

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

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE SNPs NOS GENES MSH2 E MSH6 À  
SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA  
BASOCELULAR NO ESTADO DA PARAÍBA**

**ANDRESSA DE LIMA LIBERATO**

João Pessoa – PB

2018

**ANDRESSA DE LIMA LIBERATO**

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DE SNPs NOS GENES MSH2 E MSH6 À  
SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA  
BASOCELULAR NO ESTADO DA PARAÍBA**

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

**Orientador: Prof. Dr Plínio Delatorre.  
Coorientador: Prof. Dr. Eleonidas Moura  
Lima.**

João Pessoa – PB

2018

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

L695a Liberato, Andressa de Lima.

Análise da associação de SNP's nos genes MSH2 e MSH6 à susceptibilidade ao desenvolvimento do carcinoma basocelular no estado da Paraíba / Andressa de Lima Liberato. - João Pessoa, 2018.

66f. : il.

Orientação: Plínio Delatorre.

Coorientação: Eleonidas Moura Lima.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Carcinoma basocelular. 2. MSH2. 3. MSH6. 4. SNP's.  
5. DSASP. I. Delatorre, Plínio. II. Lima, Eleonidas Moura. III. Título.

UFPB/BC

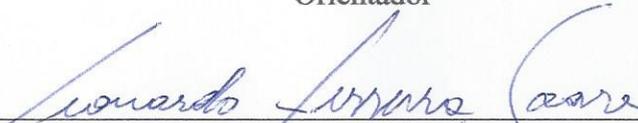
ANDRESSA DE LIMA LIBERATO

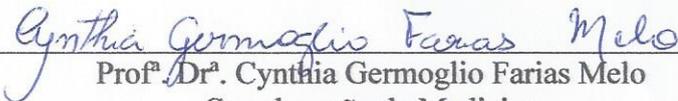
Dissertação de Mestrado avaliada em 13/12/2018

BANCA EXAMINADORA

---

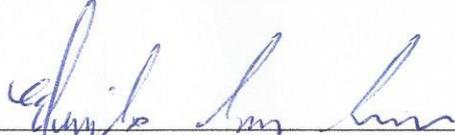
Prof. Dr. Plínio Delatorre  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Orientador

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

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cynthia Germoglio Farias Melo  
Coordenação de Medicina  
Faculdade de Ciências Médicas  
Examinador Externo/ Titular

---

Dr.<sup>a</sup> Sylvia Satomi Takeno Herrero  
Departamento de Biologia Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador Externo/ Suplente

  
Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador Interno/ Suplente  
Coorientador

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus, por todo auxílio e refúgio. A minha família em especial ao meu pai Liberato, minha mãe Sônia e meu irmão Anderson, pelo apoio e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre me proporcionar uma vida de agradecimentos. Obrigada por guiar meus passos, por ter conseguido enfrentar todas as dificuldades na minha vida acadêmica e pessoal e ter-me ajudado a compreender as grandes lições de vida.

Agradeço grandiosamente ao professor Dr. Eleonidas Moura Lima, pela orientação e atenção cedida ao longo da minha passagem no mestrado. Por todos os conselhos, sugestões fornecidas para meu desempenho acadêmico e pessoal, nesta etapa tão importante da minha vida.

Ao prof. Dr. Plínio Delatorre, por todo apoio e acolhimento no mestrado, por acreditar e ajudar na minha progressão acadêmica.

A Dra. Sylvia Satomi Takeno, por toda ajuda e conselhos. Por ter me aguentado com todas minhas preocupações, por fazer parte dessa fase da minha vida. Uma grande profissional e amiga que tive o prazer de conhecer. Obrigada por todo suporte.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural Oncogenética (LBMEO) pelos ensinamentos. Dr. João Gonçalves de Oliveira por sua assistência para realização dos experimentos.

Ao meu amigo de turma e laboratório Augusto Monteiro, por todo suporte oferecido, por todos conselhos que me ajudaram nessa fase acadêmica.

A minha querida amiga Gisleyde Bastos, por estar ao meu lado desde o primeiro dia de aula, obrigada por todos os incentivos, conselhos, dicas e companheirismo. Uma grande amiga que tive o prazer de ter na minha jornada do mestrado e agora para a vida. Exemplo de pessoa e profissional.

Aos meus companheiros de turma e Laboratório, Paulo e Agnaldo.

Agradeço, também, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo 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.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e a Universidade Federal da Paraíba por ter colaborado com minha formação.

A minha família, por sempre me apoiar nas minhas escolhas e ajudar na minha caminhada. Ao meu pai Liberato, minha mãe Sônia, meu irmão Anderson e minha sobrinha Anne Gabriela por me incentivar e acreditar. Por me ajudar em todos os momentos da minha vida.

As minhas amigas Elaine Marques, Zhilbelly Mota, Aline Viegas, Fabrina Viegas, Gabriela Martins, Vivianne Dias e Erika Britto, por me escutarem tanto nesse período e por todos conselhos e ajuda fornecida.

## RESUMO

O Carcinoma Basocelular (CBC) é uma neoplasia cutânea caracterizada pela presença de células cancerosas, que se originam das células basais da epiderme, impedindo a diferenciação celular e acometendo os anexos cutâneos. Seu principal fator de desenvolvimento é a exposição à radiação solar, causando danos direto ao DNA. Em resposta aos danos, mecanismos de reparos como o Mecanismo de Reparo de Mal Pareamento (MMR) são utilizados para manter a integridade genômica. A presença de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) em genes do MMR podem promover alterações na atividade de seu produto gênico, levando a progressão tumoral e surgimento do câncer. O presente trabalho analisou os SNPs rs63751445 (A>G) e rs63751089 (T>C) no gene MSH2 e rs863224614 (T>G) no gene MSH6, em 100 amostras de tecido parafinado de pacientes diagnosticados com CBC no estado da Paraíba. Os resultados das análises foram obtidos pelo método de genotipagem Didesoxi Único Alelo Específico PCR – DSASP. O *software Bioestat* foi utilizado para as análises estatísticas, que consistiram nos testes *Qui-quadrado* e *Exato de Fisher*, com nível de significância de 5%. Os testes de ancoragem molecular (*Docking*) foram realizados no *software Hex 8.0.0*, para análises dos complexos utilizou-se o *Pymol* e o *software WinCoot 0.8.4*. A relação da frequência genotípica observada e esperada nos SNPs rs63751445, rs63751089 no gene MSH2 e o SNP rs863224614 no gene MSH6 indicam desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* com o  $X^2 = 100$  e p-valor  $< 0,0001$  associados a susceptibilidade ao Carcinoma Basocelular. A ancoragem permitiu identificar interações importantes, onde na substituição da Fenilalanina por Leucina a interação com DG24 é perdida, sugerindo o comprometimento da função proteica. Apresentando associação estatisticamente significativa à susceptibilidade ao risco de desenvolver CBC, os resultados obtidos poderão ser utilizados como potenciais marcadores moleculares.

**Palavras-chave:** Carcinoma Basocelular. MSH2. MSH6. SNPs. DSASP.

## ABSTRACT

Basal Cell Carcinoma (BCC) is a cutaneous neoplasm characterized by the presence of cancer cells, which originate from the cells of the epidermis, preventing cell differentiation and affecting the cutaneous attachments. Its main development factor is exposure to solar radiation, causing DNA damage. In response to the damage, repair mechanisms such as the mismatch repair mechanism (MMR) are used to maintain genomic integrity. The presence of single nucleotide polymorphism (SNP) in MMR genes can promote changes in the activity of its gene product, leading to tumor progression and cancer. The present study analyzed the SNPs rs63751445 (A> G) and rs63751089 (T> C) in the MSH2 gene and rs863224614 (T> G) in the MSH6 gene, in 100 paraffin tissue samples from patients diagnosed with CBC in Paraíba. The results of the analyzes were obtained by the genotyping method Didesoxi Single Allele Specific PCR - DSASP. Bioestat software was used for the statistical analyzes, which consisted of Chi-square and Fisher Exact tests, with a significance level of 5%. Molecular anchoring tests (Docking) were performed in the Hex 8.0.0 software, for analyzes of the complexes, with the Pymol and the software WinCoot 0.8.4 was used. The observed and expected genotype frequency relation in the SNPs rs63751445, rs63751089 in the MSH2 gene and the rs863224614 SNP in the MSH6 gene indicate Hardy-Weinberg imbalance with  $X^2 = 100$  and p-value  $<0.0001$  associated with susceptibility to Basal Cell Carcinoma. The anchoring allowed to identify important interactions, wherein the substitution of Phenylalanine for Leucine the interaction with DG24 is lost, suggesting the compromise of the protein function. With a statistically significant association with susceptibility to the risk of developing BCC, the results obtained may be used as molecular marker potentials.

**Key words:** Basal Cell Carcinoma. MSH2. MSH6. SNPs. DSASP.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
Arg	Argenina
ATP	Adenosina trifosfato
BER	Reparo de excisão de base
BCNS	Síndrome do nevo basocelular
CBC	Carcinoma basocelular
CSC	Carcinoma de células escamosas
CPDs	Dímeros de pirimidina ciclobutanos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSASP	Didesoxi Único Alelo Específico
DdNTP	Didesoxinucleotídeo
DNTP	Desoxirribonucleotídeos
EXO1	Exonuclease 1 humana
HR	Recombinação homóloga
HNPPC	Câncer colorretal hereditário sem polipose
HPV	Papiloma vírus humano
HWE	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
IDLs	alças de deleção e inserção curtas
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KDa	<i>Kilodalton</i>
Kb	Quilobases
LBMEO	Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética
Leu	Leucina

Lys	Lisina
MMR	Reparo por mal pareamento
Mm	Milímetro
Nm	Nanômetro
NHEJ	Junção não homóloga
NER	Reparo de excisão de nucleotídeos
NMSC	Câncer de pele não melanoma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
RUV	Radiação ultravioleta
RPA	Proteína de replicação A
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Ser	Serina
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
X <sup>2</sup> -	<i>Qui</i> -quadrado
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C
6-4PP	6-4 fotoprodutos pirimidina pirimidona
µm	Micrómetro

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Características adquiridas pelas células tumorais no processo de carcinogênese....	17
<b>Figura 2-</b> Tipos de câncer de pele.....	19
<b>Figura 3-</b> Etapa inicial do MMR em <i>E. coli</i> e humanos.....	23
<b>Figura 4-</b> Ilustração esquemática do sistema de reparo MMR.....	25
<b>Figura 5-</b> Organização genômica do gene MSH2.....	26
<b>Figura 6-</b> Organização genômica do gene MSH6.....	26
<b>Figura 7.</b> Estrutura MutS $\alpha$ . Representação estrutural do complexo, mostrando os cinco domínios, divididos em diferentes cores (em azul: Domínio I, verde: Domínio II, amarelo: Domínio III, laranja: Domínio IV, vermelho: Domínio V).....	27
<b>Figura 8-</b> Polimorfismos sinônimos (sSNP) e Polimorfismos não-sinônimos (nsSNP).....	29
<b>Figura 9-</b> Localização dos SNPs rs63751445 e rs63751089 do gene MSH2.....	29
<b>Figura 10-</b> Resíduos Lys675 e Ser676 e suas respectivas interações.....	30
<b>Figura 11-</b> Localização do SNP rs863224614 no gene MSH6.....	31
<b>Figura 12-</b> Reconhecimento do mal pareamento pelo resíduo Phe432 – MSH6.....	31
<b>Figura 13-</b> Genótipo G/G do SNP rs63751445 do gene MSH2 para o alelo G.....	42
<b>Figura 14-</b> Genótipo A/A do SNP rs63751445 do gene MSH2 para o alelo A.....	43
<b>Figura 15-</b> Genótipo T/T do SNP rs63751089 do gene MSH2 para o alelo T.....	44
<b>Figura 16-</b> Genótipo C/C do SNP rs63751089 do gene MSH2 para o alelo C.....	45
<b>Figura 17-</b> Genótipo G/G do SNP rs863224614 do gene MSH6 para o alelo G.....	46
<b>Figura 18-</b> Genótipo T/T do SNP rs863224614 do gene MSH6 para o alelo T.....	47
<b>Figura 19-</b> Interações entre os resíduos 432 da cadeia B (MSH6). A- MSH6 wild type com fenilalanina na posição 432; B- MSH6 mutante com leucina na posição 432.....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Dados dos pacientes com Carcinoma Basocelular. ....	33
<b>Tabela 2-</b> Distribuição da população estudada. ....	40
<b>Tabela 3-</b> Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNPs nos genes estudados.....	41
<b>Tabela 4-</b> Associação da variação genotípica do SNP rs63751445 (A/G) e rs63751089 (T/C) com dados demográficos e histopatológicos. ....	48
<b>Tabela 5-</b> Associação da variação genotípica do SNP rs863224614 (T/G) com dados demográficos e histopatológicos. ....	49
<b>Tabela 6-</b> Interações de hidrogênio identificadas entre a Lys 675 e Ser 676 da cadeia A (MSH2) com ADP. Interações de hidrogênio identificadas entre a Arg 675 e Pro 676 da cadeia A (MSH2 mutado) com ADP.....	50
<b>Tabela 7-</b> Interações de hidrogênio identificadas entre a Phe432 da cadeia B (MSH6) com DNA. ....	50

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Estimativas para o ano de 2018 do número de casos novos dos cânceres, segundo sexo e localização primária, para os dez mais incidentes no estado da Paraíba.....	21
<b>Quadro 2-</b> Genes e seus respectivos polimorfismos, como a sequência dos iniciadores e sequência complementar.....	37
<b>Quadro 3-</b> Condições da PCR assimétrica dos SNPs nos genes MSH2 e MSH6. ....	37
<b>Quadro 4-</b> Protocolos para amplificação e PCR assimétrica dos SNPs nos genes MSH2 e MSH6. ....	37

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 Câncer .....	16
1.2 Câncer de Pele .....	17
1.2.1 Pele.....	17
1.3 Carcinoma basocelular.....	18
1.3.1 Etiologia e fatores de riscos .....	20
1.3.2 Epidemiologia.....	21
1.4 Mecanismos de Reparo ao DNA.....	22
1.4.1 Mecanismo de Reparo de Mal Pareamento do DNA (MMR) .....	22
1.4.2 Gene MSH2 .....	25
1.4.3 Gene MSH6 .....	26
1.4.4 Estrutura da MutS $\alpha$ (MSH2 + MSH6).....	27
1.5 Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms).28	
1.5.1 Os SNPs de interesse em Carcinoma basocelular.....	29
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos .....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>33</b>
3.1 Aspectos éticos .....	33
3.2 Caracterização das Amostras .....	33
3.3 Extração de DNA.....	35
3.4 Método DSASP e suas condições .....	36
3.4.1 O método DSASP e suas condições .....	37
3.5 Docking Molecular .....	38

3.6	Análise estatística .....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
4.1	Dados demográficos e histopatológicos .....	40
4.2	Associação dos SNPs nos genes MSH2 e MSH6 com o risco de CBC.....	40
4.3	Dados demográficos e histopatológicos nos genes relacionados com o risco de CBC ..	47
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

As alterações genéticas são frequentemente relacionadas com a origem do câncer, ou seja, mutações em células germinativas ou somáticas. Na maioria dos casos desfavoráveis ao organismo, podendo desenvolver alguns tipos de cânceres hereditários ou esporádicos. Em estudos subsequentes observou-se que a origem do câncer poderia estar relacionada com as alterações epigenéticas, como metilação de genes específicos, que são relevantes na formação dos tumores. Portanto, o câncer se origina de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em genes específicos como os oncogenes e genes supressores de tumor de diversos tipos celulares. Alterações nos oncogenes resultam em ganho de função, levando à proliferação celular descontrolada e alterações em genes supressores de tumor resultam na perda de função, através da inativação de genes responsáveis por controlar a proliferação e a integridade celular causando instabilidade genômica (KNUDSON, 1971; BAYLIN et al., 1986; VOGELSTEIN; KINZLER, 1993; ALMEIDA et al., 2005).

