

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PAULO JUNIO RIBEIRO DE OLIVEIRA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs DO GENE SMOOTHED À
SUCEPTIBILIDADE DE CANCER BASOCELULAR NA POPULAÇÃO
PARAIBANA**

JOÃO PESSOA, PB

2018

PAULO JUNIO RIBEIRO DE OLIVEIRA



**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs DO GENE SMOOTHED À
SUSCEPTIBILIDADE DE CANCER BASOCELULAR NA POPULAÇÃO
PARAIBANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR.**

Orientador: Prof. Dr. Plínio Delatorre

JOÃO PESSOA, PB

2018



O48e Oliveira, Paulo Junio Ribeiro.

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs DO GENE SMOOTHED À
SUCEPTIBILIDADE DE CANCER BASOCELULAR NA POPULAÇÃO
PARAIBANA / Paulo Junio Ribeiro Oliveira. - João
Pessoa, 2018.

67 f. : il.

Orientação: Plínio Dela torre.

Coorientação: Eleonidas Moura Lima.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Câncer de pele, SMO, Polimorfismo, Genotipagem. I.
Dela torre, Plínio. II. Título.

UFPB/BC

PAULO JUNIO RIBEIRO DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado avaliada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Plinio Delatorre

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal da Paraíba

Orientador

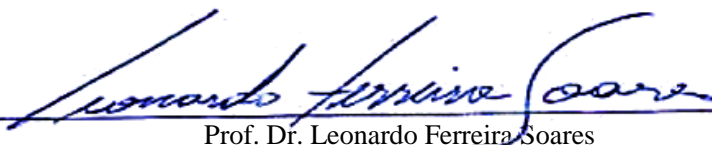


Prof. Dr. Sylvia Satomi Takeno Herrero

Departamento de Biologia Molecular

Universidade Federal da Paraíba

Examinador Externo



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Estadual da Paraíba

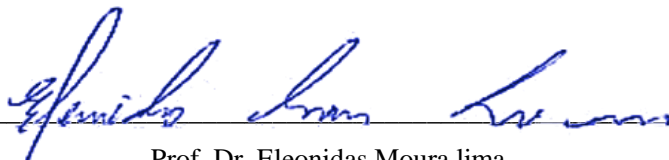
Examinador Interno

Prof. Dr. João Gonçalves de Oliveira

Departamento de Biologia Molecular

Universidade Estadual da Paraíba

Suplente Externo



Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Estadual da Paraíba

Suplente Interno

DEDICATORIA



Dedico este trabalho aos professores Eleonidas Moura Lima e Plinio Delatorre, pela paciência, incentivo, amizade e orientação ao longo dos anos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê. ”

(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS



Primeiramente a **Deus** que é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Ao meu orientador Prof. Dr **Eleonidas Moura Lima** pelo apoio, pelas suas correções e incentivos; além da amizade e palavra sempre amiga.

Ao Prof. Dr **Plinio Delatorre** pela orientação, amizade, apoio e confiança ao longo dos anos.

A minha esposa Rosangela Santos que me acompanhou em boa parte desta trajetória

Ao corpo técnico do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogénica (**LBMEO**), a citar o **Dr. João Gonçalves de Oliveira e a Dra. Sylvia Satomi Takeno**, por sua grande disposição em ajudar a todos.

Aos membros da banca examinadora, por aceitar o convite e suas contribuições com finalidade de enriquecer o presente estudo.

Ao **Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular**, pela disponibilização de equipamentos.

A minha **turma do mestrado** pelas conversas e apoio fundamental na conclusão deste trabalho.

A **Regina Emy Sales de Miranda**, pela sua incansável dedicação, competência e incentivo ao PPGBCM

Aos **meus pais**, por terem me criado.

Ao Dr. **Ivan Rodrigues**, por disponibilizar as amostras e informações clínico-patológicas necessárias para a realização do presente estudo.

A **Clínica Dermatológica Santa Catarina**, na pessoa do Dr. **Otávio Sérgio Lopes**, pelo apoio financeiro.

