 5'AGCCMGC GGCC CAGCAGCCACCTTCGCCCCAGCGC3'
rs375350898	G/T	5'TGCGCCGAGGCTKGGGGAGGGACT3' 5'GCTCCTTCKTCCAGTCCCTCCCCMAGCCTCGGCGCA3'
rs538312246	G/A	5'AGCCGGAGCTGCACTCGCACCC-3' 5'GSCAGACGYGGGCCGGGGGTGCGAGTGCAGCTCCGGCT3'

Fonte: Souza (2018)

O método DSASP e suas condições

3.3.3.1As condições da PCR

A PCR foi realizada num volume final de 25uL contendo 200uM de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e o didesoxinucleotídeo de interesse (ddATP, ddCTP, ddTTP ou ddGTP), cloreto de magnésio 2,0 mM - $MgCl_2$, 20ng/mL de DNA, 200pM iniciadores (Quadro

01) e 0,5U *AmpliTaq Gold* (Life Technologies - Carlsbad, CA). As condições da PCR assimétrica foram as seguintes: uma pré-desnaturação durante 3 minutos a 95°C e 100 ciclos de 95°C durante 20 segundos de 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 20 segundos com uma última extensão de 3 minutos a 72°C. Quadro 2.

Quadro 2: Protocolos para PCR assimétrica (técnica DSASP) e amplificação dos SNPs no gene estudado.

PREPARO DA REAÇÃO PARA PCR	MIX PCR	SNP	SNP	SNP
		rs75827493	rs375350898	rs538312246
	H ₂ O	16µl	16µl	16,5µl
	Tampão	2,5µl	2,5µl	2,0µl
	MgCl +	1,5µl	1,0µl	1,0µl
	Primer	1,0µl	1,5µl	1,0µl
	dNTP+ddNTP	3,0µl	3,0µl	3,0µl
	Tap DNA pol	1U	1U	1U
	DNA	100ng/µl	100ng/µl	100ng/µl
	Volume Final	25µl	25µl	25µl

Fonte: Souza (2018)

3.3.3.2 As condições de hibridação

O produto da amplificação por PCR de cada amostra foi submetida ao protocolo de hibridação sob as seguintes condições: 200pM da sequência complementar (Quadro 01), a 4 °C durante 55 minutos.

3.3.3.3 Análise da Curve Melting

A análise da curva de *melting* para determinação da T_m foi realizada no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies - Carlsbad, CA), seguindo as condições: Pré-aquecimento a partir de 25°C a 95°C durante 1 minuto, dobrando até 60°C para 5 minutos, e um aquecimento gradual (1°C por minuto) até uma temperatura de 95 ° C durante 5 minutos. Para análise da curva de *melting* foi utilizado mistura de SYBR Green 4X e Rox 1X (Life Technologies - Carlsbad, CA).

3.4. Análise estatística

Nas amostras de Carcinoma basocelular as frequências alélicas e os genótipos foram calculados por contagem de alelos e o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi testado por meio de teste Qui-Quadrado (X²). Dessa forma, a lei de *Hardy-Weinberg* fornecerá as frequências alélicas esperadas como controle. Para analisar o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos foi avaliado por meio do cálculo do parâmetro D' usando o *Software* para análise

de haplótipos conhecido como *Haploview* 4.2 Os polimorfismos foram considerados em desequilíbrio de ligação quando os valores de D' foram $\geq 0,75$.

Para verificar a distribuição dos genótipos dos polimorfismos na população estudada e a distribuição de idade, sexo, localização do tumor e tipo histológico na população de pacientes, foi utilizado o teste do Qui-Quadrado ou, quando necessário, o teste Exato de *Fisher* através do *Software Bioestat* - versão 5.3. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Dados Clínicos Histológicos dos pacientes estudados com BCC

O presente estudo foi composto por 100 amostras de pacientes com BCC do Estado da Paraíba. Dos pacientes analisados, cinquenta e dois por cento foram do gênero masculino e quarenta e oito por cento do gênero feminino. A média da idade dos participantes foi de 67,16 anos (variação entre 39 a 95 anos).

Considerando a localização do BCC, prevaleceram os tumores na região da cabeça com 74%, em segundo lugar o tronco 11% e membros superiores, pescoço e membro inferiores, respectivamente com (9%, 5% e 1%). Quanto ao tipo histopatológico apresentaram uma incidência de 75% nodular, 18% superficial, 4% esclerodermiforme, 2% ulcerado e 1% infiltrante. A tabela 3 apresenta a descrição da amostra em relação a todas as variáveis estudadas: (idade do paciente de 30-50/51-70/71-100; gênero (Masculino/Feminino); Localização tumoral (cabeça, pescoço, tronco, membros superiores e membros inferiores) e tipo histopatológico (nodular, esclerodermiforme, superficial, infiltrante e ulcerado).

Tabela 3: Distribuição da população estudada conforme: gênero, idade, sexo, localização e tipo histopatológico.

	Variável	Total de Casos (%)
Gênero	Masculino	52
	Feminino	48
Faixa etária	30-50	9
	51-70	50
	71-90	41
Localização Anatômica	Cabeça	75
	Pescoço	5
	Tronco	11
	Membros superiores	9
	Membros inferiores	1
Tipos Histopatológicos	Nodular	74
	Superficial	18
	Esclerodermiforme	4
	Infiltrante	1
	Ulcerado	2

Fonte: Souza (2018)

4.2 Análise da frequência de genótipos de acordo com equilíbrio *Hardy-Weinberg*

Este trabalho é o primeiro estudo com o objetivo de avaliar a associação dos SNP na região de Ilhas CpG no gene SMO um dos componentes da via *Hedgehog*. A frequência dos polimorfismos foi avaliada nas 100 amostras, totalizando 200 alelos para cada SNP estudado.

O papel da influência de SNPs em região de ilhas CpG no desenvolvimento do carcinoma basocelular ainda é desconhecido. No presente trabalho foram estabelecidas e analisadas as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs rs75827493, rs375350898 e rs538312246 no gene SMO, com a susceptibilidade ao desenvolvimento de carcinoma basocelular no estado da Paraíba e na literatura especializada, segundo Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Dos três CpG-SNP estudados, rs75827493 e rs375350898 mostraram estar associado ao desenvolvimento de BCC nas amostras analisadas, enquanto que o polimorfismo rs538312246 do gene SMO está no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Tabela 4).

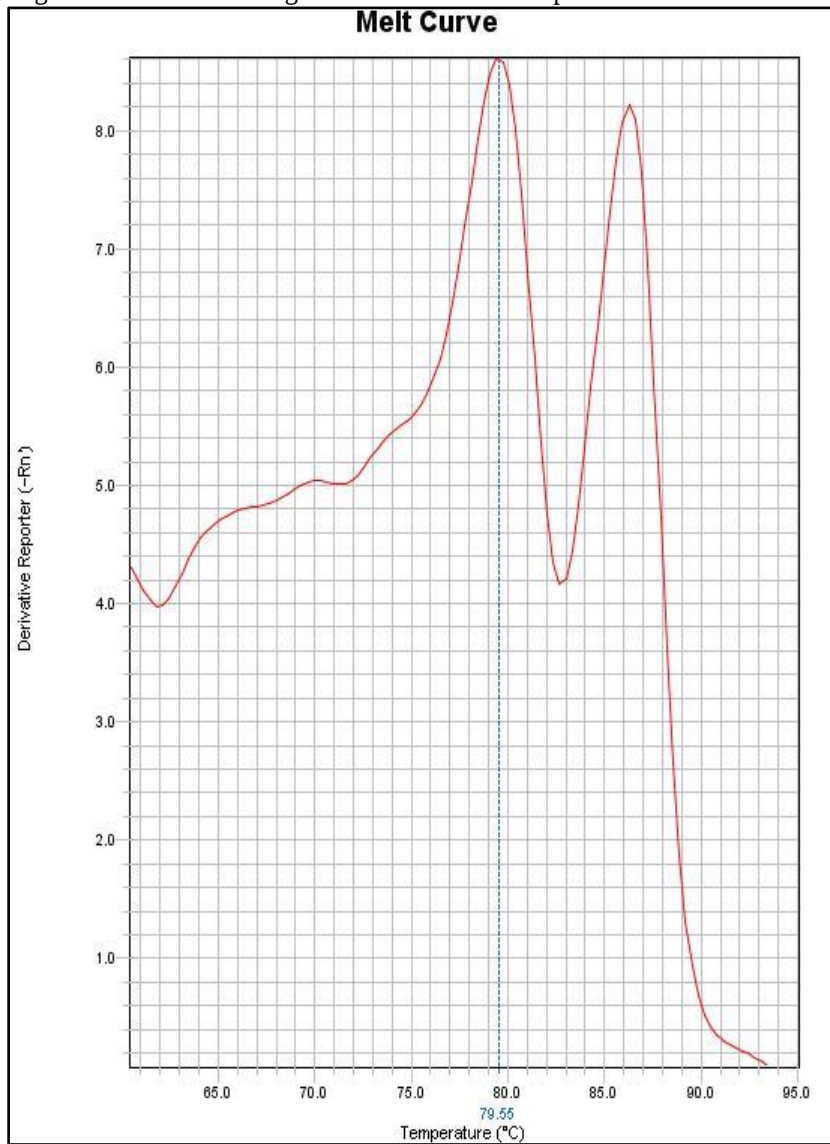
Tabela 4: Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNP no gene analisado.

SNP'S	FREQ. GENOTÍPICA OBSERVADA (%)	FREQ. GENOTÍPICA ESPERADA (%)	FREQUÊNCIA ALÉLICA		χ^2	P-VALOR
SMO RS75827493	TT 0	TT 11,9	T	G	27,740	0,0001
	TG 69	TG 45,2	0,345	0,655		
	GG 31	GG 42,9				
SMO RS375350898	TT 11	TT 22,6	T	G	21,500	0,0001
	TG 73	TG 49,9	0,475	0,525		
	GG 16	GG 27,6				
SMO RS538312246	AA 04	AA 2,1	A	G	2,343	0,1258
	AG 21	AG 24,8	0,145	0,855		
	GG 75	GG 73,1				

Fonte: Souza (2018)

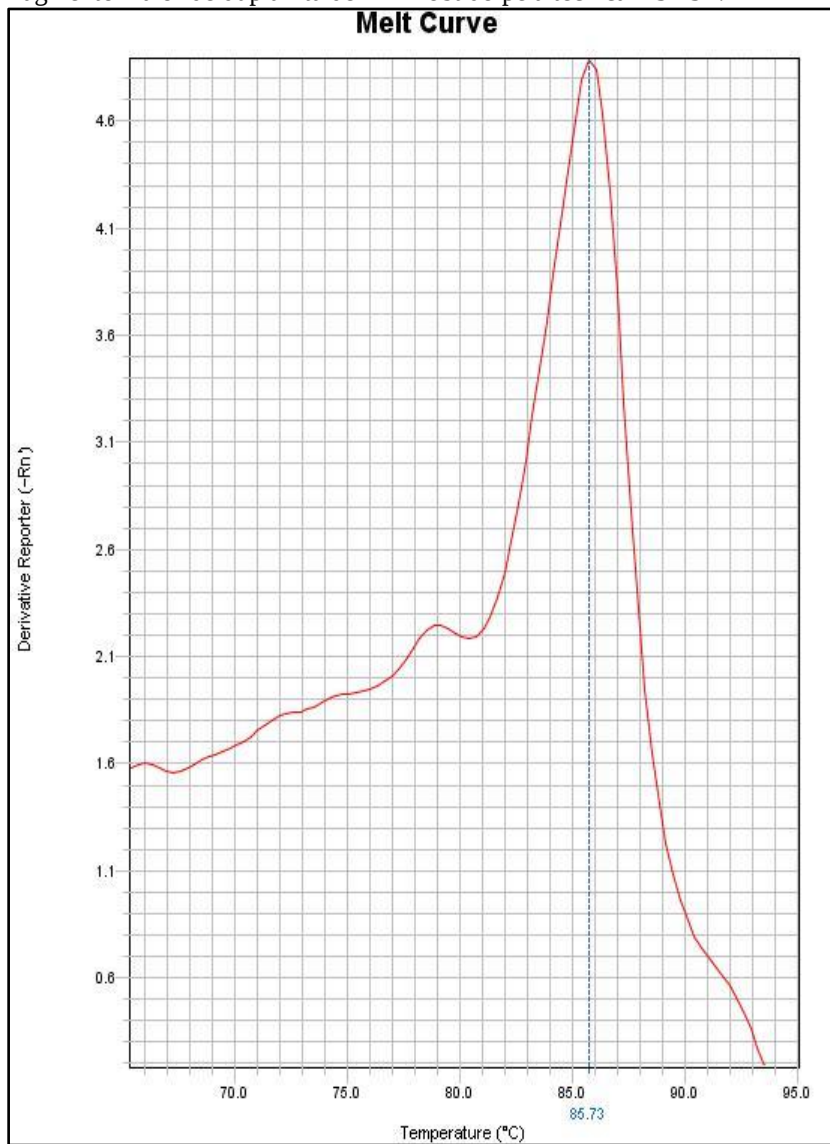
A frequência genotípica do polimorfismo rs75827493 do gene SMO foram as seguintes: 31% (n=31) de G/G, 69% (n=69) de T/G e 0% (n=0) de T/T. A frequência do alelo polimórfico (T) corresponde 34,5% dentro das amostras estudadas, a relação da frequência genotípica observada/esperada indica que está em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* com o $X^2= 27,740$ e P-valor $< 0,0001$. A temperatura de *Melting* (T_m) observada para o alelo T variou entre 79°C e 80°C, enquanto que o alelo G apresentou T_m entre 85°C a 86°C (Figuras 7 e 8). Para o alelo TT essa temperatura representa o fragmento menor de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP. Já o fragmento maior de DNA amplificado representa o genótipo GG.