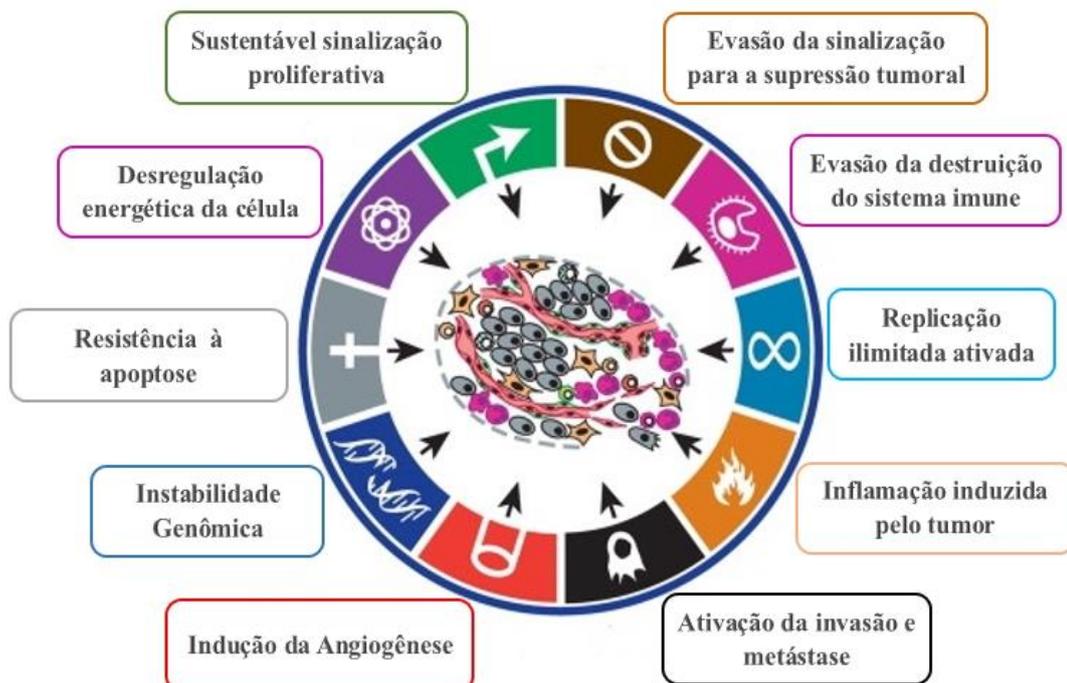
As células cancerosas, multiplicam-se de maneira descontrolada e anormal, onde as células normais são substituídas e os tecidos invadidos perdem suas funções, com menos especificidade que as correspondentes normais (ALMEIDA et al., 2005). Com a constante multiplicação das células cancerosas, Hanahan e Weinberg (2011) descreveram um modelo das características para o desenvolvimento da carcinogênese, onde as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, adquirindo uma sucessão dessas características como: sinalização proliferativa sustentável, escape de supressores de crescimento, invasão e metástase, imortalidade replicativa, indução de angiogênese e resistência a morte celular.

O câncer é considerado uma doença multifatorial, decorrente de fatores ambientais e hereditários. Muito dos casos são relacionados ao ambiente, como a exposição contínua a radiação ultravioleta (RUV), radiação ionizante, dieta inadequada, consumo de álcool, tabaco, agentes infecciosos que causam algumas patologias e agentes químicos cancerígenos (ALMEIDA et al., 2005; DAMAEL et al., 2005).

Eventos como deleção, mutação e superexpressão transformam uma célula normal em maligna que sofrerá proliferação progressiva. Pode-se evidenciar que o desenvolvimento neoplásico está associado a várias alterações, e não a um único fator ambiental, ou a uma alteração genética ou epigenética isolada (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A biologia do tumor não está só relacionada a característica da célula cancerosas, mas em todo o microambiente do tumor e as vias que contribuem para o processo da carcinogênese. Para uma melhor abordagem dos riscos de desenvolver o câncer é importante compreender as variações genéticas e epigenéticas, trazer uma melhor abordagem no processo da patogênese do câncer e auxiliar no prognóstico e no tratamento (HANAHAN; WEINBERG, 2011) (Figura 1).

**Figura 1-** Características adquiridas pelas células tumorais no processo de carcinogênese.



Fonte: Hanahan e Weinberg, 2011 (Imagem adaptada, 2018).

## 1.2 Câncer de Pele

O câncer de pele é uma neoplasia cutânea, caracterizada pelo aumento descontrolado das células anormais que levam a formação de tumores, a perda da diferenciação e formação dos anexos cutâneos (STANLEY, 1991; ALMEIDA et al., 2009). Esse tipo de neoplasia apresenta alta taxa de incidência na população, tornando-se um problema de saúde pública mundial (WHO, 2018).

### 1.2.1 Pele

Sabe-se que a pele é o maior e principal órgão protetor do corpo, serve como uma barreira física contra o meio ambiente, conhecida também como barreira de primeira ordem

por possuir a função de proteção. A pele tem como funções: regulação da temperatura, proteção contra radiação ultravioleta, trauma, patógenos, micro-organismos, toxinas, regeneração celular, retenção de água, entre outros (QUAN; FISHER, 2015). A pele é constituída por três principais camadas: epiderme, derme e hipoderme.

A epiderme é a camada mais externa da pele que recobre todo o corpo, são expressas várias proteínas e outras moléculas que desempenham as funções de proteção, como os melanócitos que são responsáveis pela produção de melanina, as células de *Merkel* e as células de *Langerhans*. Caracterizada por quatro camadas: camada córnea é a camada mais externa (rica em queratina) são os queratinócitos, que sofrem a perda do núcleo; a camada granulosa composta por células ricas em queratina que sofrem atividade apoptótica; camada espinhosa proveniente dos queratinócitos em mitose e a camada basal mais interna responsável pela renovação celular, com intensa atividade mitótica. O processo de renovação da pele é contínuo, onde as células originam na camada basal e empurram as camadas externas. (KHAN et al., 2012; STANDRING et al., 2016).

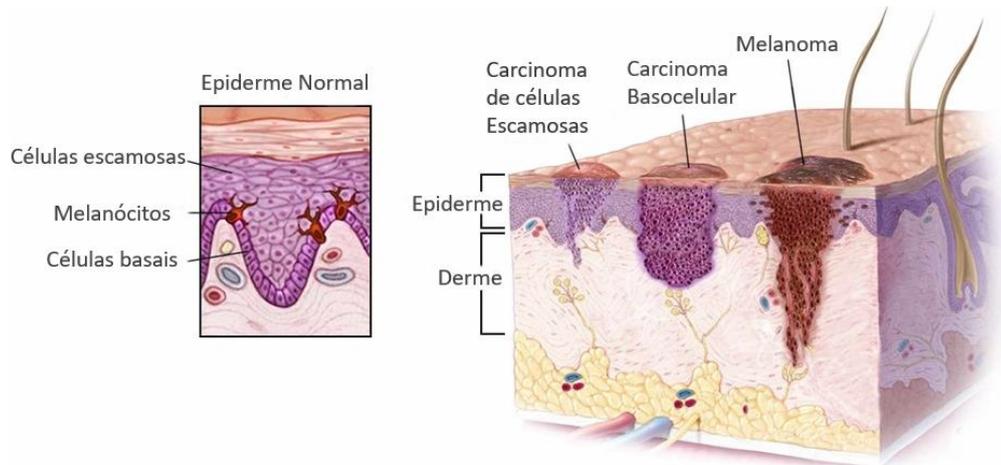
A derme é a camada profunda de tecido conjuntivo intermediário onde se apoia a epiderme, encontram-se os vasos sanguíneos, vasos linfáticos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Camada rica em material fibrilar: fibras colágenas, fibras elásticas e fibras reticulares (SAMPAIO; RIVITTI, 2014; STANDRING et al., 2016).

A hipoderme é a camada mais profunda e interna, onde encontra-se o tecido adiposo. É composta de células que armazenam a gordura subcutânea, que age como isolante térmico e depósito nutritivo de reservas. É formada por tecido conjuntivo frouxo que liga a derme a outros órgãos do corpo, de maneira pouco firme, promovendo a pele ter um grau de deslizamento (SAMPAIO; RIVITTI, 2014; STANDRING et al., 2016).

### **1.3 Carcinoma basocelular**

Existem três tipos principais de câncer de pele: o carcinoma basocelular (CBC) que é o tipo mais comum, carcinoma de células escamosas (CSC), caracterizados como câncer de pele não melanoma (CPNM) e o melanoma, a forma mais fatal (HAN et al., 2011; WRIGHT; WELLER, 2015), com etiologia e tipos celulares diferentes que as originam (Figura 2).

**Figura 1-** Tipos de câncer de pele.



**Fonte:** MAYO, 2015 (Imagem adaptada, 2018).

O carcinoma basocelular (CBC) é o câncer de pele não melanoma mais comum, afeta mais indivíduos de pele clara como os caucasianos, com progressão lenta, podem ter comportamento invasivo, considerado um tumor maligno (mas não fatal) (TELFER et al., 2008; KASPER et al., 2012). Descrito pela primeira vez por Arthur Jacob em 1827, que caracterizou o tumor como uma úlcera facial, sua nomenclatura atual foi proposta por Krompecher em 1903 com base na semelhança das células tumorais como as da camada basal da epiderme (KASPER et al., 2012).

Os CBC se originam das células basais compostas pela camada mais profunda da epiderme, são consideradas células estaminais, estão em constante proliferação e geram queratinócitos que migram em direção à superfície da pele, formando o estrato córneo (DIDONA et al., 2018). Podem surgir a partir de queratinócitos basais da epiderme interfolicular ou do folículo piloso (MARZUKA; BOOK, 2015).

Existem determinados tipos histológicos em que os médicos podem encontrar na prática clínica diária, sendo os mais frequentes caracterizados como: tumores indolentes (nodular e superficial) e de crescimento agressivo (infiltrativo e micronodular). Mais de um padrão histológico pode ser encontrado em paciente com CBC, caracterizado como tumor de histologia mista (MARZUKA; BOOK, 2015). O tipo esclerodermiforme também é muito relatado na prática médica (MENÇAÇOLLI et al., 2015).

O CBC é o tumor cutâneo mais comum, com incidência alta e raramente apresentam metástases, variando de 0,0028% a 0,55%. (PIVA DE FREITAS et al., 2017). Os CBC estão associados a uma morbidade significativa, tornando-se um importante problema de saúde pública (TOTONCHY; LEFFELL, 2017).

### 1.3.1 Etiologia e fatores de riscos

O desenvolvimento de câncer de pele não melanoma (CPNM) é uma combinação de fatores ambientais, genéticos, epigenéticos e fenotípicos (DIDONA et al., 2018). A exposição ao arsênio (MARTINEZ et al., 2011), forte exposição solar, imunossupressão, beta-papiloma vírus humano (HPV) (APALLA et al., 2017), síndromes genéticas, como a síndrome do nevo basocelular (BCNS) também chamada de síndrome de Gorlin e Xeroderma pigmentoso (LEWIN et al., 2015), são alguns dos fatores que podem aumentar o risco de CBC.

A exposição à radiação ultravioleta (RUV) é considerado o principal agente para a carcinogênese cutâneo (MENG et al., 2016). Áreas da cabeça ao pescoço, são mais suscetíveis à ocorrência de CBC pela sua exposição ao sol (PIVA DE FREITAS et al., 2017).

Estudos sugerem que o risco de CBC aumenta com a exposição recreativa do sol na infância e na adolescência, esses períodos de vida podem ser críticos para o risco do câncer na fase adulta (GALLAGHER et al., 1995; CORONA et al., 2001; MARZUKA; BOOK, 2015), a pele clara também é um fator de risco para o desenvolvimento do CBC. As camas de bronzeamento artificial, histórico de queimaduras solares na infância, soropositividade para Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e proximidades da linha do Equador também são fatores relatados ao risco de CBC (MARZUKA; BOOK, 2015).

A radiação UV é classificada de acordo com o comprimento de onda UVA (320-400 nm), UVB (290-320nm) e UVC (200-290nm). A UVB de comprimento de onda mais curto é a UV mais importante na formação do CBC em relação a UVA com um comprimento de onda longo (SHI et al., 2017). Ambos os tipos UVA e UVB causam danos ao DNA (Ácido desoxirribonucleico) e imunossupressão, cruciais na carcinogênese da pele. A UVB é absorvido pela molécula de DNA, causando danos direto. Entretanto, a UVA pode induzir ROS (espécies reativas de oxigênio) celulares que causam danos oxidativos ao DNA (DIDONA et al., 2018).

A radiação pode causar danos ao DNA levando a uma resposta celular que promove a ativação de muitas vias de reparo, envolvendo dezenas de genes, que exercem funções importantes como manter a integridade do genoma e proteção contra mutações, incluindo o câncer de pele (CHEN et al., 2014).

A incidência de CBC é maior nas regiões e em países próximos a latitudes mais equatoriais do que nas latitudes polares, devido a radiação solar (SITUM et al., 2008).

O Brasil é um país que recebe radiação solar durante todo ano. Por ser um país de clima predominantemente tropical, 90% do seu território é localizado entre a linha do Equador e o

trópico de Capricórnio. Além de possuir diversas atividades socioeconômicas ao ar livre como a pesca, a agricultura e até mesmo o lazer, a exposição solar é um dos principais fatores do desenvolvimento de câncer de pele (ZINK, 2014).

### 1.3.2 Epidemiologia

Atualmente 2 a 3 milhões de cânceres de pele não melanoma são diagnosticados em todo o mundo, a cada ano (WHO, 2018), sendo que 80% são cânceres basocelulares, tornando a malignidade cutânea mais comum (GANDHI; KAMPP, 2015).

No Brasil, o câncer de pele não melanoma é o mais incidente em ambos os sexos, estimam-se 85.170 entre os homens e 80.410 nas mulheres, de casos novos para cada ano do biênio 2018-2019. Correspondendo um risco estimado de 82,53 casos novos a cada 100 mil homens e 75,84 para cada 100 mil mulheres. É o câncer mais frequente, e corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no país (INCA, 2018). Na região Nordeste o risco estimado é de 53,75/100 mil para homens e 45,59/100 mil para mulheres. No estado da Paraíba avaliou-se as estimativas de 2.930 novos casos para o ano de 2018 (INCA, 2018) (Quadro 1).

**Quadro 1-** Estimativas para o ano de 2018 do número de casos novos dos cânceres, segundo sexo e localização primária, para os dez mais incidentes no estado da Paraíba.

LOCALIZAÇÃO PRIMÁRIA DA NEOPLASIA MALIGNA	HOMENS		MULHERES		TOTAL
	ESTADO	CAPITAL	ESTADO	CAPITAL	
	CASOS	CASOS	CASOS	CASOS	
<b>Pele não Melanoma</b>	1400	180	1190	160	2930
<b>Próstata</b>	1170	180	-	-	1350
<b>Mama Feminina</b>	-	-	880	240	1120
<b>Estômago</b>	270	50	200	30	550
<b>Traqueia, Brônquio e Pulmão</b>	200	50	170	50	470
<b>Colo do útero</b>	-	-	370	80	450
<b>Cólon e Reto</b>	140	40	180	70	430
<b>Glândula Tireoide</b>	60	-	210	50	320
<b>Cavidade Oral</b>	140	30	100	20	290
<b>Leucemias</b>	110	30	100	20	260

Fonte: Inca, 2018.

As variações geográficas em incidência para CBC também são consideradas relevantes, correlacionadas positivamente entre taxa e proximidade com a linha do equador, onde mais casos são relatados (GANDHI; KAMPP, 2015).

#### **1.4 Mecanismos de Reparo ao DNA**

Manter a integridade genômica é essencial para a célula, mas podem ocorrer danos ao DNA. As vias de reparo são mecanismos fundamentais que desempenham um papel importante na sobrevivência da célula e na manutenção da estabilidade do genoma. As principais vias de reparo são: reparo por ruptura da dupla fita (RDSB), reparo de excisão de base (BER), reparo de excisão de nucleotídeo (NER) e reparo de mal pareamento (MMR).

O reparo por ruptura da dupla fita (RDSB): caracterizado por recombinação homóloga (HR) e junção não homóloga (NHEJ), são responsáveis pelo reparo das quebras de dupla fitas e das interligações cruzadas (GOMES et al., 2017).

Reparo de excisão de base (BER): reparam lesões de DNA endógeno causadas por efeitos de raio X, espécies reativas de oxigênio, removem e substituem a base danificada por glicosilase, por exemplo a base danificada é removida por DNA glicosilase 8-oxoguanina 1 (hOGG1), seguindo-se de clivagem da cadeia açúcar-fosfato por uma endonuclease AP 1 (APE1 ou APEX1) que remove e repara as bases (PATRONO et al., 2014).

Reparo de excisão de nucleotídeos (NER): reparam lesões maiores que pode alterar a configuração do DNA, impedindo a replicação e transcrição, causando lesões induzida por radiação ultravioleta, dímeros de pirimidina ciclobutanos (CPDs) e (6-4) fotoprodutos pirimidina pirimidona (6-4PP) (ALEKSEEV; COIN, 2015). E o reparo de mal pareamento (MMR): que auxilia na correção de erros pós-replicativos do DNA (EDELROCK et al., 2013).

##### **1.4.1 Mecanismo de Reparo de Mal Pareamento do DNA (MMR)**

As polimerases são conhecidas por sua precisão e eficácia, mas falhas podem ocorrer durante o período replicativo do DNA. Esses erros são corrigidos por uma via denominada Reparo de Mal Pareamento (MMR), caracterizado por um processo pós-replicativo. O melhor modelo de MMR descrito é o sistema MutHLS em *Escherichia coli*, esse modelo forneceu a estrutura básica para entender o MMR em eucariotos (EDELROCK et al., 2013). A conservação evolutiva do mecanismo MMR em procariotos e eucariotos, indicam a importância desse reparo em todos os organismos (ERIE; WENINGER, 2014).

Além de reparar os erros pós-replicativos, o mecanismo de mal pareamento também corrige lesões causadas por danos oxidativos e lesões no DNA causadas pela exposição a RUV (LI et al., 2016).

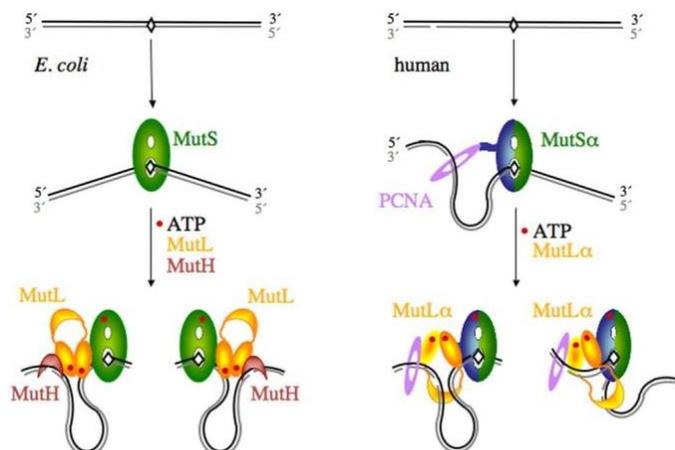
Para sua funcionalidade o sistema de reparo deve ser capaz de fazer duas coisas, reconhecer o par de bases contendo o erro de replicação e de distinguir a fita de DNA que contém esse erro (MODRICH, 2016).