A **ESTA UNIVERSIDADE**, que oportunizou a janela por onde hoje vislumbro um horizonte superior.

A fundação **CAPES**, pelo incentivo financeiro para realização desta pesquisa.

A **todos os professores**, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado

RESUMO



O Câncer basocelular (CBC) é o mais comum entre todos os tipos de câncer surgindo na camada mais profunda da epiderme, geralmente não é mortal e raramente provoca metástase. No entanto se não tratados adequadamente podem causar danos em grandes porções de tecido adjacente, com conseqüente desfiguração dos pacientes. Sua causa se dá principalmente por exposição solar intensa ou acumulada ao longo da vida mas também pode ocorrer por contato com produtos químicos, exposição à radiação, doenças de pele crônicas, entre outros fatores, sendo muito difícil apontar uma causa única. Algumas vias de sinalização estão relacionadas com o desenvolvimento de CBC. A *via Hedgehog*, muito ativa na fase embrionária, possui pouca função na fase adulta e quando se encontra super expressa possui atividade carcinogênica. Essa atividade anormal tem sido relacionada com CBCs, com mutações que ativam o protooncogene SMO. O presente estudo realizou a genotipagem dos SNPs RS769334511(A>C), RS749414966 (T>C) no gene SMO, em 100 amostras de tecido parafinado de pacientes diagnosticados com carcinoma basocelular. Os resultados foram obtidos por meio do método de genotipagem Didesoxi Único Alelo Específico PCR- DSASP. Os SNPs rs769334511 e rs749414966 do gene SMO apresentaram associação estatisticamente significativa à susceptibilidade e o risco de desenvolver CBC. Os SNPs RS769334511 e RS749414966 SMO são potenciais marcadores moleculares associados à susceptibilidade ao desenvolvimento do CBC nas amostras analisadas.

Palavras-chaves: Câncer de pele, SMO, Genotipagem, Polimorfismo de nucleotídeo único, frequência alélica.

ABSTRACT



The Cancer to basocelular is most common enters all the types of cancer; appearing in the layer deepest of the epidermis, generally it is not mortal and rare it provokes metástase. However if treated adequately they cannot cause damages in great portions of fabric adjacent, with consequent disfigurament of the patients. Its cause if of mainly for intense or accumulated solar exposition throughout the life; but also it can occur for contact with chemical products, exposition to the radiation, chronic illnesses of skin, among others factors, being very difficult to point an only cause. Some ways of signalling are related with the CBC development; the way Hedgehog, very active in the embryonic phase, possesss little function in the adult phase and when if it finds super express possesss carcinogênica activity. This abnormal activity has been related with CBCs, with mutations that activate protoncogene SMO. The present study it carried through the genotyping of SNPs RS769334511 (A>C), RS749414966 (T>C) in gene SMO, 100 fabric samples paraffined of patients diagnosed with carcinoma to basocelular. The results had been gotten by means of the method of genotipagem Didesoxi Only Specific Alelo PCR-DSASP. The SNPs rs769334511 and rs749414966 of gene SMO had statistical presented significant association to the susceptibilidade and the risk to develop CBC. SNPs RS769334511 and RS749414966 SMO associates to the susceptibilidade to the development of the CBC in the analyzed samples are potential molecular markers.

keywords: Cancer basal cell, SMO, Genotyping, Polymorphism of only nucleotide, allele frequency

LISTA DE ABREVIATURAS



CBC	Carcinoma basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular
CPNM	Câncer de pele não melanoma
DdNTP	Didesoxinucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeo
DSASP	Didesoxi Único Alelo Específico
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LBMEO	Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RUV	Radiação ultravioleta
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
T _m	Temperatura de Melting
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C
X ² -	qui- quadrado