Figura 7: Genótipo T/G do SNP rs75827493 com Tm 79,55°C para o alelo T. Essa temperatura representa o fragmento com os dois fragmentos de DNA obtido pela técnica DSASP.



Fonte: Souza (2018)

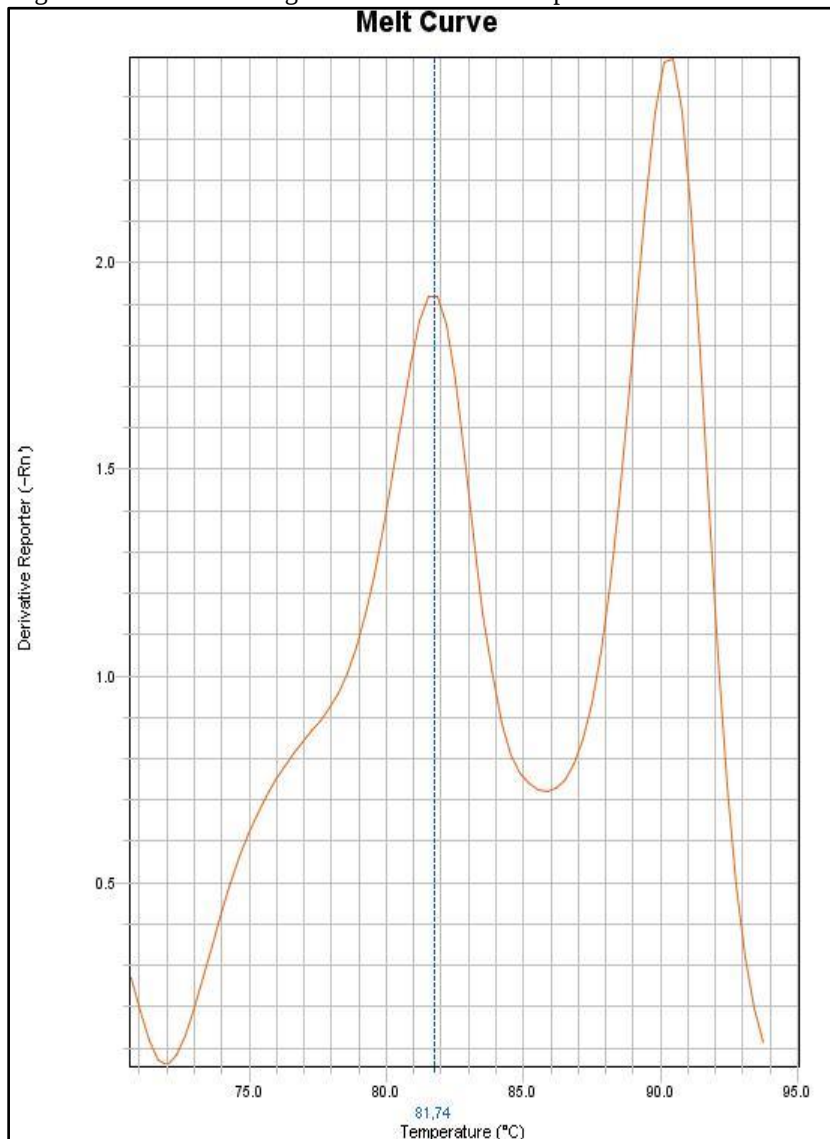
Figura 8: Genótipo G/G do SNP rs75827493 com T_m 85,73°C para o alelo G. Essa temperatura representa o fragmento maior de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP.



Fonte: Souza (2018)

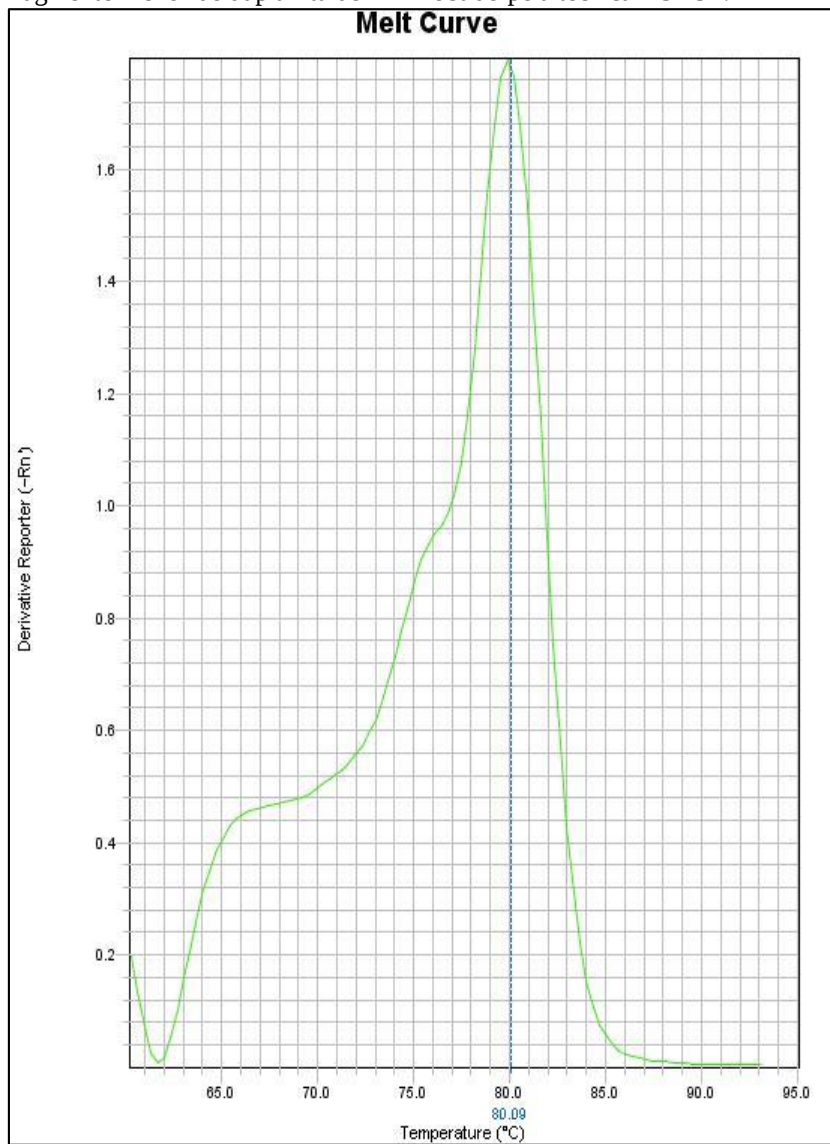
A frequência genotípica do polimorfismo rs375350898 do gene SMO foram as seguintes: 11% (n=11) de T/T, 73% (n=73) de T/G e 16% (n=16) de G/G. A frequência do alelo polimórfico corresponde a 47,5% nas amostras estudadas, a relação da frequência genotípica observada/esperada indica que o SNP está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. $X^2= 21,500$ e P-valor < 0,0001. A T_m observada para o alelo T variou entre 79°C a 82°C, enquanto que o alelo G apresentou T_m entre 89°C a 92°C (Figuras 9, 10 e 11).

Figura 9: Genótipo T/G do SNP rs375350898 com T_m 81,74°C para o alelo T Essa temperatura representa o fragmento com os dois fragmentos de DNA obtido pela técnica DSASP.



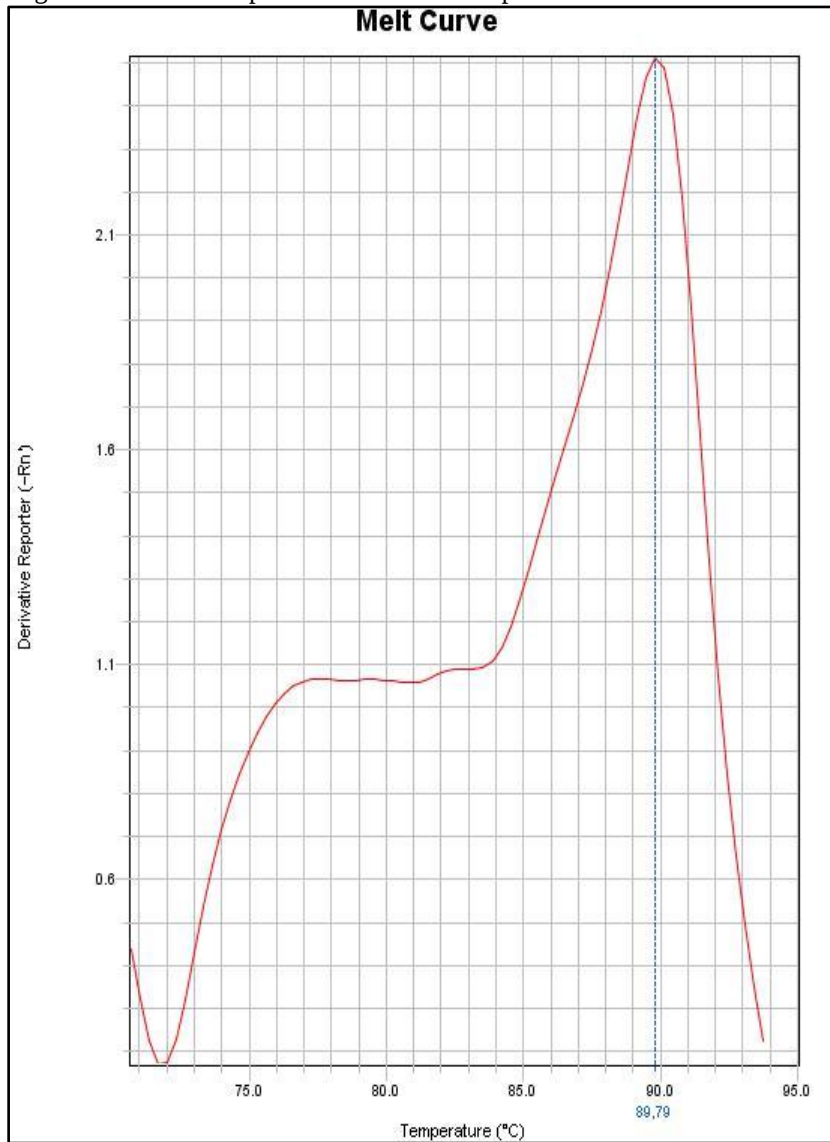
Fonte: Souza (2018)

Figura 10: Genótipo T/Tdo SNP rs375350898 com T_m 80,09°C para o alelo T. Essa temperatura representa o fragmento menor de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP.