Segundo Pukkila et al. (1983) em *E. coli* o reconhecimento da fita com o erro ocorre através de como se apresenta a metilação da adenina em sequências de (GATC). Quando o DNA recém-sintetizado se apresenta em estado transitório não modificado, a ausência transitória de metilação tem a capacidade de direcionar o reparo, e essas modificações ocorre após a síntese de DNA (MODRICH, 2016).

Organismos que não utilizam o sinal de metilação para discriminar as cadeias, como nos eucariotos, estudos sugerem que o reparo pode ser direcionado a cadeias pré-existentes para iniciação, como lacunas entre os fragmentos de *Okazaki*, que requer descontinuidades de cadeia pré-existentes (CLAVERYS; LACKS, 1986; YANG, 2007; MODRICH, 2016). O MMR é mais eficiente na cadeia atrasada do que na fita líder (PAVLOV et al., 2003).

Em *E. coli*, MutS caracteriza a primeira etapa de reconhecimento e ligação à incompatibilidade, permite recrutar outra proteína conhecida como MutL, e ativar a endonuclease MutH para promover uma quebra de fita simples (*nick*) na fita de DNA recém-sintetizada (YANG, 2007; MODRICH, 2016) (Figura 3).

**Figura 2-** Etapa inicial do MMR em *E. coli* e humanos.



Fonte: YANG, 2007.

MutS e o MutL bacteriano funcionam como proteínas homodiméricas, diferente dos homólogos eucarióticos, que são ativados como heterodímeros, MutS $\alpha$  (MSH2 + MSH6) (Figura 3), MutS $\beta$  (MSH2 + MSH3), e MutL: MutL $\alpha$  (em humanos MLH1 / PMS2; em leveduras MLH1/PMS1), MutL $\beta$  (MLH1 / MLH3) e MutL $\gamma$  (em humanos MLH1/ PMS1; leveduras MLH1/MLH2) (LARREA et al., 2010).

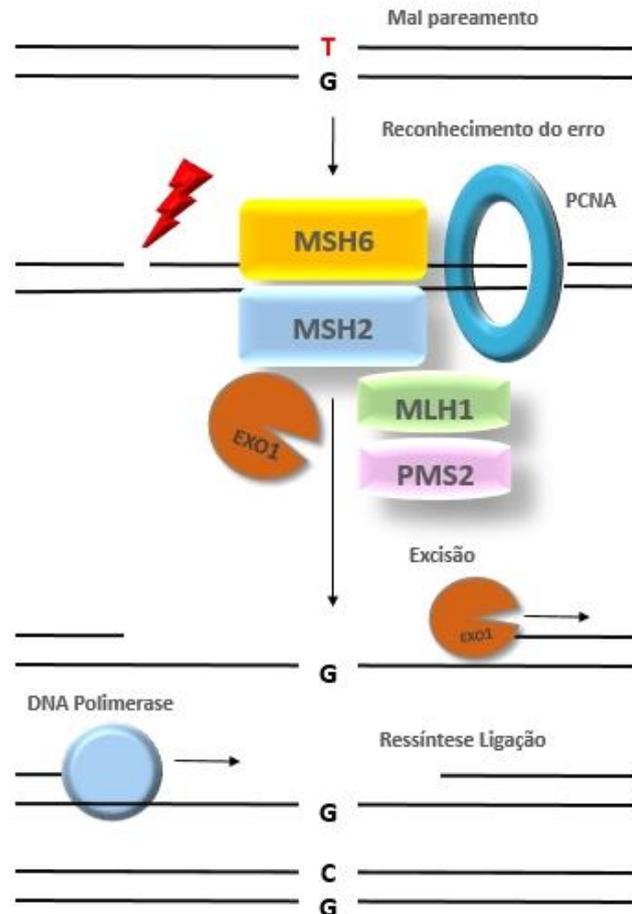
MutS $\alpha$  reconhece desemparelhamentos de base única e pequenas alças de inserção / deleção (IDLs) de 1–2 bases, MutS $\beta$  reconhece inserção /deleção de incompatibilidade contendo duas ou mais bases extras, ambos tem papel no reconhecimento e processamento de erros de identificação, que ao se ligarem, recrutam MutL ao sítio ativo com atividade endonuclease (LARREA et al., 2010), fazendo uma incisão próxima ao local de reconhecimento da lesão (KADYROV et al., 2006), e iniciando o recrutamento da maquinaria necessária para o reparo do DNA (HALABI et al., 2018).

Os complexos MutL tem como subunidade central o MLH1. Nas células humanas estima-se que aproximadamente 90% dessa subunidade está ligada à subunidade PMS2, e o complexo (MutL $\alpha$ ) se encontra em maior quantidade em relação às demais subunidades (RASCHLE et al., 1999; CANNAVO et al., 2005). Homólogos PMS2 em eucarioto possui no seu C-terminal uma região responsável por sua atividade de endonuclease nos sentidos 5'  $\rightarrow$  3' ou 3'  $\rightarrow$  5', como em *S. cerevisiae* (KADYROV et al., 2006; MODRICH, 2016). Assim como a subunidade MLH3 também possui atividade endonuclease (HALABI et al., 2018).

Outras proteínas além das MutS e MutL foram relacionadas ao MMR em eucariotos, como as proteínas de ligação de DNA de fita simples (RPA) que protegem a cadeia de DNA molde da degradação, facilitando a síntese do reparo (RAMILO et al., 2002; MODRICH, 2016). A exonuclease 1 (EXO1) sentido 5'  $\rightarrow$  3' tem papel funcional na excisão gerando um fragmento de fita simples (GENSCHEL et al., 2002; GOELLNER et al., 2015).

Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (UMAR et al., 1996) conhecido como grampo deslizante, envolve a dupla hélice do DNA aumentando a processabilidade das polimerases replicativas e MutS/MutL (KUNKEL; ERIE, 2005; MODRICH, 2016). Complexo conhecido como Fator de Replicação C (RFC) direciona o grampo deslizante ao DNA (BOWMAN et al., 2004; DZANTIEV et al., 2004; MODRICH, 2016), DNA polimerase  $\delta$  auxilia na ressíntese, restaurando a fita dupla (LONGLEY et al., 1997; MODRICH, 2016) e DNA ligase I finalizando o processo de reparo (ZHANG et al., 2005) (Figura 4).

**Figura 3-** Ilustração esquemática do sistema de reparo MMR.



**Fonte:** MARTIN; SCHARFF, 2002 (Imagem adaptada, 2018).

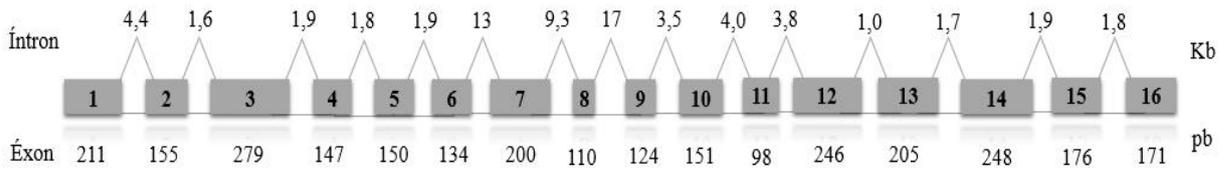
A correção de MMR durante a síntese de DNA, auxilia no processo de replicação. O complexo MutSα progrediu de um processo de leitura de prova pós-replicação procariótica para um guardião do genoma eucariótico com múltiplas funções (EDELROCK et al., 2013).

As mutações nos genes MSH2, MLH1 e MSH6 aumentam a predisposição ao câncer (NILBERT et al., 2009), interferindo no reparo do DNA durante a divisão celular e contribuindo para o processo da carcinogênese (TEIXEIRA, 2007).

#### 1.4.2 Gene MSH2

O MSH2 é um gene homólogo ao MutS de *E. coli*, um dos principais genes envolvidos no reparo de DNA. Em humanos está localizado na região cromossômica 2p22-21 (FISHEL et al., 1993), com aproximadamente 73 kb (quilobases) contendo 16 éxons. Codifica uma proteína com peso molecular de 104,7 kDa (Kilodalton) com 934 aminoácidos (KOLODNER et al., 1994) (Figura 5).

**Figura 4-** Organização genômica do gene MSH2.



**Fonte:** KOLODNER et al., 1994. (Imagem adaptada, 2018).

No estudo realizado por Nilbert et al. (2009) observou-se que as alterações encontradas no gene MSH2 foram inserções e deleções com maior frequência em relação as mutações *missense*, ou seja, troca de aminoácidos.

### 1.4.3 Gene MSH6

Em humanos o gene MSH6, inicialmente denominado proteína de ligação a incompatibilidades G / T (GTBP), está localizado na região cromossômica 2p16.3, distante de 1 megabase do MSH2 (PAPADOPOULOS et al., 1995; EDELBROCK et al., 2013).

Com comprimento de 20 Kb compostos por 10 éxons (Figura 6), o MSH6 é transcrito em um RNAm, codificando uma proteína de 160 kDa de aproximadamente 1360 aminoácidos na forma instável, sem heterodimerização com MSH2 (ACHARYA et al., 1996; EDELBROCK et al., 2013).

**Figura 5-** Organização genômica do gene MSH6.



**Fonte:** ACHARYA et al., 1996. (Imagem adaptada, 2018).

MSH6 na presença de mutação na região de interação entre as subunidades MSH2 e MSH6 causam problemas em sua estabilidade funcional, devido a sua pouca expressão (KARIOLA et al., 2002).

Os tipos de alterações encontradas no gene MSH6, são as mutações *missense* encontradas com maior frequência, seguido de alterações como inserção/deleção, que levam a alteração na proteína (NILBERT et al., 2009).

#### 1.4.4 Estrutura da MutS $\alpha$ (MSH2 + MSH6)

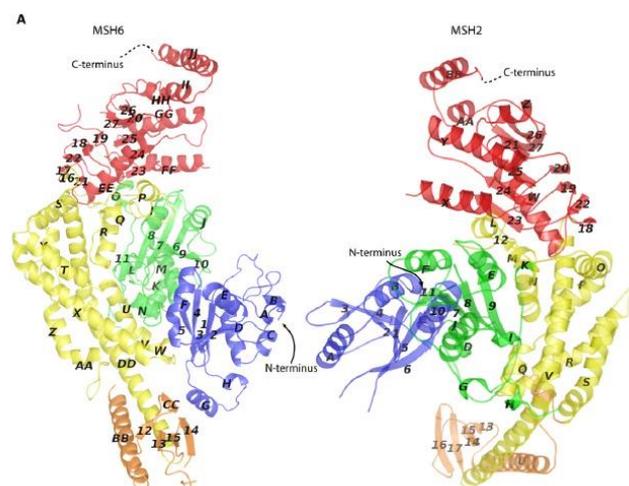
O heterodímero MutS $\alpha$  de 260 kDa produto da transcrição dos genes MSH2 e MSH6, resultam em duas proteínas distintas necessárias para o início da MMR, que reconhece erros de base única e alças de deleção e/ou inserção curtas (IDLs) (KALIYAPERUMAL et al., 2011; EDELBROCK et al., 2013).

Com 934 aminoácidos (MSH2) e 1022 aminoácidos (MSH6) (Figura 7) sua estrutura foi analisada por Warren et al. (2007) em seus estudos de cristalografia, onde observaram semelhanças nas regiões estruturais com o complexo bacteriano MutS, com restrição da região N-terminal de MSH6 (OBMOLOVA et al., 2000; WARREN et al., 2007), região envolvida no processo de fosforilação (KALIYAPERUMAL et al., 2011).

MSH2 e MSH6 são divididos em cinco domínios conservados:

- 1- Domínio N terminal: representa região de ligação com a incompatibilidade no DNA;
- 2- Domínio de Conexão: localizado na fenda formada entre domínios 5 e 3, está envolvido na sinalização alostérica entre os domínios 5, 3 e 1;
- 3- Domínio “Alavanca”: envolvido na transdução de sinais entre os domínios ATPase e de ligação ao DNA incompatível;
- 4- Domínio de “Braçadeira”: conhecido como grampo, permite contato de DNA não específico;
- 5- Domínio ATPase: localizado no C-terminal onde ocorre ligação e hidrólise à adenosina (ATP).

**Figura 6.** Estrutura MutS $\alpha$ . Representação estrutural do complexo, mostrando os cinco domínios, divididos em diferentes cores (em azul: Domínio I, verde: Domínio II, amarelo: Domínio III, laranja: Domínio IV, vermelho: Domínio V).



Fonte: (WARREN et al., 2007).

Segundo Warren et al. (2007) mutações relacionadas ao câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) mapeadas na estrutura de MutS $\alpha$  causam:

- 1- Interferência na interação entre as subunidades MSH2 e MSH6;
- 2- Perda da atividade do domínio ATPase;
- 3- Interferência da ligação ao DNA;
- 4- Interferência na comunicação alostérica entre os locais de ligação ao DNA e ATP;
- 5- Interferência na interação proteína-proteína com efetores adjacentes;
- 6- Perda geral de estabilidade proteica.

### **1.5 Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*).**

Os cromossomos homólogos de uma determinada espécie, apesar de serem bastantes similares, possuem variabilidade nas sequências do DNA, em determinados locais do cromossomo (*locus*), como os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) (ROCHA et al., 2007).

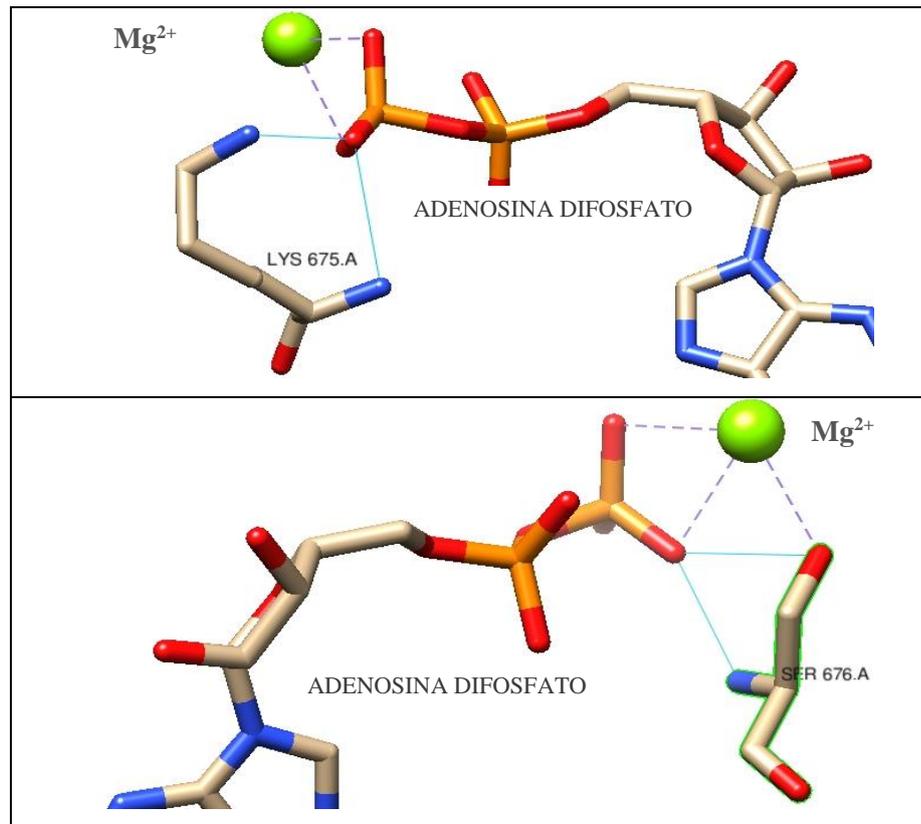
As variações em um único nucleotídeo resultam em sequências alternadas denominadas alelos, onde alelos do tipo selvagem (ou alelo comum) são predominantes e os alelos do tipo variantes (ou mutantes) apresentam-se em 1% ou mais (NUSSBAUM et al., 2016). O SNP compreende uma variação de um único nucleotídeo na sequência do DNA, quando em uma população tem uma frequência estabelecida de 1% ou superior (BROOKES, 1999).

Podem surgir a cada 1.000 pares de bases no genoma humano, encontrados em regiões de sequências de codificação, sequências de íntrons ou em regiões intergênicas (AERTS et al., 2002; KARKI et al., 2015), utilizados para estudar a predisposição das doenças (CHANOCK, 2001; KARKI et al., 2015). As determinadas variações em regiões codificadoras de um gene podem afetar a transcrição, o processamento pós-transcricional ou o produto proteico (NUSSBAUM et al., 2016).

O polimorfismo de nucleotídeo único na região codificadora são denominados de sinônimos (sSNP) ou não-sinônimos (nsSNP). Os sSNP não sofrem mudança na sequência dos aminoácidos. No entanto, os nsSNP resultam na alteração do códon e está por sua vez modifica a sequência do aminoácido (NUSSBAUM et al., 2016) (Figura 8).