LISTA DE FIGURAS



Figura 1 - Características fundamentais do câncer.....	18
Figura 2 - As células constituintes da epiderme humana.	19
Figura 3 - Esquema de Carcinoma Basocelular.	20
Figura 4 - Esquema representativo da via Hedgehog.....	25
Figura 5 - Varios mecanismos que podem inativar um gene. Um mecanismo comum de silenciamento epigenético e a metilação de uma região promotora de um gene.....	27
Figura 6 - Localização do gene SMO no genoma humano.	28
Figura 7 - Sequência genômica de referência e o polimorfismo em destaque rs769334511 ..	38
Figura 8 - Sequência genômica de referência e o polimorfismo em destaque rs749414966 .	38
Figura 9 - Curva de Melting representando o genótipo A/A do SNP rs769334511 do gene SMO.	42
Figura 10 - Curva de Melting representando o genótipo C/C do SNP rs769334511 do gene SMO.	43
Figura 11 - Curva de Melting representando o genótipo C/C do SNP rs769334511 do gene SMO.	44
Figura 12 - Curva de Melting representando o genótipo T/T do SNP rs749414966 do gene SMO.	45
Figura 13 - Curva de Melting representando o genótipo C/C do SNP rs749414966 do gene SMO.	46
Figura 14 - Curva de Melting representando o genótipo T/T do SNP rs749414966 do gene SMO.	47
Figura 15 - Estrutura do SMO Humano. Visão da estrutura geral mostrando os domínios	

extracelular e transmembrana do SMO humano na representação. Laranja, CRD; rosa, domínio de ligação (LD); azul, TMD; mutação de ponto vermelho, inativante Val329Phe; ciano, colesterol; preto, nove pontes dissulfeto numeradas; varas amarelas, duas N-glicanos (NAG).



..... 66

LISTA DE TABELAS



Tabela 1- Estimativa para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária*	23
Tabela 2- Estimativa para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária*João pessoa-PB	24
Tabela 3 - Dados histopatológicos das amostras de Carcinoma Basocelular	31
Tabela 4 - Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNP nos genes estudados.	41
Tabela 5 - Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs769334511 (A C) e susceptibilidade ao CBC.	48
Tabela 6 - Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs749414966 (T C) e susceptibilidade ao CBC.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Genes e seus respectivos polimorfismos, bem como a sequência dos iniciadores e sequência complementar específica para cada polimorfismo amplificado pelo método DSASP.
.....37

Quadro 2 - Protocolos para PCR assimétrica e amplificação dos SNPs nos gene SMO39

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Câncer	16
1.2 PELE	19
1.3 Carcinoma Basocelular	20
1.3.1 Definição	20
1.3.2 Etiologia e fatores de risco	22
1.3.3 Prevalência e Epidemiologia.....	23
1.4 Via Hedgehog.....	25
1.4.1 Gene SMO.....	26
1.5 Polimorfismos de Nucleotídeo Unico (snp)	28
2.OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3.MATERIAL E METODOS.....	31
3.1 Aspectos éticos.....	31
3.2 Amostras	31
3.3 Biologia Molecular.....	35
3.3.1 Extração do DNA	35
3.3.2 Validação in Sílico	36
3.3.2.1 Técnica e desenho dos iniciadores	36
3.3.2.2 Método Didesoxi Único Alelo Específico PCR (Didesoxi single Allele-specific PCR-DSASP	37
3.3.2.3 SNP rs769334511 do gene SMO.....	38
3.3.2.4 SNP rs749414966 do gene SMO.....	38
3.3.2.5 O método DSASP e suas condições	39
3.4 Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Associação dos SNPs nos gene SMO com o risco de CBC	41
4.2 Dados demográficos e histopatológicos – Teste de Fisher.....	48
5 . DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer pode ser descrito como um conjunto de doenças (mais de 100) bastante semelhantes quanto à sua origem e desenvolvimento, mas que apresentam diferenças importantes em sua apresentação, forma de evolução e respostas aos tratamentos (JOHNSON, 1998; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011).