Fonte: Souza (2018)

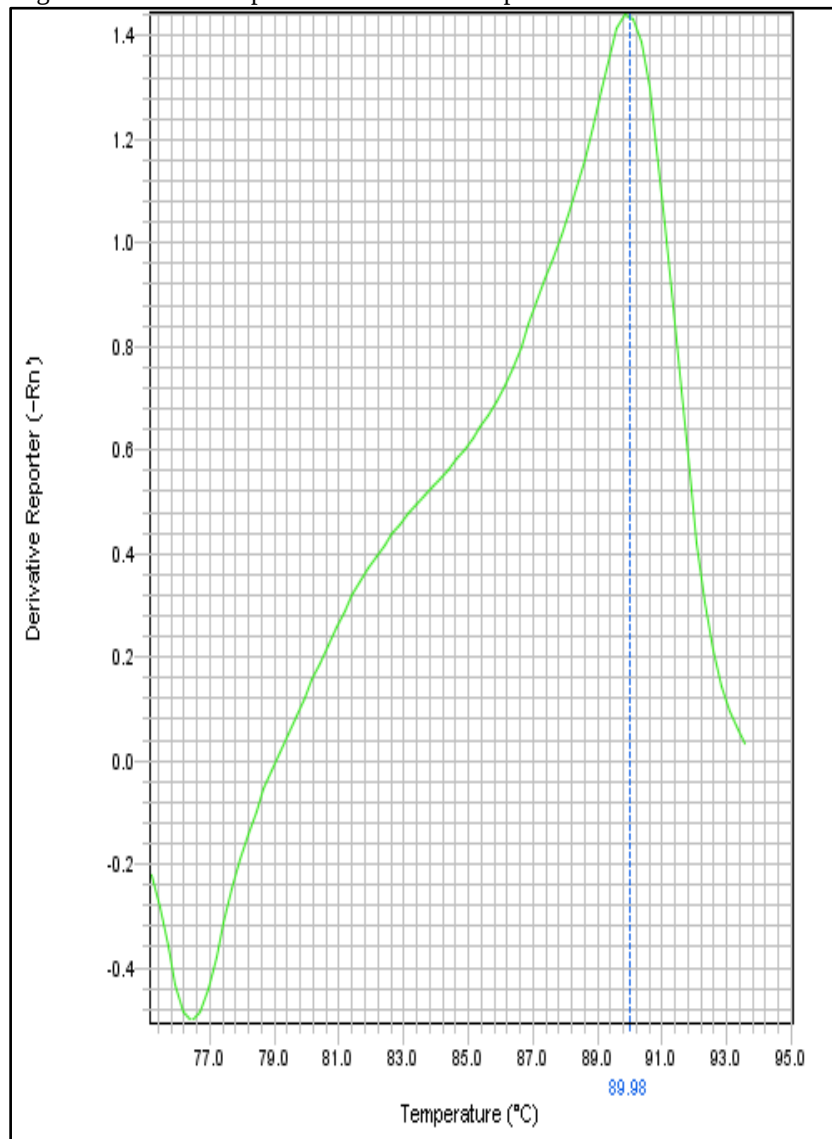
Figura 11: Genótipo G/G do SNP rs375350898 com T_m 89,79°C para o alelo G. Essa temperatura representa o fragmento maior de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP.



Fonte: Souza (2018)

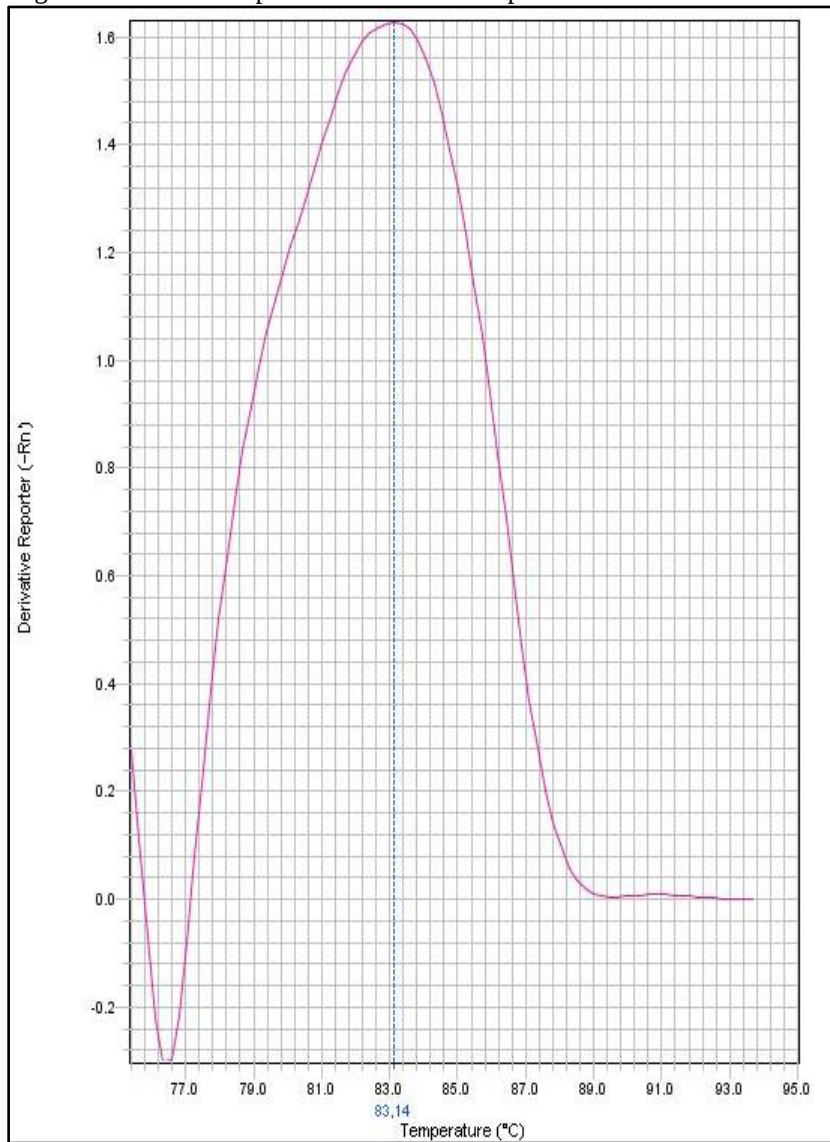
A frequência genotípica do polimorfismo rs538312246 do gene SMO foram as seguintes: 04% (n=04) de A/A, 21% (n=21) de A/G e 25% (n=25) de G/G. A frequência do alelo polimórfico corresponde a 14,5% nas amostras estudadas, a relação da frequência genotípica observada/esperada indica que o SNP está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. $X^2= 2,343$ e P-valor $<0,1258$. A T_m observada para o alelo A variou entre 79°C a 82°C, enquanto que o alelo G apresentou T_m entre 89°C a 92°C (Figuras 12, 13 e 14).

Figura 12: Genótipo G/G do SNP rs538312246 com T_m 89°,98C para o alelo G. Essa temperatura representa o fragmento maior de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP.



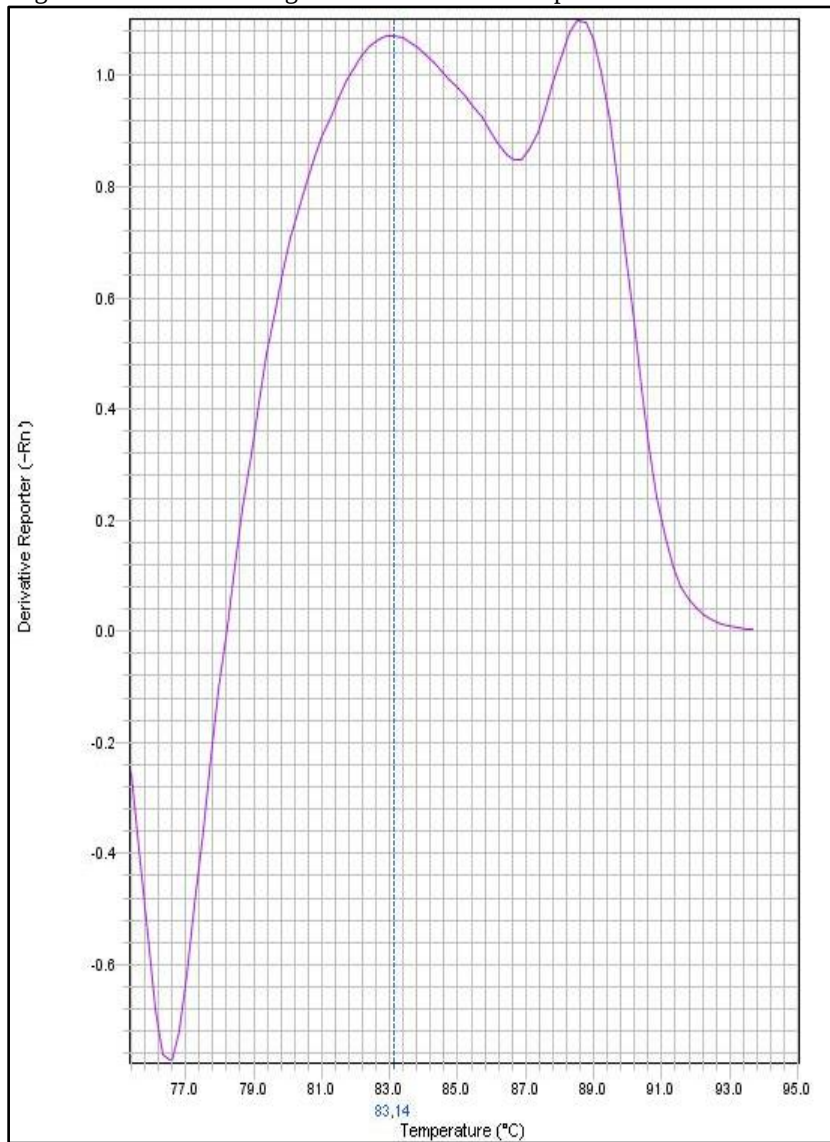
Fonte: Souza (2018)

Figura 13: Genótipo A/A do SNP rs538312246 com T_m 83,14°C para o alelo A. Essa temperatura representa o fragmento menor de dupla fita de DNA obtido pela técnica DSASP.



Fonte: Souza (2018)

Figura 14: Genótipo A/G do SNP rs538312246 com T_m 83,14°C para o alelo A. Essa temperatura representa o fragmento com os dois fragmentos de DNA obtido pela técnica DSASP.



Fonte: Souza (2018)

Avaliou-se também a segregação alélica dos polimorfismos estudados, com o objetivo de verificar se os mesmos estão em desequilíbrio de ligação (DL), Tabela 5. A análise foi feita através do *software Haploview*. O estudo mostrou desequilíbrio de ligação entre os dois polimorfismos associação significativa CpG-SNP (rs375350898 e rs75827493), com $D' = 0.909$, $r^2 = 0.571$ a distância entre eles é de aproximadamente 0.1kb.

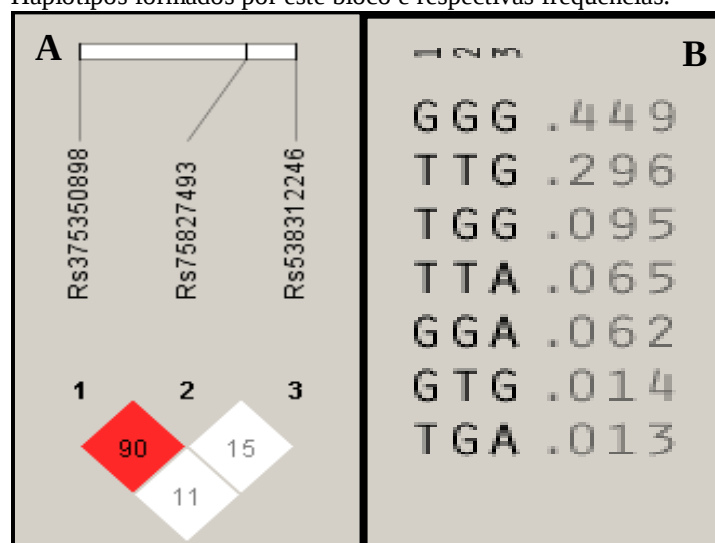
Tabela 5: Polimorfismos estudados, posição no cromossomo, frequências esperadas e observadas, informações sobre o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, MAF (Minor Allele Frequency) e alelos analisados para cada polimorfismo.

SNP	Posição	ObsHET	PredHET	HWpval	MAF	Alelos Avaliados
rs375350898	7:128828413	0.72	0.499	0.0001	0.47	G:T
rs75827493	7:128828578	0.76	0.471	0.0001	0.38	G:T
rs538312246	7:128828625	0.21	0.248	0.2389	0.14	G:A

Fonte: Souza (2018)

Os dois SNPs foram agrupados em um bloco como mostra a figura 15 (A). Os haplótipos formados por este bloco estão representados na figura 15 (B). Os agrupamentos com frequência inferior a 1% não são mostrados na análise. As frequências encontradas são: GGG 44,9%, TTG 29,6%, TGG 9,5%, TTA 6,5%, GGA 6,2%, GTG 1,4% E TGA 1,3%. Cores mais escuras de vermelho indicam forte desequilíbrio de ligação ($D' = 100$, segregação não aleatória dos alelos) e as mais claras e brancas mostram fraco desequilíbrio ($D' < 100$) ou ausente ($D' = 0$, segregação independente dos alelos).