**Figura 9-** Resíduos Lys675 e Ser676 e suas respectivas interações.



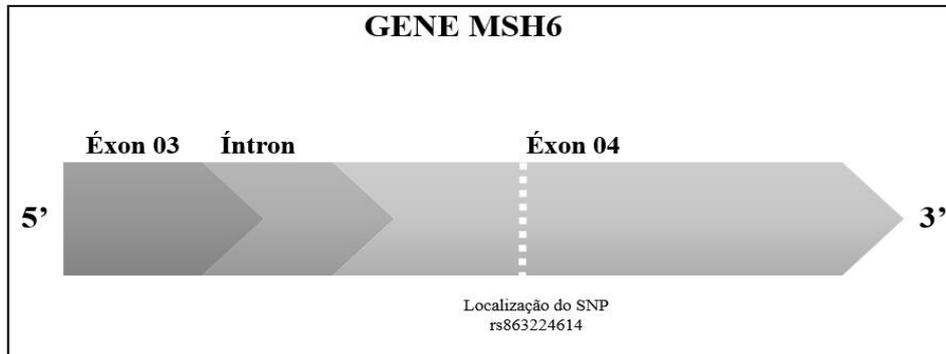
Fonte: Interações verificadas no *Software Chimera* versão 1.13.

A ligação da adenosina regula o funcionamento do heterodímero MutSa, onde o complexo MSH2-MSH6 está na forma ligada (associada a nucleotídeo incompatível) quando ligado ao ADP (Adenosina difosfato), e na forma desligada (sem associação a nucleotídeo incompatível) quando ligada ao ATP (Adenosina trifosfato) (GRADIA et al., 1997; WARREN et al., 2007).

#### **b) SNP no gene MSH6**

O SNP rs863224614 (T>G) de substituição Fenilalanina por Leucina no códon 432 (Phe432Leu) está localizado no éxon 04 (Figura 11).

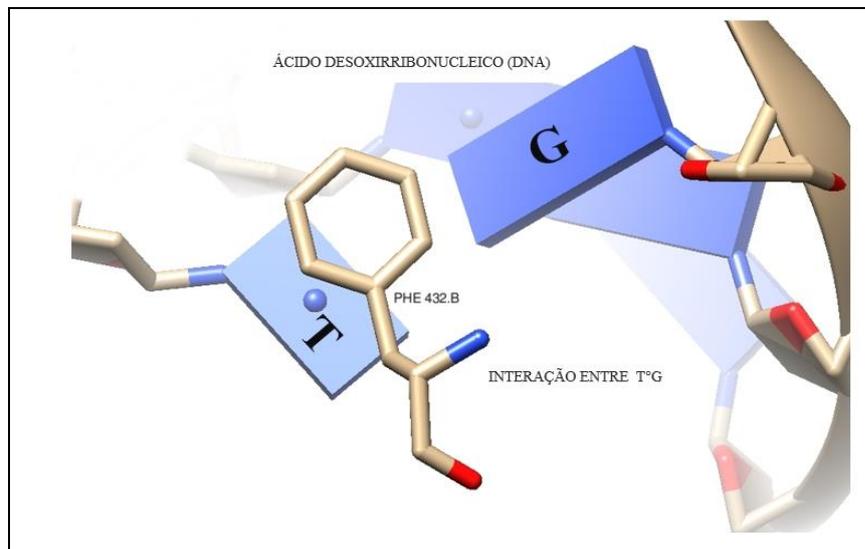
**Figura 10-** Localização do SNP rs863224614 no gene MSH6.



**Fonte:** Elaborada pela autora, 2018.

O resíduo Fenilalanina 432 presente no MSH6 está localizado no Domínio de Ligação ao DNA. Formando contatos específicos com as bases desemparelhadas, único “motivo” conservado (PheXGlu) que estabelece contatos específicos com o mal pareamento e/ou distorções estruturais diferentes no DNA. O MSH6 é instável na ausência de MSH2 (WARREN et al., 2007; EDELBROCK et al., 2013).

**Figura 11-** Reconhecimento do mal pareamento pelo resíduo Phe432 – MSH6.



**Fonte:** Interações verificadas no *Software Chimera* versão 1.13.

É importante destacar que SNPs em genes MMR como MSH2 e MSH6 podem causar danos na sua atividade, e até mesmo perda funcional da proteína, desencadeando a carcinogênese.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Realizar a genotipagem dos SNPs rs63751445 e rs63751089 no gene MSH2 e rs863224614 no gene MSH6, em amostras de tecido parafinado de pacientes diagnosticados com carcinoma basocelular.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a frequência alélica dos SNPs rs63751445, rs63751089 e rs863224614 em amostras de carcinoma basocelular no estado da Paraíba.
- Estimar a associação dos SNPs dos genes em questão à susceptibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma basocelular.
- Estimar a associação dos SNPs dos genes em questão à susceptibilidade as variáveis gênero, faixa etária, localização do tumor e tipos histológicos.
- Realizar teste de ancoragem molecular (*Docking*).
- Realizar as interações entre os resíduos da proteína não mutada e mutada.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 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 com pesquisa envolvendo seres humanos e armazenamento de material biológico, este estudo faz parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética no Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba – UFPB - código CAAE:36522614.2.3001.5883.

#### 3.2 Caracterização das Amostras

Foram utilizadas 100 amostras de tecido parafinado com tempo superior a cinco anos, fornecidas pelo banco de laudos do Laboratório UNILAB/ Patologia Clínica Ivan Rodrigues/João Pessoa – PB, com diagnóstico de Carcinoma Basocelular e as demais informações fornecidas como: gênero, idade, tipo histológico e localização do tumor (Tabela 1).

**Tabela 1-** Dados dos pacientes com Carcinoma Basocelular.

AMOSTRAS	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO DA NEOPLASIA	TIPO HISTOLÓGICO
CBC PB 01	Feminino	78	Orelha esquerda	Esclerodermiforme
CBC PB 02	Masculino	66	Orelha esquerda	Nodular ulcerado
CBC PB 03	Masculino	65	Região molar direita	Nodular pigmentado
CBC PB 06	Feminino	78	Orelha esquerda	Nodular
CBC PB 08	Masculino	66	Orelha esquerda	Nodular ulcerado
CBC PB 12	Masculino	78	Orelha direita	Nodular ulcerado
CBC PB 13	Feminino	57	Partes moles de nariz	Esclerodermiforme
CBC PB 14	Masculino	83	Canto interno do olho	Nodular pigmentado
CBC PB 15	Feminino	74	Orelha direita	Nodular
CBC PB 16	Feminino	78	Partes moles de nariz	Nodular pigmentado
CBC PB 17	Masculino	70	Partes moles de nariz	Nodular
CBC PB 18	Feminino	53	Partes moles de nariz	Basoescomoso nodular
CBC PB 19	Masculino	85	Partes moles de nariz	Superficial
CBC PB 20	Feminino	74	Região Molar esquerda	Nodular pigmentado
CBC PB 21	Feminino	57	Região maxilar esquerda	Infiltrado tecido fibroso
CBC PB 22	Masculino	51	Ombro direito	Nodular
CBC PB 23	Masculino	78	Joelho direito	Nodular
CBC PB 24	Feminino	63	Dorso do nariz	Nodular
CBC PB 25	Feminino	72	Região clavicular	Nodular
CBC PB 26	Masculino	78	Região molar esquerda	Superficial
CBC PB 28	Masculino	78	Ponta Nasal	Nodular

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018) Continua.

AMOSTRAS	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO DA NEOPLASIA	TIPO HISTOLÓGICO
CBC PB 29	Masculino	53	Pálpebra inferior do olho	Nodular
CBC PB 30	Masculino	92	Região do esterno	Nodular
CBC PB 36	Feminino	72	Partes moles nariz	Nodular
CBC PB 37	Feminino	58	Partes moles nariz direito	Superficial multifocal
CBC PB 38	Feminino	68	Partes moles nariz	Nodular
CBC PB 39	Feminino	61	Região molar esquerda	Superficial pigmentado
CBC PB 40	Feminino	59	Órbita esquerda	Superficial pigmentado
CBC PB 42	Masculino	45	Ombro direito	Superficial multifocal
CBC PB 43	Feminino	69	Dorso do Nasal	Nodular
CBC PB 47	Feminino	58	Sulco nasolabial	Nodular
CBC PB 48	Feminino	58	Partes moles do nariz	Nodular
CBC PB 49	Masculino	47	Nariz esquerdo	Nodular
CBC PB 50	Masculino	81	Abdômen	Nodular
CBC PB 51	Masculino	77	Orelha direita	Ulcerado
CBC PB 52	Masculino	70	Nariz à direita	Nodular
CBC PB 53	Masculino	77	Nariz à direita	Ulcerado
CBC PB 54	Feminino	55	Braço direito	Superficial, multifocal
CBC PB 56	Feminino	80	Pescoço	Nodular
CBC PB 57	Masculino	94	Pele esternal	Superficial
CBC PB 58	Feminino	74	Região infra palpebral	Nodular
CBC PB 60	Feminino	74	Dorso nasal	Nodular
CBC PB 62	Feminino	80	Região molar esquerda	Nodular
CBC PB 71	Feminino	70	Peitoral esquerdo	Nodular pigmentado
CBC PB 72	Masculino	53	Região frontal esquerda	Não identificado
CBC PB 73	Masculino	54	Nariz	Nodular
CBC PB 75	Masculino	77	Dorso do nasal	Nodular
CBC PB 77	Feminino	71	Canto interno do olho	Nodular
CBC PB 78	Feminino	71	Região molar direita	Esclerodermiforme
CBC PB 79	Masculino	62	Face esquerda	Nodular
CBC PB 80	Masculino	73	Região molar esquerda	Nodular ulcerado
CBC PB 81	Masculino	39	Pele Fronte	Superficial
CBC PB 82	Feminino	67	Dorso nasal	Nodular
CBC PB122	Feminino	65	Órbita	Nodular
CBC PB 124	Feminino	48	Nariz	Superficial
CBC PB 125	Masculino	85	Nariz	Nodular
CBC PB 131	Masculino	51	Região peitoral	Nodular
CBC PB 133	Masculino	63	Região cervical	Nodular pigmentado
CBC PB 134	Masculino	60	Região fronto-temporal	Nodular
CBC PB 135	Masculino	88	Nariz	Nodular
CBC PB 136	Masculino	95	Periorbitaria esquerda	Nodular
CBC PB 138	Masculino	69	Pescoço	Nodular ulcerado
CBC PB 139	Feminino	66	Nariz	Nodular
CBC PB 141	Masculino	88	Olho	Nodular
CBC PB 142	Masculino	88	Tórax	Nodular
CBC PB 143	Feminino	52	Nariz	Nodular

Fonte: Dados da pesquisa (2018) Continua.

AMOSTRAS	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO DA NEOPLASIA	TIPO HISTOLÓGICO
CBC PB 144	Feminino	52	Ombro direito	Superficial, multifocal
CBC PB 145	Masculino	88	Nariz	Nodular
CBC PB 146	Feminino	67	Região periorbital	Nodular ulcerado
CBC PB 149	Feminino	83	Nariz	Nodular
CBC PB 150	Masculino	43	Fúrcula esternal	Superficial, multifocal
CBC PB 151	Masculino	43	Frontal esquerda	Superficial, multifocal
CBC PB 152	Masculino	43	Pescoço	Superficial, multifocal
CBC PB 153	Masculino	43	Ombro	Superficial, multifocal
CBC PB 155	Feminino	83	Nariz	Nodular
CBC PB 156	Feminino	63	Periórbita	Nodular
CBC PB 157	Feminino	78	Temporal esquerda	Nodular/superficial
CBC PB 158	Masculino	58	Ombro	Nodular ulcerado
CBC PB 159	Masculino	53	Ombro	Superficial
CBC PB 160	Masculino	53	Pescoço	Superficial
CBC PB 161	Masculino	72	Mandibular	Nodular
CBC PB 162	Feminino	55	Nariz	Nodular
CBC PB 163	Masculino	62	Nariz	Esclerodermiforme
CBC PB 164	Masculino	69	Região zigomática direita	Nodular
CBC PB 166	Feminino	68	Temporal esquerda	Nodular
CBC PB 168	Feminino	68	Dorso da mão direita	Nodular
CBC PB 171	Masculino	59	Malar direita	Nodular
CBC PB 172	Feminino	69	Região frontal	Nodular pigmentado
CBC PB 173	Feminino	77	Região temporal esquerda	Superficial, multifocal
CBC PB 176	Feminino	67	Face	Nodular
CBC PB 177	Masculino	70	Nariz	Nodular
CBC PB 178	Masculino	79	Nariz	Nodular, pigmentado
CBC PB 179	Masculino	83	Antebraço esquerdo	ceratose actínica
CBC PB 180	Feminino	67	Face	Nodular
CBC PB 181	Feminino	41	Região peitoral	Nodular
CBC PB 183	Feminino	52	Malar esquerda	Nodular
CBC PB 184	Feminino	57	Nariz	Nodular
CBC PB 185	Masculino	78	Nariz	Nodular ulcerado
CBC PB 186	Masculino	58	Nariz	Nodular
CBC PB 187	Feminino	76	Lábio superior direito	Nodular

Fonte: Dados da pesquisa (2018).

### 3.3 Extração de DNA

As amostras de tecido conservadas em parafina foram submetidas a extração de DNA no Laboratório Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO) do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Para a extração, cada bloco com tecido parafinado foi submetido de 6 a 8 cortes histológicos, cada com espessura em média 3-10  $\mu\text{m}$ . Esses cortes foram adicionados em

microtubos de 1,5 mL e sofreram lavagens de xilol aquecido para retirada da parafina do tecido como descrito por Shi et al. (2002). Após o processo de lavagem por xilol, foram adicionados 1 mL de tampão de Extração contendo (Tween 20 0,45%, Triton X-100 1%, Tris/HCL 0,01M; KCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM; NP-40 0,45%) e 20µL de proteinase K (10 mg/mL) aquecidas a 57°C por 3 horas.

Decorrido o tempo estabelecido foram adicionados 1,5 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico nas proporções (25:24:1), sofrendo inversões suaves por 5 minutos para homogeneização. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, adicionado 1,5 mL de clorofórmio/álcool isoamílico nas proporções (24:1), sendo após homogeneizado e centrifugado, como o passo anterior, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo.

Para a precipitação do DNA, foi utilizado 1 mL de etanol absoluto gelado e posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 3 minutos, desprezando o sobrenadante. O DNA sofreu desidratação em estufa na temperatura de 60°C. Após esta etapa o DNA foi ressuscitado em 200 µL (Microlitros) de água Milli-Q estéril.

### 3.4 Método DSASP e suas condições

O método Dideoxi Único Alelo Específico PCR (*Dideoxy single allele-specific PCR-DSASP*) utilizado para genotipagem consiste na elaboração de iniciador e sequência complementar específica, utilizados para qualquer polimorfismo de base única, permitindo a discriminação alélica, com alta sensibilidade (LIMA et al., 2015). Os *primers* dos genes MSH2 e MSH6 foram desenhados em regiões codificadoras (Quadro 2), com auxílio de *software* de análise de alinhamento de sequências, a partir de bancos de dados como: *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>); <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>) e *GeneRunner* (<http://www.generunner.net/>).

O método DSASP foi padronizado para os SNPs rs63751445 (A>G) e rs63751089 (T>C) no gene MSH2 e rs863224614 (T>G) no gene MSH6 (Quadro 2).

Para a elaboração dos *primers* foram considerados o tamanho, a temperatura, presença ou ausência de estruturas secundárias e o alinhamento das sequências. Os *primers* também foram escolhidos especificamente para a utilização do método DSASP.

**Quadro 2-** Genes e seus respectivos polimorfismos, como a sequência dos iniciadores e sequência complementar.

GENES	SNPs	PRIMERS
MSH2	rs63751445	R 5' TACTATCACCCCAGTTTGTCTCGAATATATG 3' SC 5' GTARATCAACATATATTTCGACAAACTGGGGTGATAGTA 3'
MSH2	rs63751089	R 5' GAGTACTATCACCCCAGTTTGTCTCGAATATA 3' SC 5' TAAAYCAACATATATTTCGACAAACTGGGGTGATAGTACTC 3'
MSH6	rs863224614	F 5' TGTCATCTGTTACAAGGTRGGG 3' SC 5' CATAMAATTTCCCYACCTTGTAACAGATGACA 3'

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018). (R= Reverse, F= Forward, SC= Complementary Sequence).

### 3.4.1 O método DSASP e suas condições

#### a) Condições da PCR

Para o método DSASP a PCR foi assimétrica, isto é, apenas um primer foi utilizado para a amplificação de uma das fitas de interesse, sendo necessária a hibridização com a sequência complementar específica. As condições utilizadas no termociclador (Quadro 3) e volumes para a PCR (Quadro 4) utilizados para cada SNPs são informados a seguir.