A origem de um câncer ocorre devido a alterações genéticas e epigenéticas em genes específicos; sendo a maior incidência em genes supressores de tumor, genes do mecanismo de reparo e em diversos tipos celulares protooncogênicos. Alterações nos protooncogênicos conduzem a deficiências celulares que vão desde ganho ou perda de funções celulares importantes; à proliferação celular descontrolada e alterações em genes supressores de tumor. Estas alterações genéticas culminam no comprometimento celular, causando a instabilidade genômica no indivíduo acometido (KNUDSON, 1971; BAYLIN et al, 1986; VOGELSTEIN; KINZLER, 1993).

Hanagan E Weinberg, (2011), descreveram um modelo das características para o desenvolvimento da carcinogênese que juntas constituem o princípio organizador, que fornece uma estrutura lógica para compreender a notável diversidade de doenças neoplásicas (figura 1). Os autores postularam que, as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, onde adquirem uma sucessão dessas características que lhes permitam tornar-se tumorigênicas e, finalmente, malignas.

Estes modelos são;

Estímulo permanente para proliferar

Os tecidos normais mantêm um controle rigoroso sobre a multiplicação de suas células. Esse processo ocorre na dependência de fatores de crescimento, que irão se ligar aos receptores da célula. Para escapar desse controle, as células do câncer podem produzir os fatores de crescimento que irão estimular sua própria multiplicação, aumentar o número de receptores para os fatores de crescimento ou tornar esses receptores mais sensíveis ao estímulo dos fatores. Qualquer que seja a via, o resultado é uma célula em processo constante de multiplicação.

Escape dos processos de inibição

O organismo possuiu vários mecanismos para inibir a proliferação de células cancerígenas. Vários deles são determinados por “genes supressores”. Para se desenvolver, além de se manter continuamente estimuladas para crescer, as células malignas precisam escapar desses mecanismos de inibição.

Resistência aos mecanismos de morte celular

A morte celular programada (apoptose) representa uma barreira importante para o desenvolvimento do câncer. Quando uma célula normal acumula muitos erros, ela naturalmente se destrói. Mas a célula do câncer consegue desenvolver diferentes estratégias para escapar desse mecanismo.

Possibilidade de replicação infinita

A maioria das células do corpo só é capaz de se multiplicar algumas vezes ao longo da vida. Essa limitação é, em grande parte, definida pela maturidade da célula. Quando uma célula vence esta limitação e passa a se multiplicar continuamente, dizemos que ela se “imortalizou”. A célula maligna se imortaliza para seguir o caminho da malignidade.

Estímulo para formação de novos vasos sanguíneos

As necessidades de nutrientes e oxigênio do tumor só podem ser supridas com o desenvolvimento de um sistema vascular de suporte. Para que isso ocorra, a célula maligna estimula a formação de novos vasos sanguíneos, em um processo denominado angiogênese.

Invasão e formação de metástases

A capacidade de invadir estruturas vizinhas e se estabelecer em tecidos distantes de sua origem são características mais marcantes das células malignas.

Instabilidade genômica

A aquisição de todas as características listadas depende fundamentalmente da alteração sucessiva do material genético dessas células.

Promoção de inflamação

A infiltração do tecido tumoral por células inflamatórias foi sempre interpretada como uma tentativa de resposta dos organismos contra o câncer. Entretanto, alguns dados mais recentes

indicam que estas células podem, na verdade, ser parte de uma tentativa do tumor escapar do sistema imunológico.

Reprogramação do metabolismo celular

Para se perpetuar, as células neoplásicas se mostram capazes de ajustar seu metabolismo de forma a viabilizar seu crescimento e divisão.

Escape do sistema imunológico

As células neoplásicas se mostram capazes de inativar os componentes do sistema imunológico (por exemplo, linfócitos T) enviados para sua destruição.