Figura 15: (A) Representação da estrutura de desequilíbrio de ligação (DL) entre os CpG-SNP estudados. (B) Haplótipos formados por este bloco e respectivas frequências.



Fonte: Souza (2018)

4.2 Dados demográficos e histopatológicos SNPs nos genes relacionado com o risco de BCC.

Quando analisada a associação dos genótipos encontrados para o CpG-SNP rs75827493 (T>G) do gene SMO com as variáveis: gênero, faixa etária, localização anatômica da neoplasia e tipos histopatológicos. Os resultados sugerem que houve significância estatística entre os genótipos dos tipos histopatológicos ($p=0,0069$), porém para as outras variáveis estudadas, observou-se que não houve nenhuma significância estatística (tabela 6).

Tabela 6: Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs75827493.

<i>Variável</i>	Total	Genótipo T/T	Genótipo T/G	Genótipo G/G	p-valor
<i>Gênero</i>					
<i>Masculino</i>	52	0	32	20	0,1297
<i>Feminino</i>	48	0	37	11	
<i>Faixa etária</i>					
<i>30-50</i>	9	0	7	2	0.9005
<i>51-70</i>	50	0	34	16	
<i>71-90</i>	41	0	28	13	
<i>Localização Anatômica</i>					
<i>Cabeça</i>	74	0	51	23	0.9817
<i>Pescoço</i>	5	0	4	1	
<i>Tronco</i>	11	0	7	4	
<i>Membros superiores</i>	9	0	6	3	
<i>Membros inferiores</i>	1	0	1	0	
<i>Tipos Histopatológicos</i>					
<i>Nodular</i>	75	0	58	17	0,0069
<i>Esclerodermiforme</i>	4	0	1	3	
<i>Superficial</i>	18	0	10	8	
<i>Infiltrante</i>	1	0	1	0	
<i>Ulcerado</i>	2	0	0	2	

Fonte: Souza (2018)

Pode também ser observado que em relação aos SNP's rs375350898 e SNP rs538312246 não houve significância estatística entre os genótipos encontrados com relação ao gênero, faixa etária, localização do tumor e tipos histopatológicos (tabela 7).

Tabela 7: Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica dos SNP's rs375350898 e rs538312246.

SNP rs375350898					
Variável	Total	Genótipo T/T	Genótipo T/G	Genótipo G/G	p-valor
Gênero					
Masculino	52	4	40	8	0,5176
Feminino	48	7	33	8	
Faixa etária					
30-50	9	0	8	1	0,1847
51-70	50	7	33	10	
71-90	41	4	32	5	
Localização Anatômica					
Cabeça	74	10	51	13	0,9195
Pescoço	5	0	5	0	
Tronco	11	0	9	2	
Membros superiores	9	1	7	1	
Membros inferiores	1	0	1	0	
Tipos Histopatológicos					
Nodular	75	8	53	14	0,6733
Esclerodermiforme	4	1	2	1	
Superficial	18	2	15	1	
Infiltrante	1	0	1	0	
Ulcerado	2	0	2	0	
SNP rs538312246					
Variável	Total	Genótipo A/A	Genótipo A/G	Genótipo G/G	p-valor
Gênero					
Masculino	52	1	11	40	0,5994
Feminino	48	3	10	35	
Faixa etária					
30-50	9	1	2	6	0,5437
51-70	50	1	12	37	
71-90	41	2	7	32	
Localização Anatômica					
Cabeça	74	4	17	53	0.9099
Pescoço	5	0	0	5	
Tronco	11	0	3	8	
Membros superiores	9	0	1	8	
Membros inferiores	1	0	0	1	
Tipos Histopatológicos					
Nodular	75	1	17	57	0.2160
Esclerodermiforme	4	1	0	3	
Superficial	18	2	4	12	
Infiltrante	1	0	0	1	
Ulcerado	2	0	0	2	

Fonte: Souza (2018)

5. DISCUSSÕES

Análise de variação de sequência de DNA, fornece uma ferramenta poderosa para entender a suscetibilidade à doença. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem alterar as propriedades biológicas da proteína codificada e afetar os níveis de expressão gênica de uma maneira específica do alelo. A ativação descontrolada da via *Hedgehog* leva à progressão do tumor em vários tipos de câncer, incluindo câncer de células basais, meduloblastoma, pâncreas, cólon, pulmão, mama, próstata e sangue (AMAKYE, JAGANI e DORSCH, 2013).

Os SNPs em regiões codificantes são propostos como associados a múltiplas doenças. Entretanto, o estudo de SNP's em regiões de *intron* e regiões promotoras são importantes para a compreensão do mecanismo de regulação genética da carcinogênese. De acordo com Calixto et al (2017), a substituição da base em uma sequência de DNA em uma região intrônica podem promover alterações na regulação gênica no nível pós-transcricional, fazendo surgir novos locais de processamento que alteram elementos reguladores de *Splicing* e causam a formação do câncer.

Esse é o primeiro estudo que relata a associação entre polimorfismos em ilhas CpG na região promotora do gene SMO com o risco de carcinoma basocelular, foi estudado que SNPs-CpG poderiam influenciar os níveis de metilação do DNA proporcionando mutações de ganho de função no SMO e que a proteína associada a via *Hedgehog* pode possibilitar a suscetibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma Basocelular.

O estudo de três SNP's na região de ilhas CpG do gene SMO, os CpG-SNP rs75827493 e rs375350898, apresentaram uma frequência do alelo polimórfico de 34,5% e 47,5% (respectivamente). A relação da frequência genotípica observada/esperada indica que esses CpG-SNP estão em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* apresentando o P-valor <0,0001 e provavelmente esses CpG-SNP podem estar associado com o desenvolvimento de carcinoma basocelular. DL é a associação não-aleatória de alelos em dois ou mais *loci* em um cromossomo e a análise de haplótipos representa uma abordagem poderosa na busca de alelos causadores de doenças e na localização das mutações subjacentes e que há desequilíbrio de ligação entre os dois polimorfismos associados significante.

Nossos estudos corroboram com o trabalho de Kaminsky et al. (2009) em que os níveis de metilação do DNA em *locus* específicos estarem sob controle genético, isso ganhou força nos últimos anos, reforçada pelos resultados obtidos na comparação de padrões de metilação do DNA entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos.

Devido à mutabilidade dos dinucleotídeos citosina-fosfato-guanina (CpG), os CpG-SNP, são uma importante classe de polimorfismos de regulação e conectam a variação genética à variabilidade individual do epigenoma.

Recentemente, vários estudos sugeriram que variações no código genético estão associadas aos níveis de metilação do DNA em locais de ilhas CpG próximas as regiões promotoras. Dayeh et al (2013) observaram que 19 dos 40 (48%) SNPs estudados estavam associados a diabetes tipo 2, podendo esses SNPs introduzem ou removem um local CpG, eles gerados dados bem sucedido de metilação do DNA para 16 destes 19 CpG-SNP, eles estudaram diversos genes candidatos à diabetes tipo 2: TCF7L2, KCNQ1, PPARG, HHEX, CDKN2A, SLC30A8, DUSP9, CDKAL1, ADCY5, SRR, WFS1, IRS1, DUSP8, HMGA2, TSPAN8 e CHCHD9 e todos os CpG-SNPs analisados foram associados à metilação diferencial do DNA do sítio CpG-SNP na região promotor.

A presença de alguns polimorfismos de nucleotídeo único localizado em dinucleotídeos CpG podem gerar ou eliminar um sítio de ilha CpG, denominado CpG-SNPs. Os CpG-SNPs são considerados para ajustar a interação do genético (SNP) e epigenética (metilação do DNA), que afetam os mecanismos de expressão gênica possibilitando a ativação ou inativação do gene (CHEN et al. 2017).

Acredita-se que esses SNPs em CpG nas regiões promotoras de genes estão associados a múltiplas doenças, incluindo diabetes tipo 2 (DAYEH et al., 2013), doença coronariana (CHEN et al., 2016; YE et al., 2015), câncer de mama (HARLID et al., 2011) e câncer de ovário epitelial (KOESTLER et al., 2014). Os resultados obtidos nesse trabalho podem sugerir uma nova linha de pesquisa dentro do estudo de BCCs.

Ye et al. (2015) analisaram 7 SNPs em ilhas CpG perto do promotor de genes relacionado com a via trombótica, eles revelaram que os SNPs (CYP2C19 rs12773342 e F7 rs510317) foram associados com doença coronariana. Embora apenas 2 dos 7 CpG-SNPs nos genes da via trombótica tenham se mostrado associados à doença coronariana, futuras investigações de outros SNPs nos sítios CpG são necessárias para explorar a interação entre os SNPs e a metilação do DNA.

De um modo geral KOESTLER et al., (2014) em seus estudos contribuíram para o crescente arquivo de estudos de genômica integrativa, explorando a relação entre genética e epigenética e o risco do câncer de ovário epitelial. Os autores identificaram 17 CpG-SNP que representam potenciais mediados por metilação entre o genótipo e o risco de câncer de ovário epitelial. Esses achados fornecem informações adicionais sobre a etiologia da doença e podem servir como novos biomarcadores para a suscetibilidade do câncer.

A existência de sítios CpG é um pré-requisito essencial das modificações do DNA (DAYEH et al., 2013). Embora, poucos estudos tenham focados nos SNPs envolvendo sítios CpG, eles são um potencial biomarcadores que podem influenciar diretamente a modificação epigenética.

Chen et al (2018), relataram associações entre CpG-SNPs em promotores de miRNA e o risco de câncer de mama. Nesse estudo, 138 miRNAs expressos diferencialmente entre o câncer de mama e os tecidos não cancerígenos, eles foram identificados usando o banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). No total, 13 SNPs selecionados nos promotores dos miRNAs foram avaliados em um estudo de caso-controle de mulheres chinesas, incluindo 1.486 casos e 1.519 controles. Após análise de regressão logística multivariada, descobriram que três CpG-SNPs: rs1190983, rs155247 e rs62382272 estavam significativamente associados à suscetibilidade ao câncer de mama na população, esses resultados indicaram que os três CpG-SNPs nos promotores de miRNAs provavelmente possuíam importantes funções biológicas para o câncer de mama.

O presente estudo foi composto por pacientes BCC. A média da idade dos participantes foi de 67,16 anos (variação entre 39 a 95 anos). A ocorrência de câncer aumentou à medida que a população envelheceu. Os dados histopatológicos demonstram que 90% de todos os BCC foram diagnosticados com idade acima 51 anos. As taxas de incidência de BCC geralmente mostram tendências crescentes ao longo do tempo em mulheres e homens, sugerindo uma probabilidade crescente de desenvolver BCC com o avançar da idade (CHEN et al. 2014).

Vários outros fatores também podem explicar o aumento da incidência de BCC. Além do avanço da idade, pode-se incluir hábitos de exposição solar, uso de câmaras de bronzamento artificial, depleção de ozônio e aumento da expectativa de vida. Além disso, a exposição a carcinogênicos químicos, como poluentes do ar e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, também pode aumentar o risco de câncer de pele (CHEN et al. 2007).

Chen et al. (2014), encontraram taxas de incidência de BCC geralmente mais altas em homens do que em mulheres durante os períodos de acompanhamento, o que foi consistente com vários estudos anteriores.

Pellegrini et al. (2017), relataram que os homens são mais frequentemente afetados que as mulheres, geralmente após os 50 anos de idade. No entanto, um aumento notável na incidência de BCC tem sido observado recentemente em mulheres jovens, provavelmente devido ao uso de sistemas de bronzamento artificial para fins cosméticos. Os indivíduos mais jovens desenvolvem um BCC predominantemente localizado no tronco e nos membros,

causado pelo aumento da afluência e consequente exposição ao sol esporádica relacionada ao lazer.

As lesões na cabeça e pescoço são mais frequentes, o resultado obtido no presente estudo, verificou-se que 79% tinham localização anatômica na cabeça e pescoço, esses dados corroboram com a literatura. Para Puig e Berrocal (2015) a presença de múltiplos tumores primários na região da cabeça e pescoço é um dos fatores de risco associados à ocorrência de metástases. Assim, entre 85 e 90% do BCC metastático é devido a tumores primários de cabeça e pescoço.