**Quadro 3-** Condições da PCR assimétrica dos SNPs nos genes MSH2 e MSH6.

SNP rs63751089	Condições da PCR		
	Pré-desnaturação	95°C	5 minutos
80 Ciclos	Desnaturação	95°C	20 segundos
	Anelamento	50°C	1:30 minutos
	Extensão	72°C	20 segundos
	Extensão Final	72°C	2 minutos
		4°C	Constante
SNPs rs63751445/rs863224614	Condições da PCR		
	Pré-desnaturação	95°C	5 minutos
80 Ciclos	Desnaturação	95°C	20 segundos
	Anelamento	55°C	30 segundos
	Extensão	72°C	20 segundos
	Extensão Final	72°C	2 minutos
		4°C	Constante

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

**Quadro 3-** Protocolos para amplificação e PCR assimétrica dos SNPs nos genes MSH2 e MSH6.

GENES	PCR	MSH2		MSH6
SNPs		rs63751445	rs63751089	rs863224614
Preparo da Reação	H <sub>2</sub> O	13,5 µL	15,5 µL	13,5 µL
	Tampão	3 µL	2,5 µL	3 µL
	MgCl <sub>2</sub>	1 µL	1 µL	1 µL

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018) Continua.

GENES	PCR	MSH2		MSH6
<b>Preparo da Reação</b>	dNTP+ddNTP	4 $\mu$ L	3 $\mu$ L	4 $\mu$ L
	Primer	1,5 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L	1,5 $\mu$ L
	Taq DNA polimerase	1U	1U	1U
	DNA	200ng/ $\mu$ L	200ng/ $\mu$ L	200ng/ $\mu$ L
	Volume final da reação	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L	25 $\mu$ L

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

### b) As condições de hibridização

Para a hibridização foram adicionados a sequência complementar (Quadro 2) a 4 °C durante 55 minutos nas amostras amplificadas por PCR assimétrica.

### c) Análise da Curva de *melting*

A análise da curva de *melting* ( $T_m$ ) 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 analisar a curva de *melting* utilizou-se SYBR Green 2X e Rox 1X (Life Technologies - Carlsbad, CA), que possui ligação específica ao DNA dupla fita.

## 3.5 Docking Molecular

Os testes de ancoragem molecular (*Docking*) foram realizados no *software Hex 8.0.0* (RITCHIE; KEMP, 2000), o que permitiu a obtenção de informações importantes sobre a interação entre a proteína nativa e mutante com o DNA. A estrutura da proteína de reparo MutS $\alpha$  (MSH2 / MSH6) humano com resolução de 3.3 Å foi obtida no Protein Data Bank (PDB: 2O8E). Para obter a estrutura da proteína mutante foram realizadas três mutações: duas na cadeira A (MSH2) (resíduo de lisina na posição 675 foi substituído por arginina; serina da posição 676 pela prolina) e uma mutação na cadeia B (MSH6) (fenilalanina da posição 432 foi substituída pela leucina), utilizando *discovery studio 3.1*. Para análise dos complexos utilizou-se o *Pymol* (DELANO, 2002) e o *software WinCoot 0.8.4* (EMSLEY; COWTAN, 2004).

### 3.6 Análise estatística

Para analisar estatisticamente as amostras de Carcinoma Basocelular foram calculadas e estabelecidas as frequências alélicas dos referidos SNPs, segundo Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, testado por meio de teste *Qui-Quadrado* ( $X^2$ ). Dessa maneira a lei *Hardy-Weinberg* proporcionou a frequência alélica esperada como controle.

A verificação da distribuição dos genótipos dos SNPs na população estudada e a distribuição do gênero, faixa etária, localização do tumor e tipos histológicos nos pacientes, utilizou-se o teste *Qui-Quadrado* ou o teste Exato de *Fisher*, através do *Software Bioestat* - versão 5.3, tendo como significância  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados demográficos e histopatológicos

Das 100 amostras analisadas dos pacientes com Carcinoma Basocelular 52% foram do gênero masculino e 48% do sexo feminino, uma predominância da faixa etária em pacientes acima dos 50 anos de idade (Tabela 2).

A distribuição da localização do tumor, a incidência de tumores apresenta maior evidência na região da cabeça e pescoço com 81% em relação as outras regiões, membros superiores 11%, região do tronco 7% e membros inferiores 1%. A predominância do tipo histológico é caracterizada por nodular 75%, superficial 18%, esclerodermiforme 4%, ulcerado 2% e infiltrante 1% (Tabela 2).

**Tabela 2-** Distribuição da população estudada.

	<b>VARIÁVEL</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Gêneros</b>	Masculino	52%
	Feminino	48%
<b>Idades</b>	30-50	9%
	51-70	50%
	71-100	41%
<b>Localizações do tumor</b>	Cabeça e pescoço	81%
	Membros Superiores	11%
	Tronco	7%
	Membros Inferiores	1%
<b>Tipos histológicos</b>	Nodular	75%
	Superficial	18%
	Esclerodermiforme	4%
	Ulcerado	2%
	Infiltrante	1%

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

### 4.2 Associação dos SNPs nos genes MSH2 e MSH6 com o risco de CBC

Foram analisadas 100 amostras de pacientes com Carcinoma Basocelular para cada polimorfismo, em um total de 200 alelos para cada SNP. Esses SNPs localizam-se na proteína MutS $\alpha$  (MSH2-MSH6), componente da via de reparo de mal pareamento.

O presente trabalho é o primeiro estudo a avaliar a associação dos SNPs rs63751445, rs63751089 no gene MSH2 e rs863224614 no gene MSH6 com a susceptibilidade ao

desenvolvimento do Carcinoma Basocelular no estado da Paraíba através de análise das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs, segundo o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Tabela 3).

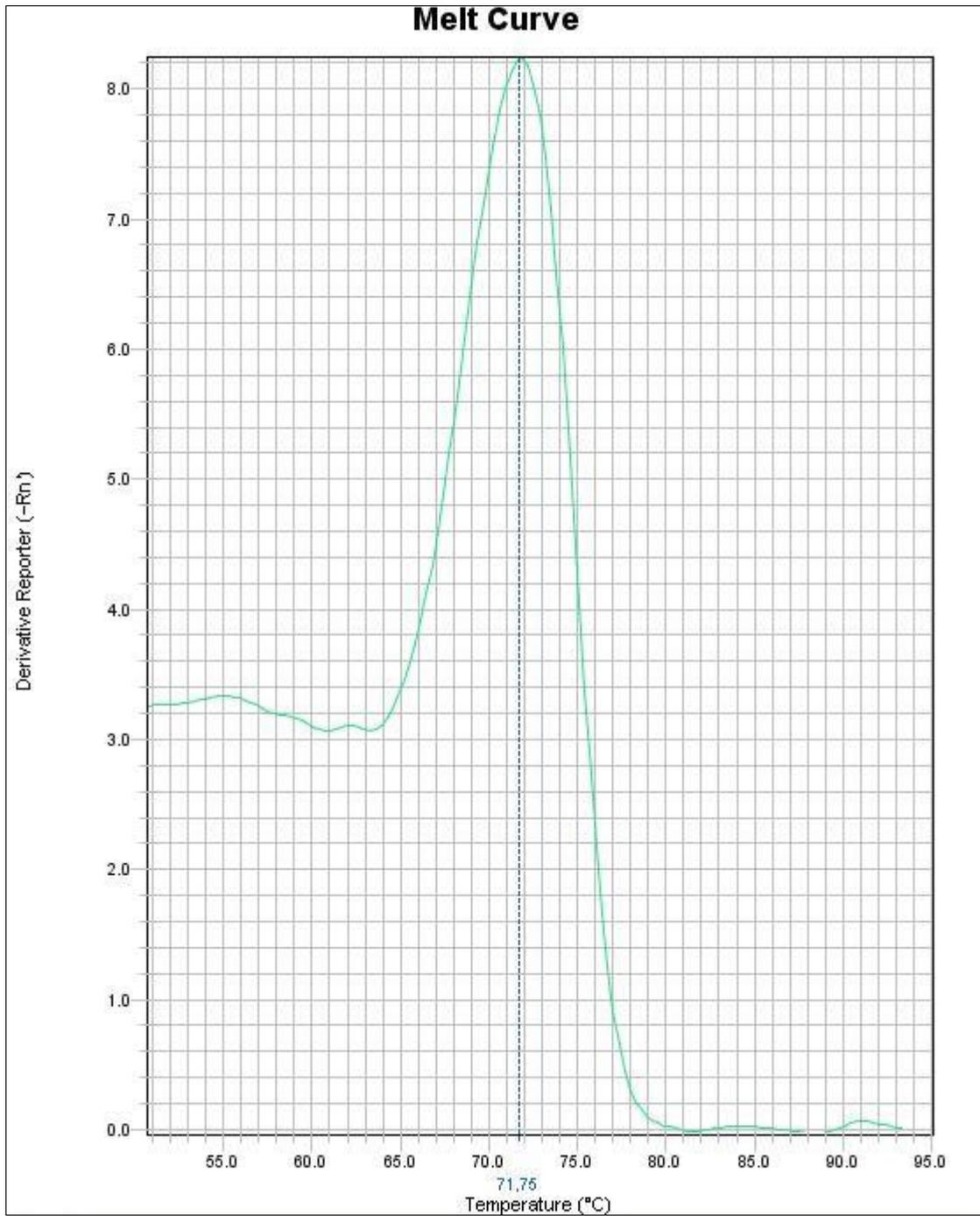
**Tabela 3-** Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNPs nos genes estudados.

Genes/SNPs	Genótipos observados %	Genótipos esperados %	Frequência Alélica		X <sup>2</sup>	p-valor
			A	G		
MSH2 rs63751445	AA	AA	A 69%	G 31%	100	<b>0,0001</b>
	69	47,61				
	GG	GG				
	31	9,61				
	AG	AG				
0	42,78					
MSH2 rs63751089	TT	TT	T 90%	C 10%	100	<b>0,0001</b>
	90	81				
	CC	CC				
	10	1				
	TC	TC				
0	18					
MSH6 rs863224614	TT	TT	T 91%	G 9%	100	<b>0,0001</b>
	91	82,81				
	GG	GG				
	9	0,81				
	TG	TG				
0	16,38					

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

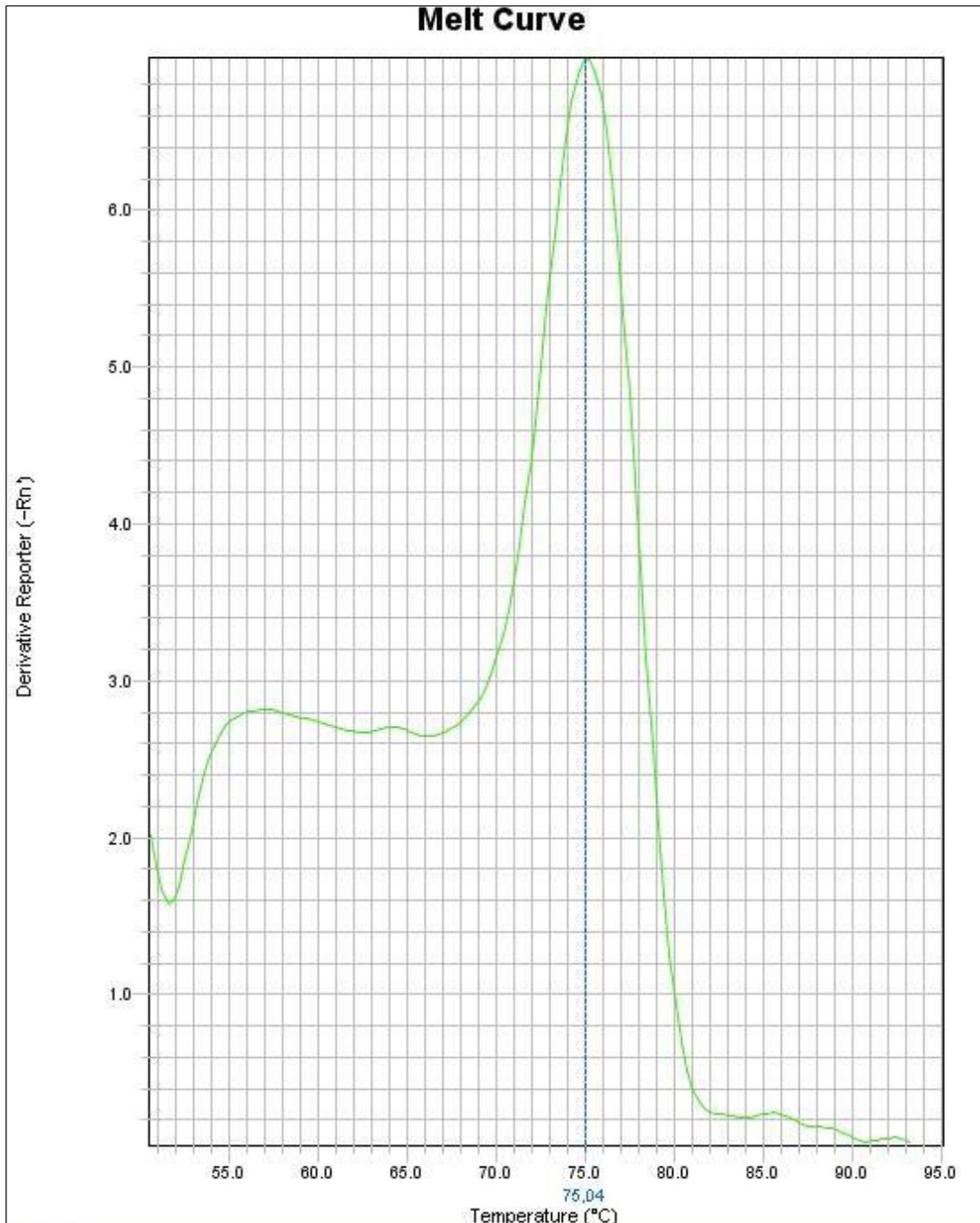
A frequência alélica do SNP rs63751445 no gene MSH2 obtida pelo método DSASP foi de 69% para o alelo ancestral A e 31% para o alelo polimórfico G, com a seguinte distribuição genotípica: 69% (n= 69) A/A (Lys/Lys), 31% (n=31) GG (Arg/Arg) e 0% (n= 0) AG (Lys/Arg). A temperatura de *Melting* (T<sub>m</sub>) observada para o alelo G polimórfico variou de 71°C a 72°C fragmento menor (Figura 13), enquanto que o alelo A variou de 75°C a 76°C (Figura 14).

**Figura 12-** Genótipo G/G do SNP rs63751445 do gene MSH2 para o alelo G.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

**Figura 13-** Genótipo A/A do SNP rs63751445 do gene MSH2 para o alelo A.



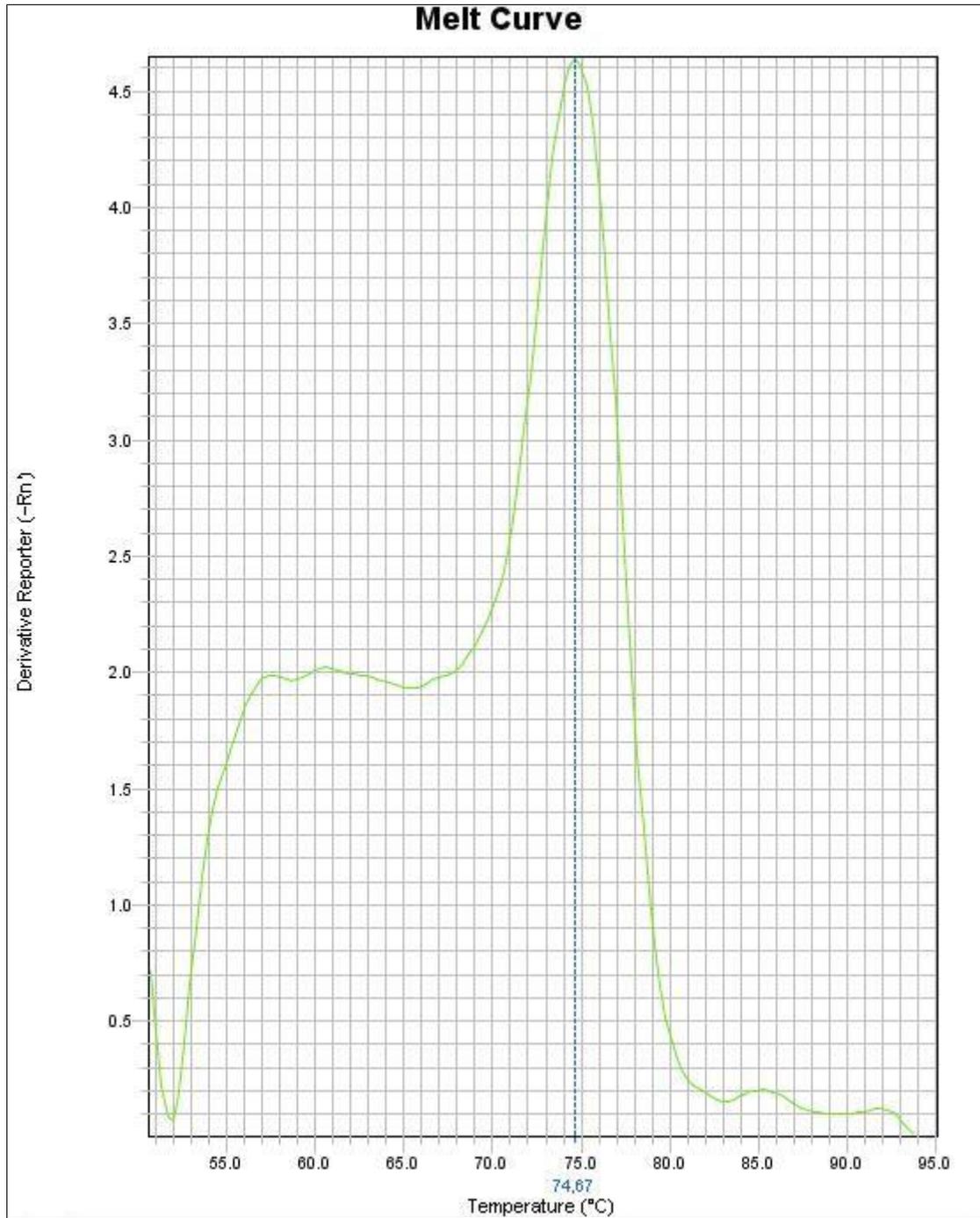
**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

Comparando as frequências genotípicas observadas e esperadas para o SNP rs63751445, observou-se que a nossa população amostral não está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, com  $X^2 = 100$  apresentando  $P \leq 0,0001$ .