Figura 1 - Características fundamentais do

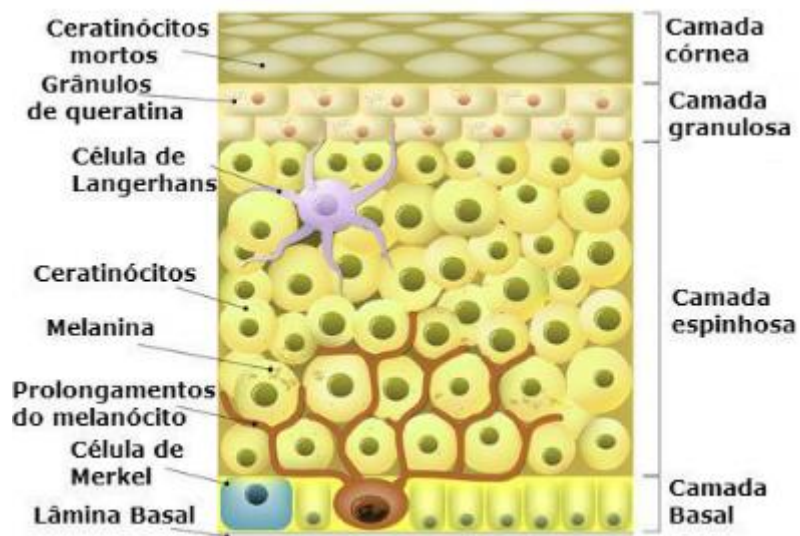


Fonte: Hanahan e Weinberg (2011).

1.2 PELE

A pele é um órgão que separa o corpo humano do meio ambiente (figura 2). Atua como uma barreira que protege o corpo contra Radiação UV, substâncias tóxicas, infecções (FUCHS,2002). A epiderme é o camada mais externa da pele. Queratinócitos, melanócitos, células de Merkel e Langherans são diferentes de tipos de células presentes na epiderme. A derme, parte subjacente da pele, contém tecido conjuntivo, células dendríticas, mastócitos e células T de memória (KUPPER, 2004; SCHERER, 2010). A camada mais profunda, hipoderme, é formada por um tecido conectivo gorduroso denominado panículo adiposo, ricamente servido por vasos sanguíneos e nervos, participando da regulação de temperatura corpórea, termo isolamento, depósito nutricional e provisão de energia, além de estar envolvido no suporte das estruturas subjacentes e proteção mecânica às pressões e traumatismos externos (LEONARDI, 2008).

Figura 2– As células constituintes da epiderme humana.



Fonte: Amato,2018 (adaptado)

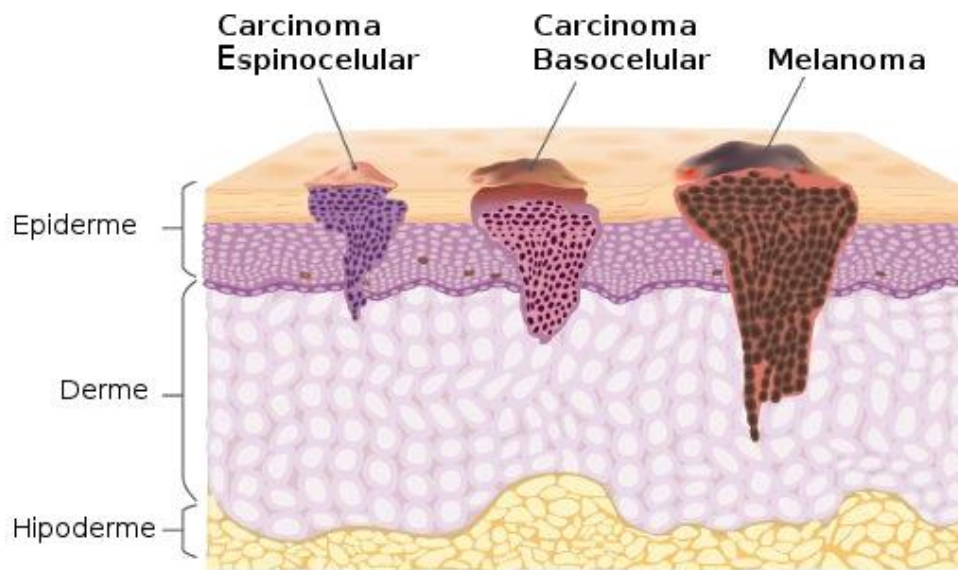
1.3 Carcinoma Basocelular

1.3.1 Definição

O Carcinoma basocelular (CBC) é uma neoplasia cutânea que se origina de células basais epiteliais pluripotentes imaturas, que perderam sua capacidade de diferenciação e queratinização normais e dos anexos cutâneos (ALMEIDA et al, 2009).