Quanto aos tipos histopatológicos, os mais prevalentes foram o nodular 75% seguido do superficial 18%. Sendo que no SNP rs75827493 Os resultados sugerem que houve significância estatística entre os genótipos dos tipos histopatológicos ($p=0,0069$). Sugere-se que além da influência do genótipo o padrão histológico estão significativamente associadas com a susceptibilidade ao BCC. Para Chen et al. (2014), o desenvolvimento da carcinogênese do BCC apresenta uma maior incidência do padrão nodular dentro da população.

De acordo com Chen et al. (2014), a carcinogênese para o desenvolvimento de BCC nodular requer um maior tempo de exposição à radiação solar do que o BCC superficial.

A capacidade em detectar SNP em uma população, principalmente em regiões promotora, vem modificando profundamente os estudos de genética humana. Uma das maiores importâncias do estudo em polimorfismos tem sido o para analisar marcadores para mapeamento e identificação de genes causadores de câncer. A compreensão dos genes chaves da via *Hedgehog* e outros envolvidos no BCC possibilitará o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes de terapias antitumorais, possibilitando uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

6. CONCLUSÃO

Os SNPs rs375350898 e rs75827493 nas regiões promotoras do SMO são potenciais marcadores moleculares para suscetibilidade ao carcinoma basocelular.

Os resultados sugerem que não houve associação entre os CpG-SNP rs538312246 com a susceptibilidade ao desenvolvimento de BCC.

Os resultados sugerem que o subtipo nodular está significativamente associado no CpG-SNP rs75827493.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B; JOHNSON, A; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. – 5ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396p.
- ALMEIDA, A.C.C; YAMASHITA, T; BRUNO CONTE, B; MATTOS, A.C; VERÍSSIMO, R. P; FERREIRA, M.C.F. Frequência do carcinoma basocelular na população menor de 50 anos: estudo do serviço e revisão da literatura. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, 84(6):692-4, Outubro 2009.
- AMAKYE, D.; JAGANI Z.; DORSCH M. Unraveling the therapeutic potential of the *Hedgehog* pathway in cancer. **Nat Med**,19(11):1410-22. 2013
- ASGARI, M.M, MOFFET, H.H, RAY, G.T, QUESENBERRY CP. Trends in Basal Cell Carcinoma Incidence and Identification of High-Risk Subgroups, 1998-2012. **JAMA Dermatol**;151(9):976-81. 2015
- ATWOOD, S. X., SARIN, K. Y., WHITSON, R. J., LI, J. R., KIM, G., REZAEI, M. et al. Smoothed Variants Explain the Majority of Drug Resistance in Basal Cell Carcinoma. **Cancer Cell**, 27(3), 342–353, 2015.
- BAYLIN S.B; HOPPENER J.W.; DE BUSTROS A; et al. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. **Cancer Res**, v.46, n.6, p.2917-22, 1986.
- BIJLSMA M. F, ROELINK H. Non-cell-autonomous signaling by Shh in tumors: challenges and opportunities for therapeutic targets. **Expert Opin Ther Targets**.14:693-702, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de informações sobre mortalidade**. Brasília, DF, 2017. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em: 02 abr. 2018.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene** 234, 177–186. 1999.
- CALIXTO, P.S., LOPES, O. S., MAIA, M. S., HERRERO, S. S. T., LONGUI, C. A., MELO, C. G. F., LIMA, E. M. et al. Single-Nucleotide Polymorphisms of the MSH2 and MLH1 Genes, Potential Molecular Markers for Susceptibility to the Development of Basal Cell Carcinoma in the Brazilian Population. **Pathology & Oncology Research**, 24(3), 489–496, 2017.
- CHEN, J; JIANG, Y; ZHOU, J; LIU, S; QIN, N; DU, J; et al. Evaluation of CpG-SNPs in miRNA promoters and risk of breast cancer. **Gene**, 651, 1–8, 2018.
- CHEN, M. R, TSAI P. J, WANG Y. F. Assessing inhalatory and dermal exposures and their resultant health-risks for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contained in oil mists in a fastener manufacturing industry. **Environ Int**.34(7):971–975. 2007
- CHEN X, CHEN X, XU Y, YANG W, WU N, YE H, YANG JY, HONG Q, XIN Y, YANG MQ, DENG Y, DUAN S. Association of six CpG-SNPs in the inflammation-related genes with coronary heart disease. **Hum Genomics** 10 Suppl 2:21, 2016.

CHEN, X; WANG, Z; YAN, Y. et al. XRCC3 C18067T Polymorphism contributes a decreased Risk to both Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma: evidence from a meta-analysis. **PLoS ONE**; Vol. 9, Issue 1, e84195, 2014

CHEN Z, ZHENG J, LIU W, YANG K, LI K, HUANG B, ZHU R, LU X, LI L. The SG13S114 polymorphism of the ALOX5AP gene is associated with ischemic stroke in Europeans: a meta-analysis of 8062 subjects. **Neurol Sci.** 38:579–587, 2017.

CHINEM, V. P.; MIOT, H. A. Epidemiologia do carcinoma basocelular. **Anais Brasileiro de Dermatologia**; 86(2):292-305, 2011.

DAYEH TA, Olsson AH, Volkov P, Almgren P, Rönn T, Ling C. Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets. **Diabetologia** 56(5):1036-46, 2013.

DENIS, H.; NDLOVU, M. N.; FUKS, F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. **EMBO Rep**, v. 12, n. 7, p. 647-56, 2011.

ERIN M. et al. Association of Vitamin D Receptor Polymorphisms With the Risk of Nonmelanoma Skin Cancer in Adults. **JAMA Dermatology**.

FENNELL, L.J ; JAMIESON, S; MCKEONE, D; CORISH, T; ROHDMANN, T; et al. MLH1–93 G/a polymorphism is associated with MLH1 promoter methylation and protein loss in dysplastic sessile serrated adenomas with BRAFV600E mutation. **BMC Cancer**, 18: 35, 2018.

GAILANI, M. R. et al. The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas. **Nat Genet**;14:78–81, 1996.

GARDINER -GARDEN, M., FROMMER, M. CpG Islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology**, 196(2), 261–282, 1987.

GIAMPAOLI, S; CHILLEMI, L; VALERIANI, F; LAZZARO, D; BORRO, H. et al. The SNPs in the human genetic blueprint era. **New Biotechnology**. 30 (5): 475-484, 2012.

GONNISSEN,A.; ISEBAERT S.; HAUSTERMANS K. Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. **Oncotarget**. 6:13899-13913. 2015.

HAHN, H.; WICKING, C.; ZAPHIROPOULOUS, P. G. et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Cell**. 85:841–51, 1996.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 144, 646–674, 2011.

HARLID, S., IVARSSON M. I, BUTT S, HUSSAIN S, GRZYBOWSKA E, EYFJÖRD J. E, et al. A candidate CpG SNP approach identifies a breast cancer associated ESR1-SNP. **Int J Cancer** 129(7):1689-98, 2011.

HEJMADI, M. **Introduction to Cancer Biology**. - 2ed - ISBN: 978-87-7681-478-6, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **INCA, 2018**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>. Acessado em: 03 de abril de 2018.

KAMINSKY, Z. A, TANG T, WANG SC, PTAK C, OH GH, WONG LA, HALFVARSON J, TYSK C. et al. DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. **Nat Genet.** 7(2):240–245, 2009

KARKI, R. et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal **genomics**. **BMC Medical Genomics**, 8:37, 2015.

KASAI, H., KAWAI, K. DNA Methylation at the C-5 Position of Cytosine by Methyl Radicals: A Possible Role for Epigenetic Change during Carcinogenesis by Environmental Agents. **Chemical Research in Toxicology**, 22(6), 984–989, 2009.

KOESTLER, D.C; CHALISE, P; CICEK, M.S; CUNNINGHAM, J.M; ARMASU S. et al. Integrative genomic analysis identifies epigenetic marks that mediate genetic risk for epithelial ovarian cancer. **BMC Med Genomics** 7:8, 2014.

KOSINIAK-KAMYSZ, A; POŚPIECH, E; WOJAS-PELC, A; MARCIŃSKA, M; BRANICKI, W. Potential association of single nucleotide polymorphisms in pigmentation genes with the development of basal cell carcinoma. **The Journal of Dermatology**, 39(8), 693–698, 2012.

KNUDSON A.G JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.68, n.4, p.820-3, 1971.

KULIS, M, ESTELLER M. DNA methylation and cancer. **Adv Genet.** 70: 27-56, 2010.

LIMA, E. M.; LOPES, O. S.; SOARES, L. F.; ARRUDA, T. D.; GIGEK, C. O.; MELO, C. G. F. et al. Dideoxy single allele-specific PCR - DSASP new method to discrimination allelic. **Braz. arch. biol. Technol.** 58(3):414-420, 2015.

LOVATT, T.J.; LEAR, J.T; BASTRILLES, J; WONG, C; GRIFFITHS, C.E; SAMARASINGHE, V. et al. Associations between ultraviolet radiation, basal cell carcinoma site and histology, host characteristics, and rate of development of further tumors. **J Am Acad Dermatol** 52:468–473, 2005.

MACHADO, M.V; DIEHL, A. M. Hedgehog signalling in liver pathophysiology. **Journal of Hepatology**, 68(3), 550–562, 2018.

MENDAÇOLLI, P. J. et al. Nuclear morphometry and chromatin textural characteristics of basal cell carcinoma. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 90, n. 6, p. 874-878, Dec. 2015.

NARALA, S; COHEN, P. R. Basal Cell Carcinoma of the Umbilicus: A Comprehensive Literature Review. **Cureus.** 8 (9): e770, 2016

NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; WIESCHAUS, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. **Nature**. v. 287, n. 5785, 795-801. 1980

OTSUKA, A; LEVESQUE, M. P; DUMMER, R; KABASHIMA, K. Hedgehog signaling in basal cell carcinoma. **Journal of Dermatological Science**, 78(2), 95–100, 2015.

PELLEGRINI, C; MATURO, M; DI NARDO, L; CICIARELLI, V; GUTIÉRREZ R.G. et al (2017). Understanding the Molecular Genetics of Basal Cell Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, 18(11), 2485, 2017

PESZ, K.A; BIENIEK, A; GIL, J; LACZMANSKA, I; KARPINSKI, P; MAKOWSKA I. et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and basal cell carcinoma of the skin. **International Journal of Dermatology**, 53, 1474–1477, 2014.

PORTELA, A; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**. 28:1057-1068, 2010.

PETROVA, R.; JOYNER, A. L. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. **Development**, 141(18), 3445–3457, 2014.

PONGER, L; DURET, L; MOUCHIROUD, D. Determinants of CpG Islands: Expression in Early Embryo and Isochore Structure. **Genome Research**, 11(11), 1854–1860, 2001

PUIG, S.; BERROCAL, A. Management of high-risk and advanced basal cell carcinoma. **Clinical and Translational Oncology**, v. 17, n. 7, p. 497-503, 2015.

SHANG-RONG S.; COTEL, R.J; WU, L.; LIU, C.; DATAR, R.; SHI, Y.; LIU, D.; LIM,H.; TAYLOR, C.R. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. **The Journal of Histochemistry e Cytochemistry**. Thousand Oaks, CA. 50(8): 1005-1011, 2002.

SHEN, L., KONDO, Y., GUO, Y., ZHANG, J., ZHANG, L., AHMED, S., et al. Genome-Wide Profiling of DNA Methylation Reveals a Class of Normally Methylated CpG Island Promoters. **PLoS Genetics**, 3(10), e181, 2007.

STECCA, B; RUIZ, I. A. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. **J Mol Cell Biol**. 2: 84-95, 2010.

STRACHAN, T; READ, A. **Genética molecular humana**. 4th ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.

SZKANDERA, J; KIESSLICH, T; HAYBAECK, J; GERGER, A; PICHLER, M. Hedgehog signaling pathway in ovarian cancer. **Int J Mol Sci**. 2013; 14: 1179-1196.

TAKAI, D; JONES, P. A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99(6), 3740–3745, 2002.

TAKAHASHI, S; CUI, Y; HAN, Y; FAGERNESS, J. A; GALLOWAY, B; SHEN, Y. et al. Association of SNPs and haplotypes in APOL1, 2 and 4 with schizophrenia. **Schizophrenia Research**, 104(1-3), 153–164. 2008.