A frequência alélica do SNP rs63751089 no gene MSH2, obteve uma frequência alélica de 90% para o alelo ancestral T e 10% para o alelo polimórfico C. Com a seguinte distribuição genotípica: 90% (n= 90) T/T (Ser/Ser), 10% (n=10) CC (Pro/Pro) e 0% (n= 0) TC

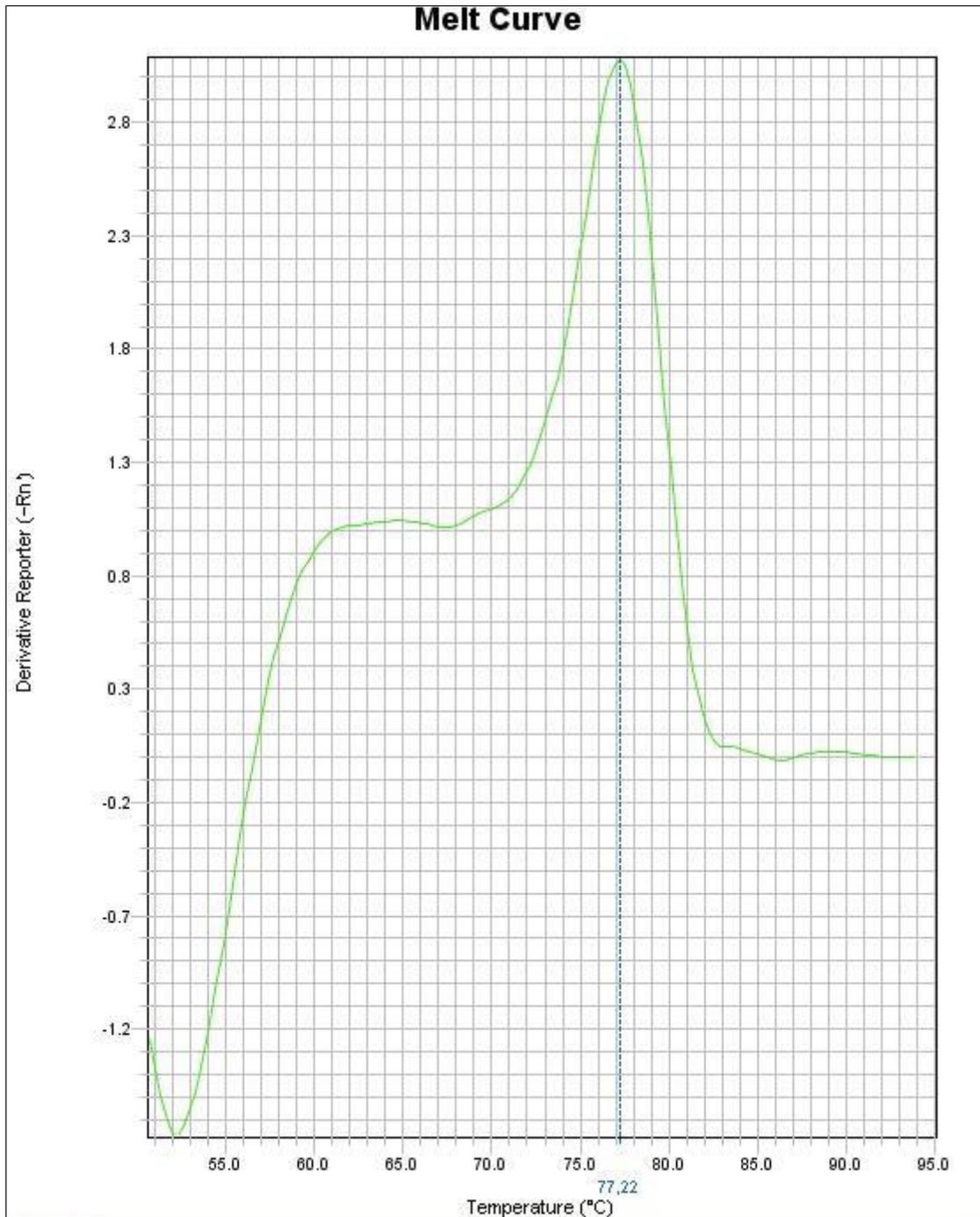
(Ser/Pro). A temperatura de *Melting* ( $T_m$ ) observada para o alelo T variou de 74°C a 75°C (Figura 15), e alelo C apresentou  $T_m$  entre 77°C a 78°C (Figura 16).

**Figura 14-** Genótipo T/T do SNP rs63751089 do gene MSH2 para o alelo T.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

**Figura 15-** Genótipo C/C do SNP rs63751089 do gene MSH2 para o alelo C.



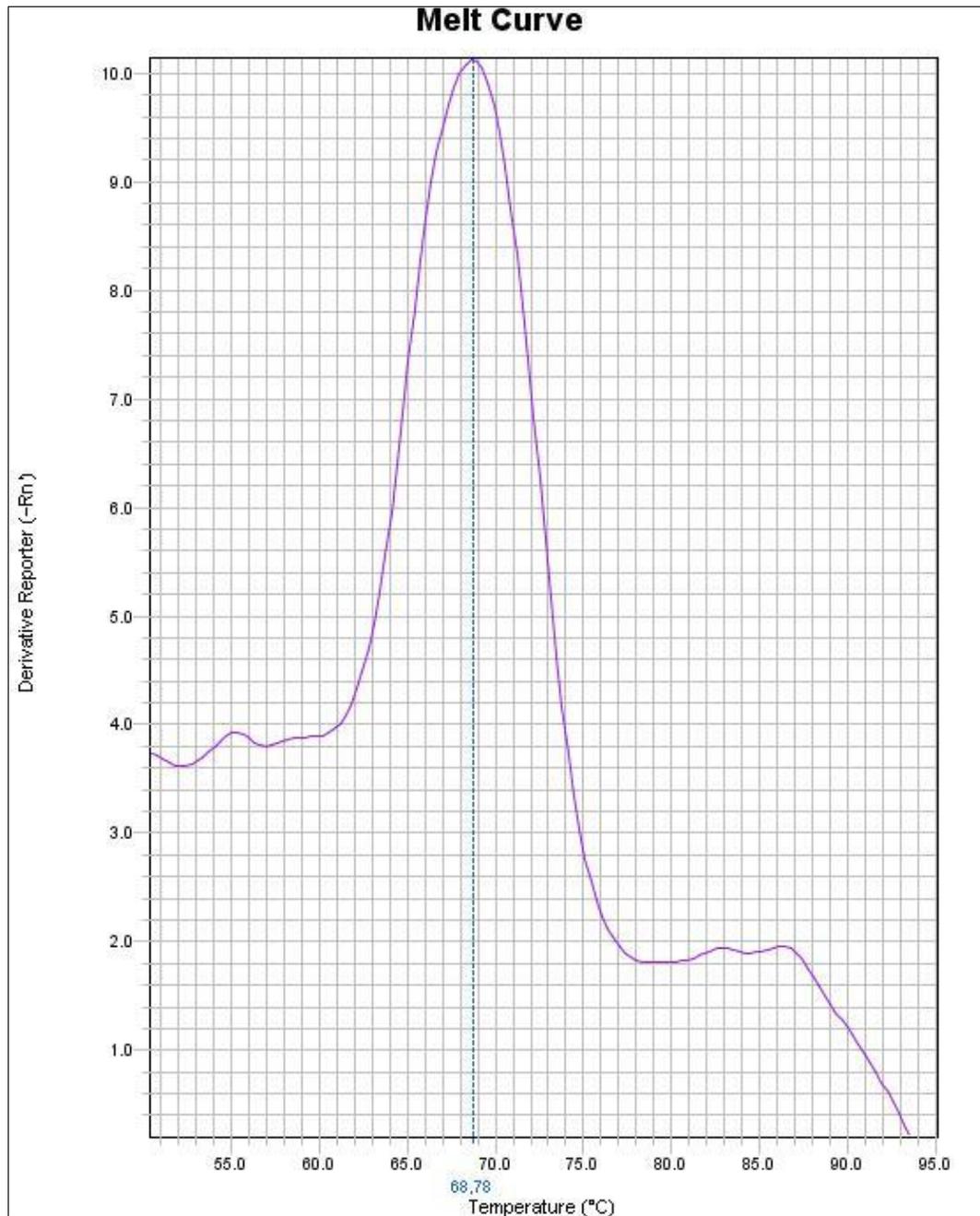
Fonte: Dados da pesquisa (2018).

A relação da frequência genotípica observada/esperada, no polimorfismo rs63751089 indica desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* com o  $X^2= 100$  e p-valor  $< 0,0001$ .

A frequência alélica do SNP rs863224614 no gene MSH6 foi de 91% para o alelo ancestral T e 9% para o alelo polimórfico G. Com a seguinte distribuição genotípica: 91% (n=91) T/T (Phe/Phe), 9% (n=9) G/G (Leu/Leu) e 0% (n=0) T/G (Phe/Leu). A temperatura de *Melting* observada para o Alelo polimórfico G variou de 68°C a 69°C fragmento menor e

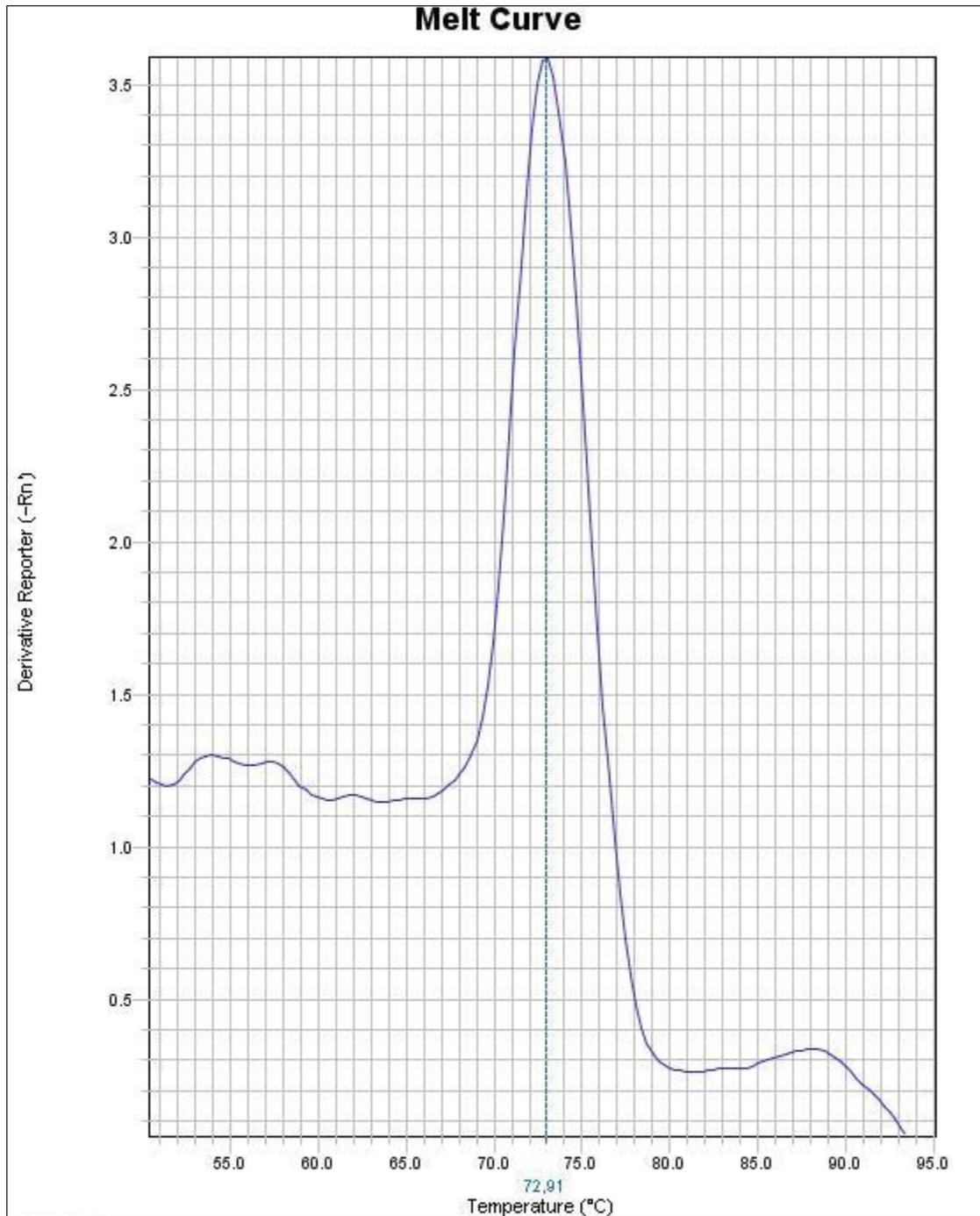
72°C a 73°C para o alelo T fragmento maior (Figura 17 e 18). A relação da frequência genotípica observada/esperada indica que o SNP está em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg*.  $X^2= 100$  e p-valor < 0,0001.

**Figura 16-** Genótipo G/G do SNP rs863224614 do gene MSH6 para o alelo G.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

**Figura 17-** Genótipo T/T do SNP rs863224614 do gene MSH6 para o alelo T.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

#### **4.3 Dados demográficos e histopatológicos nos genes relacionados com o risco de CBC**

Ao analisar a associação dos genótipos encontrados do gene MSH2 em relação aos SNPs rs63751445 (A/G) e rs63751089 (T/C), as variáveis gênero, faixa etária, localização do tumor e tipos histológicos, o presente estudo observou que não houve nenhuma significância estatística entre os genótipos encontrados (Tabela 4).

**Tabela 4-** Associação da variação genotípica do SNP rs63751445 (A/G) e rs63751089 (T/C) com dados demográficos e histopatológicos.

<b>MSH2 rs63751445</b>					
<b>Variável</b>	<b>Total</b>	<b>Genótipo AA</b>	<b>Genótipo AG</b>	<b>Genótipo GG</b>	<b>p-valor</b>
<b>Gênero</b>					
Masculino	52 (52%)	33 (63%)	0 (0%)	19 (37%)	
Feminino	48 (48%)	36 (75%)	0 (0%)	12 (25%)	0.2799
<b>Faixa-etária</b>					
30-50	9 (9%)	8 (89%)	0 (0%)	1 (11%)	
51-70	50 (50%)	35 (70%)	0 (0%)	15 (30%)	0.3631
71-100	41 (41%)	26 (63%)	0 (0%)	15 (37%)	
<b>Localização do Tumor</b>					
Cabeça e pescoço	81 (81%)	52 (64%)	0 (0%)	29 (36%)	
Membros Superiores	11 (11%)	9 (82%)	0 (0%)	2 (18%)	0.1497
Tronco	7 (7%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Membros Inferiores	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Tipos Histológicos</b>					
Nodular	75 (75%)	52 (69%)	0 (0%)	23 (31%)	
Superficial	18 (18%)	13 (72%)	0 (0%)	5 (28%)	0.3248
Esclerodermiforme	4 (4%)	3 (75%)	0 (0%)	1 (25%)	
Ulcerado	2 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	
Infiltrante	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>MSH2 rs63751089</b>					
<b>Variável</b>	<b>Total</b>	<b>Genótipo TT</b>	<b>Genótipo TC</b>	<b>Genótipo CC</b>	<b>p-valor</b>
<b>Gênero</b>					
Masculino	52 (52%)	47 (90%)	0 (0%)	5 (10%)	
Feminino	48 (48%)	43 (90%)	0 (0%)	5 (10%)	1.0000
<b>Faixa-etária</b>					
30-50	9 (9%)	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
51-70	50 (50%)	46 (92%)	0 (0%)	4 (8%)	0.4644
71-100	41 (41%)	35 (85%)	0 (0%)	6 (15%)	
<b>Localização do Tumor</b>					
Cabeça e pescoço	81 (81%)	73 (90%)	0 (0%)	8 (10%)	
Membros Superiores	11 (11%)	10 (91%)	0 (0%)	1 (9%)	0.1357
Tronco	7 (7%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Membros Inferiores	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
<b>Tipos Histológicos</b>					
Nodular	75 (75%)	67 (89%)	0 (0%)	8 (11%)	
Superficial	18 (18%)	17 (94%)	0 (0%)	1 (6%)	0.6267
Esclerodermiforme	4 (4%)	3 (75%)	0 (0%)	1 (25%)	
Ulcerado	2 (2%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Infiltrante	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	

Fonte: Dados da pesquisa (2018). Teste Exato de Fisher - Software Bioestat - versão 5.3.

Os dados demográficos e histopatológicos na tabela 5, relacionados com a variação genotípica do SNP rs863224614 no gene MSH6, demonstram que não houve nenhuma significância estatística.