O tipo mais comum de câncer de pele é o Carcinoma basocelular (CBC), seguido pelo carcinoma espinocelular (CEC), e - o mais fatal - melanoma cutâneo (MC) (KOSINIAK-KAMYSZ et al, 2012), (figura 3). A incidência de ambos os cânceres de pele melanoma e não melanoma tem aumentado em todo o mundo. Portanto, é de grande importância obter um profundo conhecimento de câncer de pele, especialmente sua etiologia (WUNING et al, 2014).

Figura 3– Esquema dos tipos de câncer de pele.



Fonte: DiseaseFix, 2018

O câncer de pele em estágio inicial pode ser facilmente tratado por procedimentos ou técnicas simples, mas o câncer de pele avançado não pode ser tratado de forma eficaz por qualquer medicação. Portanto, detectar e tratar a doença no estágio inicial aumentam as chances de cura (EINSPAHR,2002; ROSARIO,2011). Ao todo, 80% dos cânceres de pele são de CBC, 16% são de CEC e 4% de melanoma (GREENLEE, 2000; MIOT,2011).

Tipos de câncer de pele

O câncer de pele pode ser de dois tipos, principalmente.

1. Melanoma não maligno; que é dividido em CBC e CEC Ambos ocorrem principalmente devido à exposição crônica aos raios UV.
2. Melanoma maligno - MM podem ocorrer devido à intensa exposição e queimadura solar (SHAHEEL, 2011)

Fatores ambientais e genéticos podem estar associados, em ambos os tipos de câncer (KOSINIAK-KAMYSZ et al, 2012). Condições como etnia, idade, gênero, a capacidade individual de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA), também estão relacionadas na literatura como fatores que impactam na incidência de Câncer de pele (CHINEM; MIOT, 2011).

A radiação UVB gera produtos mutagênicos no DNA, como os dímeros de ciclodipirimidina, e mutações em importantes genes reguladores das funções celulares (CHINEM; MIOT, 2011). Resulta na ativação de protoncogenes e inativação de genes supressores de tumor nos queratinócitos e para a morte celular programada (DOURMISHEV; RUSINOVA; BOTEV, 2013). A radiação UVA apresenta efeito indireto, gerando radicais livres citotóxicos e mutagênicos e favorecendo os efeitos da radiação UVB. Além disso, a radiação UV tem ação imunossupressora na pele, comprometendo a atividade de vigilância antitumoral local das células dendríticas (CHINEM & MIOT, 2011).

Os danos causados pela radiação ultravioleta, ocasionam falhas nos mecanismos de reparo, diferenciação e morte celular que levam a uma desregulação que culmina na multiplicação desordenada das células mutadas e consequente formação de tumor. Logo, os sistemas de reparo do DNA desempenham um papel importante na homeostase do genoma, protegendo-o contra mutações que podem levar aos mais diversos tipos de câncer, incluindo câncer de pele (THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER,2007; WUNING et al, 2014).

O tipo mais comum de câncer de pele é o CBC. Geralmente ocorrem em regiões da cabeça e pescoço seguido por tronco e extremidades. Surgem na camada basal da epiderme (CRAYTHORNE, 2017). Segundo Craythorne (2017) o CBC pode ser classificado em:

Nodular-ulcerativo

Frequentemente este tipo de CBC se liga a epiderme. Ele é formado por largas ilhas tumorais na derme. Elas podem ser redondas ou ovais. Este é o tipo de carcinoma basocelular mais comum

Micronodular

Este tipo de CBC é parecido com o nodular-ulcerativo, porém seus agrupamentos celulares são muito pequenos. É o tipo mais agressivo, podendo se espalhar com maior facilidade para os arredores.