TEGLUND S, TOFTGARD R. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. **Biochim Biophys Acta**. 1805: 181-208, 2010.

TOLLEFSBOL, T. O. Advances in Epigenetic Technology. **Methods Mol Biol**. 791: 1–10, 2011.

USHIJIMA, T.; ASADA, K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. **Cancer Sci**, v. 101, n. 2, p. 300-5, Feb 2010. ISSN 1349-7006.

VARJOSALO M, TAIPALE J. Hedgehog: functions and mechanisms. **Genes Dev** 2008;22:2454–72.

VERKOUTEREN, J.A.C; RAMDAS, K.H.R; WAKKEE, M; NIJSTEN, T. Epidemiology of basal cell carcinoma: scholarly review. **British Journal of Dermatology**, 177(2), 359–372, 2017.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The multistep nature of câncer. **Elsevier Science Publishers**, 0168-9525/93, vol.9, n.4, 1993.

WANG, Y; LEUNG, F.C.C. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. **Bioinformatics**, 20(7), 1170–1177, 2004.

WOLLINA, U;TCHERNEV, G. Advanced basal cell carcinoma. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, 163(15-16), 347–353, 2013.

WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. – Porto Alegre: Artmed, 2008. 864p.

YANG, L; XIE, G; FAN, Q; XIE, J. Activation of the Hedgehog signaling pathway in human cancer and the clinical implications. **Oncogene**. 29: 469-481, 2010.

YE, H., ZHOU, A., HONG, Q., CHEN, X., XIN, Y., TANG, L. et al. Association of seven thrombotic pathway gene CpG-SNPs with coronary heart disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 72, 98–102, 2015.

ANEXOS

Artigo submetido para Asian Pacific Journal of Cancer Prevention

Asian Pacific Journal of Cancer Prevention journal@waocp.org [por-iranjournals.ir](http://www.por-iranjournals.ir) 01:11 (Há 2 horas) ☆ ↶ ⋮
para eu ▾

Manuscript ID: APJCP-1811-3875

Manuscript Title: **Association between SNPs and loss of methylation site on the CpG island of the promoter region of the Smoothed gene, potential molecular markers for susceptibility to the development of basal cell carcinoma in the Brazilian population.**

Authors: Augusto Souza, Otávio Sérgio Lopes, Sylvia Satomi Herrero, Andressa Lima Lierato, Paulo Ribeiro Oliveira, Agnaldo Luiz Nascimento, Carlos Longui, Cynthia Germoglio, Ivan Rodrigues Carvalho Filho, Leonardo Ferreira Soares, Plínio Delatorre, Rommel Rodriguez Burbano, Eleonidas Moura Lima

Correspond Author Name: **Prof. Eleonidas Moura Lima**

Dear Dr. Augusto Monteiro Souza

You have been listed as co-author of the manuscript titled **Association between SNPs and loss of methylation site on the CpG island of the promoter region of the Smoothed gene, potential molecular markers for susceptibility to the development of basal cell carcinoma in the Brazilian population..** Our editorial decision will be emailed to corresponding author (**Prof. Eleonidas Moura Lima**) once the manuscript has been reviewed.

Title:

Association between SNPs and loss of methylation site on the CpG island of the promoter region of the Smoothed gene, potential molecular markers for susceptibility to the development of basal cell carcinoma in the Brazilian population.

Authors:

Augusto Monteiro de Souza^{2 5}, Otávio Sérgio Lopes^{3 4}, Sylvia Satomi Takeno Herrero^{1 2} Andressa Lima Lierato^{2 5}, Paulo Ribeiro Oliveira^{2 5}, Agnaldo Luiz Nascimento^{2 5}, Carlos Alberto Longui⁴, Plínio Delatorre^{1 2 5}, Eleonidas Moura Lima ^{1 2 5}.

Affiliations:

- 1) Departamento de Biologia Molecular; Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa - PB – Brasil;
- 2) Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética - LBMEO; Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa - PB – Brasil;
- 3) Departamento de Dermatologia; Clínica Dermatológica Santa Catarina; João Pessoa - PB – Brasil;
- 4) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; São Paulo – SP – Brasil;
- 5) Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa - PB – Brasil;

Corresponding Author:

Eleonidas Moura Lima

Address: Departamento de Biologia Molecular; Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa - PB – Brasil

Email: eleonidas@pq.cnpq.br

Abstract

Objective: Perform genotyping of SNPs in the promoter region of the SMO gene in BCC samples, and to determine if there is an association of these SNPs of the gene in question with the susceptibility to the development of the BCC.

Methods: 100 samples of paraffined tissue from patients with histopathological diagnosis of BCC and 100 control samples were analyzed for each polymorphism by a newly developed genotyping method, the Dideoxy Single Allele Specific – PCR. The software Bioestat - version 5.3 and Haploview 4.2 were used for the statistical analysis. For all tests a P-value <0.05 was considered significant.

Result: The SNP rs538312246 is the Hardy-Weinberg equilibrium, therefore, it did not present significant association with the BCC ($X^2 = 2.343$ and $P < 0.158$). However, the CpG-SNPs rs375350898 and rs75827493 were significantly associated to the BCC in the analyzed samples ($X^2 = 27,740/21,500$ and $P < 0.0001$), the SNP rs75827493 showed a significant association with the BCC of the nodular subtype ($P < 0.0069$). Therefore, our results suggest that SNPs rs375350898 and rs75827493 are potential molecular markers for susceptibility to BCC.

Conclusion: The ability to detect SNP in a population, especially in promoter regions, has profoundly changed human genetic studies. This study allowed the understanding of the relationship between the presence of SNPs in CpG islands of the promoter region of the SMO gene can modify the methylation pattern and provide susceptibility to BCC in the population.

Keywords: Basal Cell Carcinoma, CpG-SNPs, via Hedgehog, molecular markers e DSAPS

Introduction

Basal cell carcinoma (BCC) is a cutaneous neoplasm that originates from immature pluripotent epithelial basal cells that have lost their capacity for differentiation, normal keratinization and cutaneous appendages development (Narala and Cohen, 2016). BCC is one of the most frequent types of malignant skin tumors, with slow growing prominent lesions and invasive potential, but metastasis are rare (Kosiniak-kamysz et al., 2012).

Studies have shown that the incidence of skin cancer varies greatly between different countries and different ethnicities, suggesting that genetic factors play important roles in their development (Chen et al., 2014). The BCC is a complex disease with influence from the interaction between constitutional predisposition (genotypic, phenotypic and environmental characteristics) and subsequent exposure to environmental risk factors for its development (Verkouteren et al 2017).

The Hedgehog pathway is an evolutionarily conserved signaling mechanism that allows gradual responses of cells and tissues to control fundamental biological processes, such as target cell specification, tissue standardization, proliferation regulation, and maintenance of tissue homeostasis. The activation of the pathway is also essential for the proper development of the skin and its appendages, but increased activation can lead to hyperproliferation of the epidermis, defects in differentiation and cancer (Atwood et al., 2015).

BCCs are characterized by aberrant upregulation of the Hedgehog pathway, typically through loss of the Patched 1 receptor or activation of the Smoothened G protein coupled receptor (SMO) (Amakye et al., 2013), resulting in the deregulation of GLI transcription factors, processes involved in cell growth and proliferation. Recently, mutations in the Hedgehog pathway have been identified in genome-wide sequencing studies across a wide range of cancers. Interestingly, mutations in the gene were detected in other types of cancer (Otsuka et al 2015). In recent years, the Hedgehog signaling pathway has been shown to be an essential element in tumor initiation or in more advanced tumor evolution. Studies show that this pathway is deregulated in more than 30% of human cancers, including basal cell carcinoma (BCC), medulloblastoma (MB), melanoma, breast, prostate, lung, pancreas, cervical and cervical cancer (Szkandera et al 1999).

Single nucleotide polymorphisms (SNP) are variations on a single nucleotide generating altered sequences (alleles), where the less frequent allele has an abundance of about 1% or more (Brookes, 1999). They are the most common types of human genetic variation. Several studies have been developed with the aim of identifying sets of SNPs that serve as markers for predisposition to multifactorial diseases or for mapping of linkage disequilibrium in all genomes (Takahashi et al., 2008). Pesz et al (2014) reports that several case studies have investigated the influence of various SNPs on the development of BCC.

Several studies have associated a number of SNPs in promoters with the occurrence of methylation-induced silencing in large series of cancers (Fennell et al., 2018). Genetic changes such as SNPs in genes involved in the Hedgehog pathway, may result in individuals susceptible to the development of BCC.

From this perspective, we aimed to study polymorphisms in CpG islands (in the promoter region of the SMO genes) of the BCC, to determine if there is an association of these SNPs with the susceptibility to the development of the BCC.

Materials and methods

Samples

This is a retrospective study which included up to five-year-old samples from a database supplied by Laboratório UNILAB / João Pessoa - sample bank PB - and LABMEO / UFPB. A hundred samples of tissue embedded in paraffin from patients with histopathological diagnosis of BCC were analyzed, totaling 200 alleles for each studied SNP. Additional 100 control samples with normal tissue from cancer free patients were evaluated, obtained from the Laboratory of Molecular Structural and Oncogenetic Biology - Sample bank of LABMEO / UFPB. The present study is part of the thematic project approved by the Ethics Committee of the University Hospital Lauro Wanderley - UFPB under the code CAAE: 36.522.614.2.3001.5883.

DNA extraction

The samples were submitted to DNA extraction in the Laboratory of Structural Molecular Biology and Oncogenetic - LBMEIO/ UFPB. The DNA sample was extracted according to the method described by Shang Rong-Shi et al. (2002), with modifications. The isolated genomic DNA was quantified with the Spectrophotometer NanoDrop™ 2000c from Thermo Fisher Scientific and stored at -20°C.

Dideoxy single allele-specific PCR Method

The Dideoxy single allele-specific PCR (DSASP) method is based on chain-terminating inhibitors, dideoxynucleotide, established by the method of Sanger et.al. DSASP was previously validated by the Allele Specific PCR-ASP method as described by Lima et al. (2015). It is a method of genotyping and comprises four stages: I - selection of target SNPs, oligonucleotides (primer and complementary sequence) design and determination of the dideoxynucleotide to be incorporated; II - asymmetric PCR of target dideoxynucleotide; III - hybridization reaction between the complementary sequence and the symmetric PCR product; IV - analysis by melting curve by qPCR, validated and developed by Lima et al. (2015).

To genotype the SNPs rs75827493, rs375350898 and rs538312246 from the SMO gene through the DSASP method, asymmetric PCR was performed for each target SNP, with complementary sequencing and dideoxynucleotide incorporation. The oligonucleotides were obtained by in silico validation (GeneRunner Software).

Validation *in silico*

The primers used for DSASP of the *rs75827493*, *rs375350898* and *rs538312246* were designed based on the Ensembl Genome Browser database, using the Gene Runner program (Table 1) to evaluate the annealing temperature, the formation of secondary structure and size of the amplified fragments.

Asymmetric PCR conditions

Asymmetric PCR was performed in a final volume of 25 μ L containing 200 μ M dNTP (dATP, dCTP, dTTP and ddGTP), 2.0 mM $MgCl_2$, 20 ng/ μ L DNA, 200 pM primer and 1 U AmpliTaq Gold (Life Technologies - Carlsbad, CA). PCR conditions for amplification of single stranded DNA were as follows: a pre-denaturation for 3 min at 94°C, 80 cycles of 94°C denaturation for 20sec, annealing 60°C for 45sec and extension 72°C for 30sec with a final extension of 5 min at 72°C.

Hybridization conditions

The product of the PCR amplification of each sample went through the hybridization step under the following conditions: 200 pM of the complementary sequence at 4°C for 10 min.

Melting Curve Analysis

The melting curves were analysed to determine the T_m , performed by the Real Time PCR equipment 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies - Carlsbad, CA) following these conditions: preheating (starting at 25°C to 95°C) for 1 min, folding up to 60°C for 5 min and gradual heating (1°C/min) until a temperature of 95°C for 5 min. For melting curve analysis, SYBR® Green Mix (Life Technologies - Carlsbad, CA) was used.