**Tabela 5-** Associação da variação genotípica do SNP rs863224614 (T/G) com dados demográficos e histopatológicos.

<b>MSH6 rs863224614</b>					
<b>Variável</b>	<b>Total</b>	<b>Genótipo TT</b>	<b>Genótipo TG</b>	<b>Genótipo GG</b>	<b>p-valor</b>
<b>Gênero</b>					
Masculino	52 (52%)	46 (88%)	0 (0%)	6 (12%)	0.4905
Feminino	48 (48%)	45 (94%)	0 (0%)	3 (6%)	
<b>Faixa-etária</b>					
30-50	9 (9%)	9 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0.5793
51-70	50 (50%)	44 (88%)	0 (0%)	6 (12%)	
71-100	41 (41%)	38 (93%)	0 (0%)	3 (7%)	
<b>Localização do Tumor</b>					
Cabeça e pescoço	81 (81%)	74 (91%)	0 (0%)	7 (9%)	0.4177
Membros Superiores	11 (11%)	9 (82%)	0 (0%)	2 (18%)	
Tronco	7 (7%)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Membros Inferiores	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Tipos Histológicos</b>					
Nodular	75 (75%)	68 (91%)	0 (0%)	7 (9%)	0.5943
Superficial	18 (18%)	17 (94%)	0 (0%)	1 (6%)	
Esclerodermiforme	4 (4%)	3 (75%)	0 (0%)	1 (25%)	
Ulcerado	2 (2%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Infiltrante	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018). Teste Exato de Fisher - Software Bioestat - versão 5.3.

O *docking* molecular mostrou que a energia de ligação do complexo entre a MutS $\alpha$  (MSH2 / MSH6) com o DNA foi (-781.507 kcal/mol) e o *docking* da proteína com mutações de substituição apresentou energia (-780.24 kcal/mol).

Os resíduos Lys 675 e Ser 676 que compõe a cadeia A interagem com o ADP. A ancoragem permitiu identificar oito interações importantes, sendo três interações com a Lys675 e cinco com Ser 676. As distâncias das interações são demonstradas na Tabela 6.

Na proteína mutante (Lys 675 Arg e Ser 676 Pro) podemos identificar sete ligações de hidrogênio com o ADP. A Tabela 6 mostra essas interações e a distância em Å de cada uma delas.

**Tabela 6-** Interações de hidrogênio identificadas entre a Lys 675 e Ser 676 da cadeia A (MSH2) com ADP. Interações de hidrogênio identificadas entre a Arg 675 e Pro 676 da cadeia A (MSH2 mutado) com ADP.

Resíduos	Distância (Å)	Resíduos	Distância (Å)
Lys 675	3.35	Arg 675	3.35
Lys 675	3.16	Arg 675	3.47
Lys 675	2.17	Arg 675	2.23
Ser 676	2.55	Arg 675	3.30
Ser 676	3.35	Pro 676	3.04
Ser 676	3.07	Pro 676	2.43
Ser 676	2.77	Pro 676	3.45
Ser 676	2.52	-	-

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

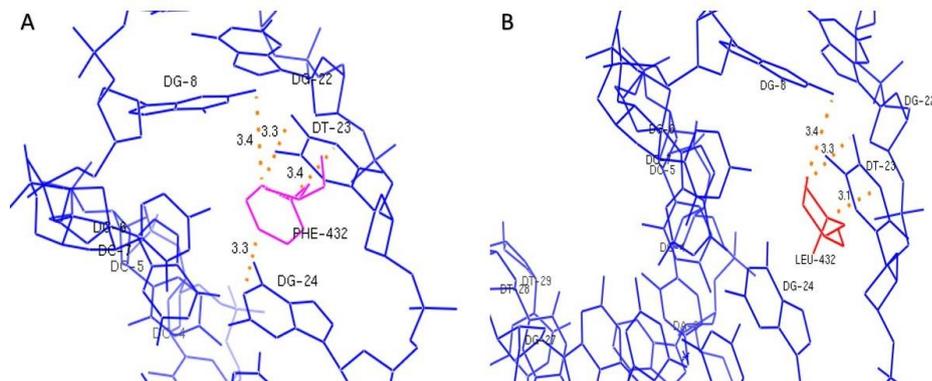
Na proteína não mutada a Phe forma quatro pontes de hidrogênio, sendo uma com DG8, duas com DT23 e uma com DG24. Com a substituição da Phe por Leu a interação com DG24 é perdida. A Figura 4 mostra as interações entre os resíduos 432 da *MutSa wild type* e mutada com o DNA. A Tabela 7 mostra as interações de hidrogênio e a distâncias identificadas entre a Phe 432 da cadeia B (MSH6) com DNA e a Leu 432 na cadeia B da proteína mutada.

**Tabela 7-** Interações de hidrogênio identificadas entre a Phe432 da cadeia B (MSH6) com DNA.

Resíduos	DNA	Distância (Å)
Phe	DG8	3.4
Phe	DT23	3.3
Phe	DT23	3.4
Phe	DG24	3.3
Leu	DG8	3.4
Leu	DT23	3.3
Leu	DT23	3.1

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

**Figura 18-** Interações entre os resíduos 432 da cadeia B (MSH6). A- MSH6 wild type com fenilalanina na posição 432; B- MSH6 mutante com leucina na posição 432.



**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

## 5 DISCUSSÃO

Os pacientes estudados com Carcinoma Basocelular resultou em 52% do gênero masculino e 48% do sexo feminino, enfatizando que no decorrer do envelhecimento presenciamos um maior acometimento de CBC em pacientes acima dos 50 anos de idade (SZEWCZYK et al., 2016) com 91% dos pacientes na faixa etária entre 50-100.

Uma análise retrospectiva realizado por Szewczyk et al. (2016) em pacientes com Carcinoma Basocelular em um hospital na Polônia mostrou a predominância do sexo masculino em relação ao feminino, a cada três pacientes com CBC um era agricultor, ressaltando a frequente exposição solar desse grupo a um dos principais fatores de riscos do CBC, com média de idade de 73 anos. O mesmo foi observado nos estudos de Beiraghi Toosi et al. (2017) com 63% dos pacientes CBC eram do sexo masculino e a média de idade em relação aos homens foi de 64 anos e nas mulheres foi de 67 anos, relatando a maior exposição à luz solar no gênero masculino.

Em um estudo realizado por Ghanadan et al. (2014) em uma população Iraniana relataram a frequência do sexo masculino, devido à diferença de exposição ao sol em homens e mulheres em diferentes áreas geográficas de acordo com o status do trabalho, roupas e outros costumes regionais, como o estilo de roupa feminina (véu) na região iraniana.

Em relação a localização do tumor, a influência do agente carcinogênico RUV corroboraram com nossos achados, onde áreas da cabeça e pescoço são mais suscetíveis. Estudos com agricultores com CBC evidencia a área do nariz e bochechas como localização mais comuns, seguida da orelha, lábios, couro cabeludo e olho (SZEWCZYK et al., 2016). O mesmo resultado obtido no presente estudo, evidenciamos a incidência de tumores na região da cabeça e pescoço com 81% em relação as outras localizações.

Quanto aos tipos histológicos o mais prevalente no presente estudo foi o tipo nodular 75%, corroborando com dados de Beiraghi Toosi et al. (2017) onde os autores descreveram que os pacientes com CBC apresentaram o tipo histológico nodular como o mais frequente, 83,6% em relação aos demais tipos. No estudo de Maroun et al. (2017), relataram que 13 de 16 estudos de CBC bem documentados 81% das lesões foram caracterizadas como nodular.

Os Polimorfismos de nucleotídeo único presente na via MMR contribuem para a susceptibilidade a determinados tipos de cânceres (SANTOS et al., 2018). Essas alterações na sequência do DNA tem um papel importante na carcinogênese tumoral, que podem afetar a atividade normal da proteína interferindo no reparo do DNA (SMOLARZ et al., 2014).

As vias mais comuns de reparo de DNA envolvem interações entre duas ou mais proteínas e molécula de DNA, indicando um meio para efeitos aditivos e até mesmo multiplicativos de diferentes SNPs de uma mesma via, aumentando o risco de desenvolver câncer (SANTOS et al., 2018).

Os resultados mostraram uma associação significativa dos SNPs rs63751445 apresentando uma frequência do alelo polimórfico de 31% e rs63751089 com frequência do alelo polimórfico de 10% no gene MSH2, indicando que estes SNPs estão em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg*  $\chi^2 = 100$  com o p-valor  $< 0,0001$ , sugerindo susceptibilidade no desenvolvimento de CBC. Localizados no éxon 13 no terminal C, fazendo parte do domínio de ATPase, região que regula o funcionamento da proteína MutS $\alpha$ .

O presente estudo corrobora com o trabalho de Calixto et al. (2017) no qual o SNP rs560246973 (T>C) no gene MSH2 localizado no limite íntron/éxon, obtido pelo método de genotipagem Didesoxi Único Alelo Específico PCR (DSASP) está associado com o risco de desenvolver CBC na população brasileira.

A presença do SNP rs4987188 (Gly322Asp) demonstrada por Mik et al. (2017) mostraram que a presença desse SNP em região de éxon do gene MSH2 pode ser utilizado como um marcador molecular em pacientes com Câncer de Cólon com alto risco de recorrência. A presença do SNP rs4987188 (Gly322Asp) também pode aumentar o risco de Câncer Endometrial (POPLAWSKI et al., 2015) e Câncer de Mama (SMOLARZ et al., 2014).

Os resultados referentes ao gene MSH2 no domínio ATPase da proteína MutS $\alpha$ , domínio altamente conservado, reflete a sua importância, tanto para sua atividade quanto para o desenvolvimento do câncer. Corroborando com o estudo realizado por Zahary et al. (2012), ao identificar uma mutação no sítio de *splicing* c.2006-6T> C, adjacente ao éxon 13, uma região altamente conservada do gene MSH2, foi possível observar uma diminuição da expressão da proteína MSH2.

O domínio de ATPase auxilia na conformação da proteína, alternando nos estados ativo presença de ADP e inativo presença de ATP. Lebbink et al. (2010), demonstraram no estudo com MutS $\alpha$ , que o magnésio influencia a troca, induzindo uma ligação de ATP mais rápida e mais compacta.

Estudo realizado por Heinen et al. (2011) com mutação no resíduo K675A (MSH2) resíduo equivalente ao SNP de estudo (rs63751445) demonstraram que a mutação promove a ausência do magnésio, diminuindo 10 vezes mais a afinidade por ATP. Sugerindo que a interação de MSH2-MSH6 por magnésio que regula o domínio ATPase, pode ser um fator

adicional para explicar a prevalência de mutações em MSH2 na síndrome de Lynch ou Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose. A funcionalidade da MutS $\alpha$  é controlada especificamente por MSH2 e magnésio em um complexo com ADP (MSH2 (Mg<sup>2+</sup> ADP) MSH6). Um estudo recente com a população brasileira realizado por Schneider et al. (2018) ao analisar as variantes nos genes MLH1, MSH2, MSH6 e EPCAM em famílias brasileiras com suspeita de síndrome de Lynch, observaram que MLH1 e MSH2 são os genes mais frequentemente afetados.

O ATP ligado as subunidades MSH6 e MSH2 promovem a conformação fechada da proteína, em forma de grampo deslizante. O estudo de Heinen et al. (2011) observou que na presença do magnésio, os grampos deslizantes ligados ao ATP permanecem no DNA por aproximadamente 8 minutos, auxiliando no reparo do DNA. A presença da mutação K675A que coordena o magnésio mostra um aumento na dissociação do grampo com o DNA 5 vezes mais na ausência do Mg<sup>2+</sup> indicando uma desestabilidade funcional devido a mutação.

A análise do *docking* molecular mostrou que a energia de ligação do complexo entre a MutS $\alpha$  e o DNA é mais negativa (-781.507 kcal/mol) se comparada com o *docking* da proteína com mutações de substituição (-780.24 kcal/mol). Estes valores de energia sugerem que a ocorrência de ligação do complexo nativo é mais favorável de ocorrer, do ponto de vista termodinâmico, se comparado com a formação do complexo mutante. De modo que, quanto menor a energia do complexo, melhor a interação e mais estável é a interação proteína-DNA. As interações de hidrogênio observadas nos resíduos Lys 675 e Ser 676 com o ADP na cadeia A, quando mutadas, não dificultou a ligação ao ADP. Entretanto, houve uma quantidade de ligações diferentes nas interações após a mutação, podendo alterar a estabilidade entre os resíduos próximos, visto que a presença de resíduos mutados, com rotações diferentes, modifiquem o sítio de ligação bioquimicamente diminuindo a afinidade entre o ADP/ATP e magnésio, como o estudo relatado por Heinen et al. (2011), onde mutação K675A aumenta a dissociação do grampo, conformação fechada da proteína MutS $\alpha$  com o DNA.

O SNP rs863224614 (T>G) (Phe432Leu) no gene MSH6 faz parte do “motivo” conservado (Phe-X-Glu) no N-terminal. Esse é o único “motivo” responsável por reconhecer e fazer contato específico com a base incompatível (MSH6 em MutS $\alpha$ ), responsável por empilhamento de Fenilalanina (Phe) contra a incompatibilidade (HINGORANI, 2016).

Os resultados sugerem que o SNP rs863224614 (T>G) (Phe432Leu) está em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Com predominância do alelo polimórfico G de 9% responsável pela mudança do resíduo hidrofóbico Fenilalanina por outro resíduo hidrofóbico

Leucina. Provavelmente a troca desses aminoácidos desestabilize o reconhecimento do desemparelhamento, sendo o “motivo” (PheXGlu) bioquimicamente apropriado para detecção de lesões (EDELROCK et al., 2013).

Análises mais detalhadas no estudo mostraram que a substituição da fenilalanina pela leucina na posição 432 da cadeia B (MSH6) ocasiona a perda da ligação de hidrogênio essencial no reconhecimento proteína-DNA. Na substituição da Phe por Leu a interação com DG24 é perdida, o que pode comprometer a função proteica. Sugerindo que a presença do anel aromático do aminoácido fenilalanina, um dos motivos para a estabilidade do reconhecimento e interação com o DNA com incompatibilidade, exerça uma função primordial para o funcionamento do “motivo” conservado (EDELROCK et al., 2013).

Um estudo realizado por Dufner et al. em 2000, mostrou que a mutação em sítio dirigido como no resíduo Phe432 em MSH6 eucarioto resultou na ruptura completa do reparo incompatível, abolindo sua função. Essa informação relata a relevância do estudo nesse “motivo” (PheXGlu), que abrange uma função essencial na proteína MutS $\alpha$  e corrobora com o presente estudo.

Variantes foram relatadas no estudo desenvolvido por Santos et al. (2018) mostrando que o SNP rs1042821 (gly39glu) na região de éxon no gene MSH6 no N-terminal sugerem susceptibilidade ao câncer de tireoide. O mesmo SNP rs1042821 foi relacionado ao risco carcinoma hepatocelular (LIU et al., 2015) e câncer de mama (LEE et al., 2014).

A presença de SNPs no gene MSH6 pode possibilitar a susceptibilidade ao câncer de tireoide através de fatores como falha na integração do complexo MutS $\alpha$  e impacto funcional das mutações no MSH6 resultando a deficiência parcial da via MMR (SANTOS et al., 2018). Sendo relevante que mudanças nos níveis de MSH6 levam a uma diminuição na estabilidade da proteína MSH2 (HOULLEBERGHS et al., 2017).

SNPs no MMR são frequentemente relatados na literatura conferindo susceptibilidade a vários tipos de cânceres como: o carcinoma hepatocelular (LIU et al., 2015), câncer de tireoide (SANTOS et al., 2018), câncer de pâncreas (DONG et al., 2012), câncer de mama (LEE et al., 2014; HSIEH et al., 2017) câncer de esôfago (SUN et al., 2014), câncer de pele (CALIXTO et al., 2017) câncer de pulmão (LO et al., 2011) e câncer de cólon (ZHANG et al., 2016; MIK et al., 2017) diagnosticado em pacientes portadores de mutações germinativas, em um dos cinco genes do mecanismo de reparo de mal pareamento, MSH2, MSH6, MLH1, PMS1 e PMS2 (SILVA et al., 2015).

Há necessidade de ampliar o número amostral em estudos futuros para consolidar à associação proposta, que estabelece a utilização dos SNPs rs63751445, rs63751089 e rs863224614 como potenciais marcadores moleculares para susceptibilidade ao desenvolvimento do CBC.

## 6 CONCLUSÃO

Os SNPs no gene MSH2 estão estatisticamente associados a predisposição ao Carcinoma Basocelular nas amostras analisadas, rs63751445 (A>G) (Lys675Arg) em indivíduos homocigotos para o alelo G com frequência do alelo polimórfico de 31% e rs63751089 (T>C) (Ser676Pro) em indivíduos homocigotos para o alelo C com frequência do alelo polimórfico de 10%.

O SNP rs863224614 (T>G) (Phe432Leu) no gene MSH6 também está associado ao risco de desenvolver CBC em indivíduos homocigotos para o alelo G com frequência do alelo polimórfico de 9%.

Não houve relação estatística entre os genótipos encontrados dos SNPs rs63751445, rs63751089 e rs863224614 com as variáveis gênero, faixa etária, localização do tumor e tipos histológicos.

Na substituição da Fenilalanina por Leucina no MSH6, a interação com DG24 é perdida, sugerindo o comprometimento da função proteica.