Statistical Analysis

Allele frequencies and genotypes were calculated by allele counting and the Hardy-Weinberg Equilibrium (EHW) was tested using the X^2 test. To analyze the linkage disequilibrium between the polymorphisms, the D' parameter was calculated using the Haploview 4.2 Software. Polymorphisms were considered in linkage disequilibrium when the D' values were ≥ 0.75 . To verify the distribution of genotypes of polymorphisms in the studied population and the distribution of age, sex, tumor location and histological type in the patient population, the Chi-Square test and the Fisher's exact test were used through the Bioestat Software - version 5.3. For all tests a P-value <0.05 was considered significant.

Results

Of the three CpG-SNPs studied, rs75827493 and rs375350898 were associated with the development of BCC in the analyzed samples, whereas the polymorphism rs538312246 of the SMO gene was in the Hardy-Weinberg equilibrium (Table 2).

The genotype frequencies of the SMO gene rs75827493 polymorphism were as follows: 31% (n = 31) G / G, 69% (n = 69) T / G and 0% (n = 0) T / T. The frequency of the polymorphic allele (T) corresponds to 34.5% within the studied samples; the observed / expected genotypic frequency ratio indicates that it is in Hardy-Weinberg imbalance with $X^2 = 27,740$ and P-value <0.0001 . The Melting temperature (T_m) observed for the T allele varied between 79°C and 81° C, while the G allele had a T_m between 86°C and 88°C (Figure 01). For the TT allele this temperature represents the smallest double-stranded DNA fragment obtained by the DSASP technique. The larger fragment of the amplified DNA represents the GG genotype.

The genotype frequencies of the polymorphism rs375350898 of the SMO gene were as follows: 11% (n = 11) T / T, 73% (n = 73) T / G and 16% (n = 16) G / G. The frequency of the polymorphic allele corresponds to 47.5% in the samples studied; the observed / expected genotypic frequency ratio indicates that the SNP is in Hardy-Weinberg imbalance. $X^2 = 21,500$ and P-value <0.0001 . The T_m observed for the T allele ranged from 79° C to 82° C, while the G allele showed a T_m between 89° C to 92° C (Figure 2).

The genotype frequencies of the SMO polymorphism rs538312246 were as follows: 04% (n = 04) A / A, 21% (n = 21) A / G and 25% (n = 25) G / G. The frequency of the polymorphic allele corresponds to 14.5% in the studied samples; the observed / expected genotypic frequency ratio indicates that the SNP is in Hardy-Weinberg equilibrium. $X^2 = 2.333$ and P-value <0.1258 . The T_m observed for allele A ranged from 79° C to 82° C, while the G allele showed a T_m between 89° C and 92° C (Figure 03).

The allelic segregation of the studied polymorphisms was also evaluated in order to verify if they were in linkage disequilibrium (DL). The analysis was performed using the Haploview software. The study showed significant linkage disequilibrium between the polymorphisms rs375350898 and rs75827493, with $D' = 0.909$, $r^2 = 0.571$. The distance between them is approximately 0.1kb. The two SNPs were grouped into one block, as shown in Figure 04. Groups of less than 1% are not shown in the analysis. The frequencies found were: GGG 44.9%, TTG 29.6%, TGG 9.5%, TTA 6.5%, GGA 6.2%, GTG 1.4% and TGA 1.3%. The red color indicates strong linkage disequilibrium ($D' = 100$, non-random segregation of alleles), while white demonstrates those with weak ($D' < 100$) or absent ($D' = 0$, independent segregation of alleles) imbalance.

Analysis of the association of the genotypes found for CpG-SNP rs75827493 (T> G) of the SMO gene with the variables of: gender, age, anatomical localization of the neoplasia and histopathological types. Our results suggest that there was statistical significance among genotypes of the histopathological types ($p=0.0069$) only in CpG-SNP rs75827493, but for the other variables studied, there was no statistical significance.

Discussion

DNA sequence variation analysis provides a powerful tool for understanding susceptibility to disease. The SNPs may alter the biological properties of the encoded protein and affect the levels of gene expression in an allele specific manner. Uncontrolled activation of the Hedgehog pathway leads to tumor progression in various types of cancer, including basal cell, medulloblastoma, pancreatic, colon, lung, breast, prostate and blood cancer (Amakye et al. 2013).

SNPs in coding regions are proposed as being associated with multiple diseases. However, the study of SNPs in intron regions and promoter regions are important for understanding the mechanism of genetic regulation of carcinogenesis. Calixto et al. (2017) suggest that the substitution of the base in a DNA sequence in an intronic region may alter gene regulation at the post-transcriptional level, resulting in new processing sites, altering Splicing regulatory elements and causing cancer formation.

This is the first study to report the association between polymorphisms in CpG islands in the promoter region of the SMO gene with the risk of basal cell carcinoma, it was studied that SNPs-CpG could influence DNA methylation levels provided function gain mutations in the SMO and that the protein associated with the Hedgehog pathway may allow the susceptibility to the development of BCC.

We performed the study of three SNPs in the CpG islands in the SMO gene promoter region. CpG-SNP rs75827493 and rs375350898 had polymorphic allele frequencies of 34.5% and 47.5% (respectively) and, by presenting Hardy-Weinberg disequilibrium and $p < 0.0001$, were probably associated with the development of BCC. Haplotype analysis represent a powerful approach in the search for disease-causing alleles. In the location of the underlying mutations, we observed that there was a linkage disequilibrium between these two significantly associated polymorphisms.

Our studies corroborate the work of Kaminsky et al. (2009), which demonstrates that DNA methylation levels in specific locus are under genetic control. This has gained strength in recent years, reinforced by the results obtained in the comparison of DNA methylation patterns between monozygotic and dizygotic twins.

Our results suggest that due to the mutability of CpG-SNPs are an important class of regulatory polymorphisms and link genetic variation to individual epigenome variability.

Recently, several studies have suggested that variations in the genetic code are associated with DNA methylation levels at CpG island sites near the promoter regions. Dayeh et al. (2013) observed that 19 of the 40 (48%) SNPs studied were associated with type 2 diabetes, and these SNPs could introduce or remove a CpG site, they generated successful DNA methylation data for 16 of these 19 CpG-SNPs. They studied several candidate genes for type 2 diabetes and all analyzed CpG-SNPs were associated with differential DNA methylation of the CpG-SNP site in the promoter region.

The presence of some SNPs located in CpG dinucleotides can generate or eliminate a CpG island site, called CpG-SNPs. CpG-SNPs are considered to adjust the interaction of genetic (SNP) and epigenetic (DNA methylation), which affect the mechanisms of gene expression enabling the activation or inactivation of the gene (Chen et al., 2018).

It is believed that these CpG SNPs in gene promoter regions are associated with multiple diseases, including type 2 diabetes (Dayeh et al., 2013), coronary disease (Xu et al., 2015; Chen et al., 2016), breast cancer (Harlid et al., 2011; Chen et al., 2018) and epithelial ovarian cancer (Koestler et al., 2014). Our results will allow us to put together a new line of research within the BCC study.

In general, Koestler et al. (2014) have contributed to the growing collection of integrative genomics studies, exploring the relationship between genetics and epigenetics and the risk of epithelial ovarian cancer. The authors identified 17 CpG-SNPs that represent potentials mediated by methylation between the genotype and the risk of epithelial ovarian cancer. These findings provide additional information about the etiology of the disease and may serve as new biomarkers for cancer susceptibility.

The SNP rs538312246 showed a frequency of the polymorphic allele corresponding to 14.5% and the observed / expected genotypic frequency ratio indicates that the SNP is in Hardy-Weinberg equilibrium with P-value <0.1258.

Our results also found significant association of SNP rs75827493 among histopathological genotypes ($p = 0.0069$). For 21. Chen et al. (2014) the development of carcinogenesis of BCC presents a higher incidence of nodular pattern in the population.

The ability to detect SNP in a population, especially in promoter regions, has profoundly changed human genetic studies. One of the major concerns of polymorphism studies has been to analyze markers for mapping and identifying genes that cause cancer. This study allowed the understanding of the relationship between the presence of SNPs in CpG islands of the promoter region of the SMO gene can modify the methylation pattern and provide susceptibility to BCC in the population.

References

1. Amakye D, Jagani Z, Dorsch M, (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Med*,19(11):1410-22.
2. Atwood S X, Sarin K Y, Whitson R J, et al (2015). Smoothened Variants Explain the Majority of Drug Resistance in Basal Cell Carcinoma. *Cancer Cell*, 27(3), 342–353.
3. Brookes A J. (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234, 177–186.
4. Calixto P S, Lopes O S, Maia M S, et al (2017). Single-Nucleotide Polymorphisms of the MSH2 and MLH1 Genes, Potential Molecular Markers for Susceptibility to the Development of Basal Cell Carcinoma in the Brazilian Population. *Pathology & Oncology Research*, 24(3), 489–496.
5. Chen X, Chen X, Xu Y, et al (2016). Association of six CpG-SNPs in the inflammation-related genes with coronary heart disease. *Hum Genomics* 10 Suppl 2:21.
6. Chen J, Jiang Y, Zhou J, et al (2018). Evaluation of CpG-SNPs in miRNA promoters and risk of breast cancer. *Gene*, 651, 1–8.
7. Dayeh T A, Olsson A H, Volkov P, et al (2013) Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets. *Diabetologia* 56(5):1036-46.
8. Fennell L J, Jamieson S, McKeone D, et al (2018) MLH1–93 G/A polymorphism is associated with MLH1 promoter methylation and protein loss in dysplastic sessile serrated adenomas with BRAFV600E mutation. *BMC Cancer*, 18:35
9. Harlid S, Ivarsson M I, Butt S, et al (2011). A candidate CpG SNP approach identifies a breast cancer associated ESR1-SNP. *Int J Cancer* 129(7):1689-98.
10. Kaminsky Z A, Tang T, Wang S C, et al (2009) DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet.* 7(2):240–245.
11. Koestler D C, Chalise P, Cicek M S, et al (2014). Integrative genomic analysis identifies epigenetic marks that mediate genetic risk for epithelial ovarian cancer. *BMC Med Genomics* 7:8, 2014.
12. Kosiniak-Kamysz A, Pośpiech E, Wojas-Pelc A, Marcińska M, and Branicki W (2012). Potential association of single nucleotide polymorphisms in pigmentation genes with the development of basal cell carcinoma. *The Journal of Dermatology*, 39(8), 693–698.
13. Lima E M, Lopes O S, Soares L F, et al (2015). Dideoxy single allele-specific PCR - DSASP new method to discrimination allelic. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 58(3):414.
14. NARALA S and COHEN P R (2016). Basal Cell Carcinoma of the Umbilicus: A Comprehensive Literature Review. *Cureus*. 8 (9): e770.
15. Otsuka A, Levesque M P, Dummer R, and Kabashima K (2015). Hedgehog signaling in basal cell carcinoma. *Journal of Dermatological Science*, 78(2), 95–100.
16. Pesz K A, Bieniek A, Gil J, et al (2014). Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and basal cell carcinoma of the skin. *International Journal of Dermatology*, 53, 1474–1477.

17. Shang-Rong S, Cotel R J, Wu L, et al (2002). DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *The Journal of Histochemistry e Cytochemistry*. Thousand Oaks, CA. 50(8): 1005-1011.
18. Szkandera J, Kiesslich T, Haybaeck J, Gerger A, Pichler M (2013). Hedgehog signaling pathway in ovarian cancer. *Int J Mol Sci*. 14: 1179-1196.
19. Takahashi S, Cui Y, Han Y, et al (2008). Association of SNPs and haplotypes in APOL1, 2 and 4 with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 104(1-3), 153–164.
20. Verkouteren J A C, Ramdas K H R, Wakkee M, and Nijsten T (2017). Epidemiology of basal cell carcinoma: scholarly review. *British Journal of Dermatology*, 177(2), 359–372.
21. Chen X, Wang Z, Yan Y, et al (2014). XRCC3 C18067T Polymorphism contributes a decreased Risk to both Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma: evidence from a meta-analysis. *PLoS ONE*; Vol. 9, Issue 1, e84195.
22. Xu L, Chen X, Ye H, et al (2015). Association of four CpG-SNPs in the vascular-related genes with coronary heart disease. *Biomed Pharmacother*. 2015;70:80–3.

Acknowledgements**Funding Statement:**

This work was supported by grants of CAPES, CNPq and Clinica Dermatológica Santa Catarina; João Pessoa - PB – Brazil.

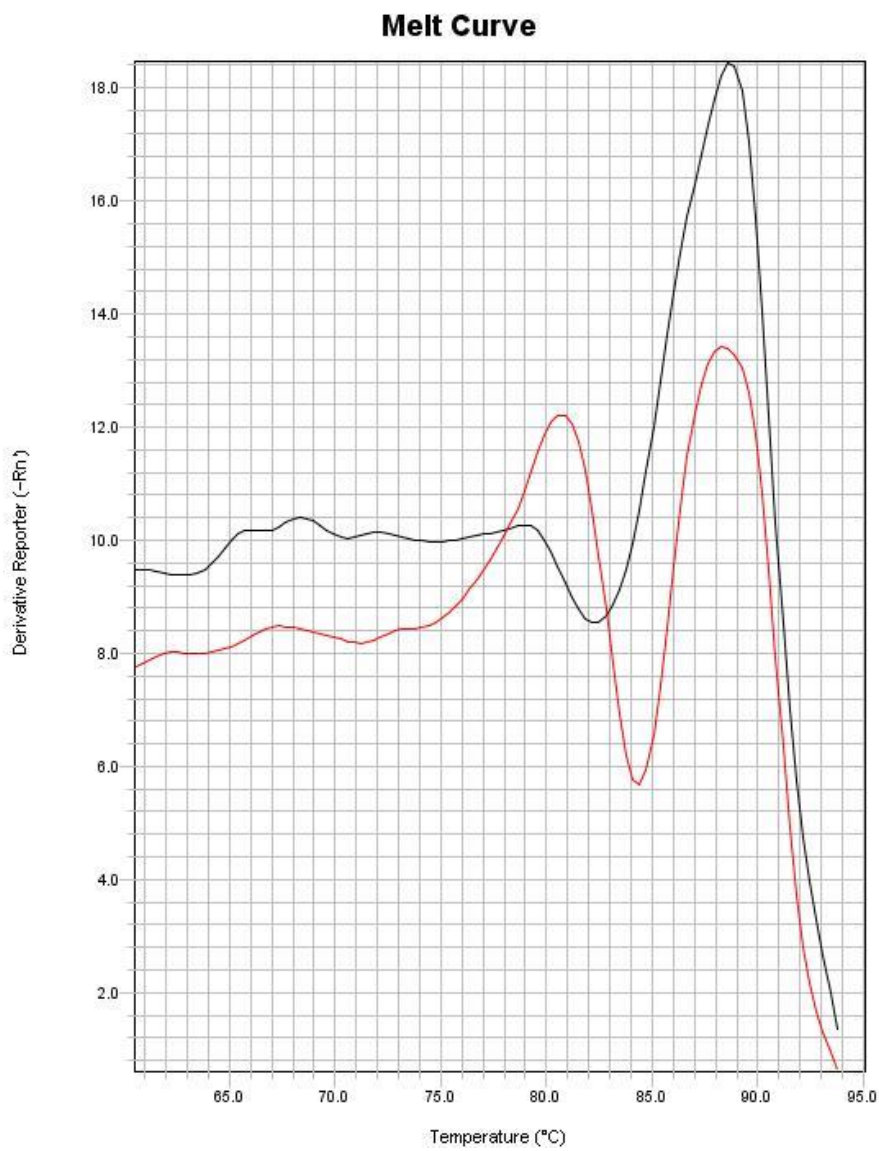


Figure 01: SNP genotyping rs75827493 by DSASP technique: TG genotype red melting curve and Genotype GG curve of black melting.

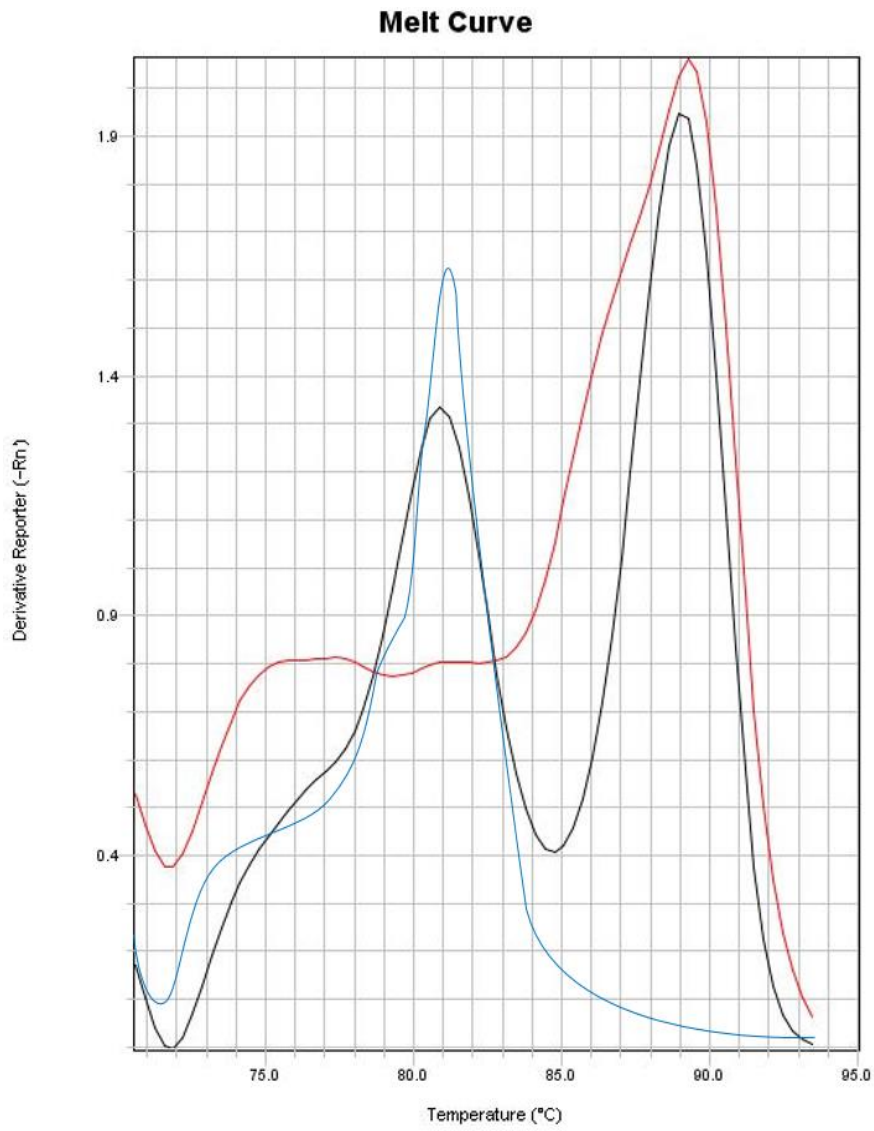


Figure 02: SNP genotyping rs375350898 by DSASP technique: GG genotype red melting curve; Genotype TG curve of black melting and Genotype TT curve of blue melting.

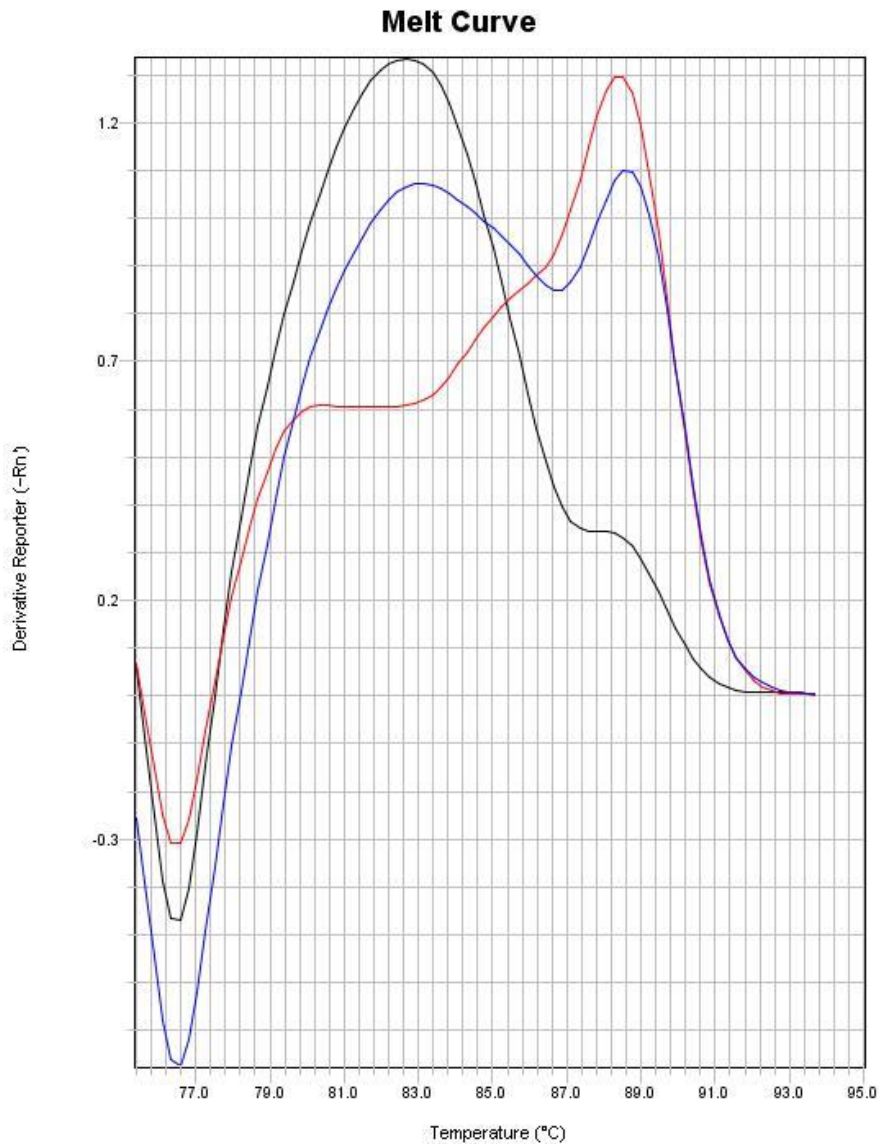


Figure 03: SNP genotyping rs538312246 by the DSASP technique: GG genotype red melting curve; Genotype AA curve of black melting and AG genotype curve of blue melting.

Figure 4: Representation of the linkage disequilibrium (DL) structure between the studied CpG-SNPs.

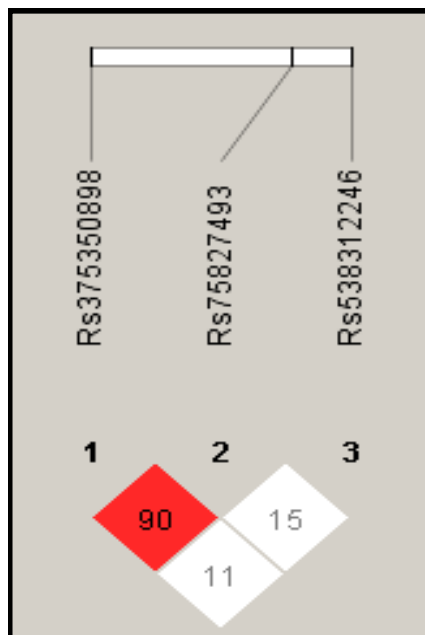


Table 1: SMO gene promoting region polymorphism list, with corresponding alleles and complementary sequences to be amplified by the DSASP method

SNP'S	ALLELE	PRIMER / COMPLEMENTARY SEQUENCE
rs75827493	G/T	5'GCGCTGGGGCGAAGGTGGCTGCT3' 5'AGCC M GCGGCCCAGCAGCCACCTTCGCCCCAGCGC3'
rs375350898	G/T	5'TGCGCCGAGGCTKGGGGAGGGACT3' 5'GCTCCTT C KTCCAGTCCCTCCCCMAGCCTCGGCGCA3'
rs538312246	G/A	5'AGCCGGAGCTGCACTCGCACCC-3' 5'GSCAGACG Y GGGCCGGGGGTGCGAGTGCAGCTCCGGCT3'

Table 2: Genotypic distribution and allelic frequency of SNPs in the analyzed gene.

<i>Samples</i>	<i>Gene/SNP</i>	<i>Genotypic distributions</i>			X^2	<i>P-value</i>
	SMO/rs75827493	TT	TG	GG		
<i>BCC</i>		0	69	31	27,740	0,0001
<i>Controle</i>		12	45	43		
	SMO/rs375350898	TT	TG	GG		
<i>BCC</i>		11	73	16	21,500	0,0001
<i>Controle</i>		22	50	28		
	SMO/rs538312246	AA	AG	GG		
<i>BCC</i>		04	21	75	2,343	0,1258
<i>Controle</i>		02	25	73		