Os SNPs estudados estão associados a susceptibilidade ao Carcinoma Basocelular nas amostras analisadas obtidas no Estado da Paraíba. Os resultados obtidos poderão ser utilizados como diagnóstico e prognóstico, em CBC.

## 7 REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S. et al. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 13629-13634, November 1996.
- AERTS, J. et al. Data Mining of Public SNP Databases for the. **Human Mutation**, v. 20, p. 162-173, 2002.
- ALEKSEEV, S.; COIN, F. Orchestral maneuvers at the damaged sites in nucleotide excision. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p. 2177-2186, February 2015.
- ALMEIDA, A. C. C. et al. Frequência do carcinoma basocelular na população menor de 50 anos: estudo do serviço e revisão de literatura. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 84, n. 6, p. 692-694, 2009.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA : Uma Introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- APALLA, Z. et al. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. **Dermatology and Therapy**, v. 7, p. 05-19, 2017.
- BATH-HEXTALL, F. J. et al. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, p. 01-61, 2007.
- BAYLIN, S. B. et al. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. **Cancer research**, v. 46, n. 6, p. 2917-2922, 1986.
- BEIRAGHI TOOSI, A.; MOHAMADIAN ROSHAN, N.; GHONCHEH , M. Evaluation of Subclinical Extension of Basal Cell Carcinoma. **World Journal of Plastic Surgery**, v. 6, n. 3, p. 298–304, September 2017.
- BOWMAN, G. D.; O'DONNELL, M.; KURIYAN, J. Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. **Nature**, v. 429, n. 6993, p. 724-730, 2004.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.
- CALIXTO, P. S. 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**, v. 24, n. 3, p. 489–496, June 2017.

CANNAVO, E. et al. Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. **Cancer Research**, v. 65, n. 23, p. 10759-10766, December 2005.

CHANOCK, S. Candidate Genes and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the Study of Human Disease. **Disease Markers**, v. 17, n. 2, p. 89-98, 2001.

CHEN, X. et al. XRCC3 C18067T Polymorphism Contributes a Decreased Risk to Both Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell. **PLoS ONE**, v. 9, n. e84195, January 2014.

CLAVERYS, J. P.; LACKS, S. A. Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 2, p. 133–165, Jun 1986.

CORONA, R. et al. Risk factors for basal cell carcinoma in a Mediterranean population: role of recreational sun exposure early in life. **Archives of dermatology**, v. 137, p. 1162-1168, September 2001.

DAMAEL, G. et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors.. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1784-1793, 2005.

DELANO, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter On Protein Crystallography**, v. 40, p. 82-92, 2002.

DIDONA, D. et al. Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview.. **Biomedicines**, v. 6, n. 1, 2018.

DONG, X. et al. DNA Mismatch Repair Network Gene Polymorphism as a Susceptibility Factor for Pancreatic Cancer. **Molecular Carcinogenesis**, v. 51, n. 6, p. 491-499, 2012.

DUFNER, P. et al. Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutSalpha is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 36550-36555, November 2000.

DZANTIEV, L. et al. A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. **Molecular Cell**, v. 15, p. 31-41, July 2004.

- EDELBROCK, M. A. et al. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. **Mutation Research**, v. 743–744, p. 53– 66, March–April 2013.
- EMSLEY, P. COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, p. 2126-32, 2004.
- ERIE, D. A.; WENINGER, K. R. Single molecule studies of DNA mismatch repair. **DNA Repair**, v. 20, p. 71-81, 2014.
- FISHEL, R. et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell Press**, v. 75, p. 1027-1038, 1993.
- GALLAGHER, R. P. et al. Sunlight exposure, pigmentary factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. **Archives of dermatology**, v. 131, p. 157-163, February 1995.
- GANDHI, S. A.; KAMPP, J. Skin Cancer Epidemiology, Detection, and Management. **Medical Clinics of North America**, v. 99, p. 1323–1335, 2015.
- GAO, X. et al. The PHLDB1 rs498872 (11q23.3) polymorphism and glioma. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 11, p. 13-21, May 2014.
- GENSCHEL, J.; BAZEMORE, L. R.; MODRICH, P. Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 13302-13311, April 2002.
- GHANADAN, A. et al. Different Anatomical Distribution of Basal Cell Carcinoma Subtypes in Iranian Population: Association between Site and Subtype. **Annals of Dermatology** , v. 26, n. 5, p. 559–563, 2014.
- GOELLNER, E. M.; PUTNAMA, C. D.; KOLODNERA, R. D. Exonuclease 1- dependent and independent mismatch repair. **DNA Repair**, v. 32, p. 24-32, 2015.
- GOMES, L. R.; MENCK , C. F. M.; LEANDRO , G. S. Autophagy Roles in the Modulation of DNA Repair Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, November 2017.
- GRADIA, S.; ACHARYA, S.; FISHEL, R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. **Cell**, v. 91, p. 995-1005, 1997.

- HALABI, A.; FUSELIER, K. T. B.; GRABCZYK, E. GAA•TTC repeat expansion in human cells is mediated by mismatch repair complex MutL $\gamma$  and depends upon the endonuclease domain in MLH3 isoform one. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 8, p. 4022–4032, 2018.
- HAN, J. et al. A Germline Variant in the Interferon Regulatory Factor 4 Gene as a Novel Skin Cancer Risk Locus. *Cancer Research*. **Cancer Research**, v. 71, n. 5, p. 1533-1539, 2011.
- HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, March 2011.
- HEINEN, C. D. et al. Human MSH2 (hMSH2) protein controls ATP processing by hMSH2-hMSH6. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 46, p. 40287-40295, 2011.
- HEINZEN, E. L. et al. Genome-wide scan of copy number variation in late-onset Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 19, n. 1, p. 69-77, 2010.
- HINGORANI, M. M. Mismatch binding, ADP-ATP exchange and intramolecular signaling during mismatch repair. **DNA repair**, v. 38, p. 24-31, 2016.
- HOULLEBERGHS, H. et al. Suspected Lynch syndrome associated MSH6 variants: A functional assay to determine their pathogenicity. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 5, 2017.
- HSIEH, Y. C. MSH2 rs2303425 Polymorphism is Associated with Early-Onset Breast Cancer in Taiwan. **Annals of Surgical Oncology**, v. 24, n. 2, p. 603–610, February 2017.
- INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**, Rio de Janeiro, 2018.
- JACOB, A. Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face. **Dublin Hospital Rep Commun Med Surg**, v. 4, p. 232-239, 1827.
- KADYROV, F. A. et al. Endonucleolytic function of MutL $\alpha$  in human mismatch repair. **Cell**, v. 126, p. 297-308, July 2006.
- KADYROVA, L. Y.; KADYROV, F. A. Endonuclease activities of MutL and its homologs in DNA mismatch. **DNA Repair**, p. 42–49, 2016.
- KALIYAPERUMAL, S.; PATRICK, S. M.; WILLIAMS, K. J. Phosphorylated hMSH6: DNA mismatch versus DNA damage recognition. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 706, p. 36-45, 2011.

- KARIOLA, R. et al. Functional analysis of MSH6 mutations linked to kindreds with putative hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 11, p. 1303–1310, 2002.
- KARKI, R. et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **BMC Medical Genomics**, v. 8, 2015.
- KASPER, M. et al. Basal cell carcinoma — molecular biology and potential new therapies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 455-463, February 2012.
- KHAN, B. A. et al. Human skin, aging and antioxidants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2012.
- KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 4, p. 820-823, 1971.
- KOLODNER, R. D. et al. Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for msh2 mutations. **Genomics**, p. 516-526, 1994.
- KROMPECHER, E. Der Basalzellenkrebs. Jena: Gustav Fischer, 1903.
- KUNKEL, T. A.; ERIE, D. A. DNA mismatch repair. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 681-710, 2005.
- LARREA, A. A.; LUJAN, S. A.; KUNKEL, T. A. SnapShot: DNA mismatch repair. **Cell**, p. 730.e1, May 2010.
- LEBBINK, J. H. G. et al. Magnesium coordination controls the molecular switch function of DNA mismatch repair protein MutS. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 13131-13141, 2010.
- LEE, E. et al. Combined genetic and nutritional risk models of triple negative breast cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 6, p. 955-63, 2014.
- LEWIN, J. M.; CARUCCI, J. A. Advances in the management of basal cell carcinoma. **F1000prime reports**, v. 7, p. 1-8, 2015.
- LI, Z.; PEARLMAN, A. H.; HSIEH, P. DNA mismatch repair and the DNA damage response. **DNA repair**, v. 38, p. 94-101, 2016.

LIMA, E. M. et al. Dideoxy single allele-specific PCR - DSASP new method to discrimination allelic. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 3, p. 414-420, 2015.

LIU, Y. et al. Correlation between polymorphisms in DNA mismatch repair genes and the risk of primary hepatocellular carcinoma for the Han population in northern China. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 50, n. 11, p. 1404-1410, 2015.

LO, Y. L. et al. Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers. **Lung Cancer**, v. 72, n. 3, p. 280–286, June 2011.

LONGLEY, M. J.; PIERCE, A. J.; MODRICH, P. DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 10917-10921, 1997.

MAROUN, C. et al. Nasal Basal Cell Carcinoma with Matrical Differentiation: Risk of Metastasis and Impact on Management. **Head and Neck Pathology**, v. 11, n. 2, p. 228–233, 2017.

MARTIN, A.; SCHARFF, M. D. AID and mismatch repair in antibody diversification. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 605-614, August 2002.

MARTINEZ, V. D. et al. Arsenic Exposure and the Induction of Human Cancers. **Journal of Toxicology**, 2011.

MARZUKA, A. G.; BOOK, S. E. Basal Cell Carcinoma: Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Features, Diagnosis, Histopathology, and Management. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 88, n. 2, p. 167–179, 2015.

MAYO CLINIC, 2015. Disponível em: <https://newsnetwork.mayoclinic.org/discussion/mayo-clinic-q-and-a-regular-skin-checks-can-help-catch-melanoma-other-skin-cancers-early/>. Acesso em: 29 Julho 2018.

MENDACOLLI, P. J. et al. Nuclear morphometry and chromatin textural characteristics of basal cell carcinoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 6, p. 874-878, 2015.

MENDAÇOLLI, P. J. et al. Nuclear morphometry and chromatin textural characteristics of basal cell carcinoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 6, p. 874-878, 2015.

MENG, S. et al. Pre-diagnostic leukocyte mitochondrial DNA copy number and skin cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 37, n. 9, p. 897–903, 2016.

MIK, M. et al. Polymorphism of MSH2 Gly322Asp and MLH1 –93G>A in non-familial colon cancer – a case-controlled study. **Archives of Medical Science**, v. 13, n. 6, p. 1295–1302, 2017.

MODRICH, P. Mechanisms in E. Coli and Human Mismatch Repair. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 55, n. 30, p. 8490–8501, 2016.

NILBERT, M. et al. Major contribution from recurrent alterations and MSH6 mutations in the Danish Lynch syndrome population. **Familial Cancer**, p. 75-83, 2009.

NUNOKAWA, A. et al. The dopamine D3 receptor (DRD3) gene and risk of schizophrenia: case-control studies and an updated meta-analysis. **Schizophrenia Research**, v. 116, n. 1, p. 61-67, 2010.

NUSSBAUM, R. L.; MCLNNES, R. R.; WILLARD, H. F. Diversidade Genética Humana: Mutação e Polimorfismo. In: **THOMPSON & THOMPSON GENÉTICA MÉDICA**. 8. ed. [S.l.]: Elsevier Editora Ltda, 2016. Cap. 4.

OBMOLOVA, G. et. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 703-710, Oct 2000.

PAPADOPOULOS, N. et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. **Science**, v. 268, p. 1915-1917, Jun 1995.

PATRONO, C. et al. Polymorphisms in base excision repair genes: Breast cancer risk and individual radiosensitivity. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, p. 874-882, 2014.

PAVLOV, Y. I.; MIAN, I. M.; KUNKEL, T. A. Evidence for preferential mismatch repair of lagging strand DNA replication errors in yeast. **Current Biology**, v. 13, p. 744-748, April 2003.

PIVA DE FREITAS, P. et al. Metastatic Basal Cell Carcinoma: A Rare Manifestation of a Common Disease. **Case Reports in Medicine**, v. 2017, 2017.

POPLAWSKI, T. et al. Polymorphism of DNA mismatch repair genes in endometrial cancer. **Experimental Oncology**, v. 37, n. 1, p. 44-47, 2015.

- PUKKILA, P. J. et al. Effects of high levels of DNA adenine methylation on methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*. **Genetics**, v. 104, p. 571–582, 1983.
- QUAN, T.; FISHER, G. J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: A mini-review. **Gerontology**, v. 61, n. 5, p. 427–434, 2015.
- RAMILO, C. et al. Partial reconstitution of human DNA mismatch repair in vitro: characterization of the role of human replication protein A. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 7, p. 2037-2046, 2002.
- RASCHLE, M. et al. Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 45, p. 32368–32375, November 1999.
- RITCHIE, D. W, KEMP G. J. L. Protein Docking Using Spherical Polar Fourier Correlations. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 39, p. 178-94, 2000.
- ROCHA, P. A. et al. Polimorfismos Genéticos: Implicações na Patogênese do Carcinoma Medular de Tireóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 5, p. 723-730, 2007.
- SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Anatomia e Fisiologia. In: **Manual de Dermatologia Clínica de Sampaio e Rivitti**. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas Ltda., 2014. p. 1-15.
- SANTOS, L. S. et al. Mismatch repair single nucleotide polymorphisms and thyroid cancer susceptibility. **Oncology Letters**, v. 15, n. 5, p. 6715–6726, 2018.
- SCHNEIDER, N. B. Germline MLH1, MSH2 and MSH6 variants in Brazilian patients with colorectal cancer and clinical features suggestive of Lynch Syndrome. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 5, p. 2078–2088, May 2018.
- SHI, S.-R. et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH.. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1005-1011, 2002.
- SHI, Y.; JIA, , R.; FAN, X. Ocular basal cell carcinoma: a brief literature review of clinical diagnosis and treatment. **OncoTargets and Therapy**, v. 10, p. 2483–2489, 2017.
- SILVA, S. F. et al. Clinical and Molecular Characterization of Brazilian Patients Suspected to Have Lynch Syndrome. **PLoS One**, v. 10, n. 10, 2015.

- SITUM, M. et al. The role of UV radiation in the development of basal cell carcinoma. **Collegium Antropologicum**, v. 32, p. 167-170, October 2008.
- SMOLARZ, B. et al. Gly322Asp and Asn127Ser single nucleotide polymorphisms (SNPs) of hMSH2 mismatch repair gene and the risk of triple-negative breast cancer in Polish women. **Familial Cancer**, v. 14, n. 1, p. 81–88, 2014.
- STANDRING, S. et al. Gray's Anatomy. In: **The Anatomical Basis of Clinical Practice**. 41. ed. [S.l.]: Elsevier, 2016.
- STANLEY, J. M. Biology of basal cell carcinoma (Part I). **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 24, n. 1, p. 1-13, 1991.
- SUN, M. Z. et al. Single nucleotide polymorphisms of DNA mismatch repair genes MSH2 and MLH1 confer susceptibility to esophageal cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 8, p. 2329–2333, 2014.
- SZEWCZYK, M. et al. Basal cell carcinoma in farmers: an occupation group at high risk. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 89, p. 497–501, April 2016 2016.
- TELFER, N. R.; COLVER, G. B.; MORTON, C. A. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, v. 159, p. 35–48, March 2008.
- TENGSTRÖM, M. et al. XRCC1 rs25487 Polymorphism Predicts the Survival of Patients After Postoperative Radiotherapy and Adjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. **Anticancer Research**, v. 34, n. 6, p. 3031-3037, June 2014.
- TEIXEIRA, M. Explicação diversa para a origem do câncer, com foco nos cromossomos, e não nos genes, ganha corpo no establishment científico. **Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental**, v. 10, n. 4, 2007.
- TOTONCHY, M.; LEFFELL, D. Emerging concepts and recent advances in basal cell carcinoma. **F1000Research**, 2017.
- UMAR, A. et al. Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. **Cell**, v. 87, p. 65-73, 1996.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The multistep nature of cancer. **Trends in genetics**, v. 9, n. 4, p. 138-141, 1993.

WARREN, J. J. et al. Structure of the human MutS $\alpha$  DNA lesion recognition complex. **Molecular Cell**, v. 26, May 2007.

WHO - World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>>. Acesso em: 02 Março 2018.

WRIGHT, F.; WELLER, R. B. Risks and benefits of UV radiation in older people-More of a friend than a foe? **Maturitas**, v. 81, n. 4, p. 425-431, 2015.

YANG, W. Human MutL $\alpha$ : The jack of all trades in MMR is also an endonuclease. **DNA Repair**, v. 6, p. 135-139, 2007.

ZAHARY, M. N. et al. Germline mutation analysis of MLH1 and MSH2 in malaysian lynch syndrome patients.. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 8, p. 814-820, 2012.

ZHANG, L. L. et al. A promoter polymorphism in the hMLH1 gene (-93G/A) associated with sporadic colorectal cancer. **Oncology Letters**, v. 12, n. 5, p. 4035-4040, 2016.

ZHANG, Y. et al. Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 693-705, 2005.

ZINK, B. S. Câncer de pele : a importância do seu diagnóstico , tratamento e prevenção. **Fronteiras da dermatologia**, v. 13, p. 76-83, 2014.