Pigmentado

No carcinoma basocelular pigmentado, o câncer forma ilhas de tumor redondas ou ovais de cor escura devido a acúmulos de melanina, o pigmento da pele.

Cístico

O carcinoma basocelular cístico possui um formato redondo ou oval largo e em seu centro existem secreções.

1.3.2 Etiologia e fatores de risco

As causas dos CPNM são fatores ambientais e intrínsecos do hospedeiro. Fatores ambientais associados ao CPNM são, exposição solar, depleção da camada de ozônio e exposições químicas. Fatores intrínsecos do hospedeiro são HPV, susceptibilidades genéticas, tom de pele, e imunossupressão (SALADIE,2005; LEITER,2008; MILLIE,2010).

Os trabalhadores ao ar livre também, são mais propensos a câncer de pele, pois podem ser facilmente afetados pela exposição aos raios UV. A alta exposição durante os finais de semanas e feriados também estão envolvidas em exposição crônica da pele à luz ultravioleta (WIECKER, 2003; RÜDIGER, 2011)

1.3.3 Prevalência e Epidemiologia

Indivíduos de pele clara, cabelos ruivos e loiros, olhos azuis ou verdes são mais suscetíveis ao câncer de pele (CLOUGH, 2008; VEIEROD, 2010).

Sinais e Sintomas do Melanoma

- Lesões com alterações no tamanho, forma ou cor;
- Exsudação ou sangramento das lesões;
- Lesões com prurido, duras, formato irregular ou inchadas (SINEAD, 2009).

Para o Brasil, estimam-se 85.170 casos novos de câncer de pele (Tabela 1) não melanoma entre homens e 80.410 nas mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 82,53 casos novos a cada 100 mil homens e 75,84 para cada 100 mil mulheres. É o mais incidente em ambos os sexos (INCA, 2018).

Tabela 1- Estimativa para o ano de 2018 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária*

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro	324.580	314,55	-	-	-	-	310.300	292,74	-	-	-	-

*População padrão mundial (1960). / *Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2018

O câncer de pele não melanoma é o mais incidente em homens nas Regiões Sul (160,08/100 mil), Sudeste (89,80/100 mil) e Centro-Oeste (69,27/100 mil). Nas demais Regiões, Nordeste (53,75/100 mil) e Norte (23,74/100 mil), encontra-se na segunda posição. Entre as mulheres, é o mais incidente em todas as Regiões do país, com um risco estimado de 97,46/100 mil na Região Sul; 95,16/100 mil na região Sudeste; 92,66/100 mil na Região Centro-Oeste; 45,59/100 mil na Região Nordeste; e 27,71/100 mil na Região Norte (INCA, 2018).

Quanto ao melanoma, sua mortalidade é elevada, porém sua incidência é baixa (2.920 casos novos em homens e 3.340 casos novos em mulheres). As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na Região Sul (INCA, 2018).

Na Paraíba, o câncer de pele não melanoma ocupa a segunda posição (Tabela 2) com maior número de casos estimados para o ano de 2018, perdendo apenas para o câncer de próstata nos homens. (INCA, 2018).

Tabela 2- Estimativa para o ano de 2018 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária*João pessoa-PB

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	1.170	59,60	51,17	180	48,58	56,52	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	880	42,32	38,84	240	57,41	49,39
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	370	17,57	14,48	80	20,36	16,76
Traqueia, Brônquio e Pulmão	200	10,38	10,56	50	14,28	16,53	170	8,21	7,27	50	11,05	10,49
Colo e Reto	140	7,04	6,73	40	10,77	12,03	180	8,51	7,29	70	16,19	13,41
Estômago	270	13,69	11,84	50	13,29	13,44	200	9,41	7,61	30	7,63	6,26
Cavidade Oral	140	7,39	7,91	30	8,90	10,52	100	4,97	3,56	20	5,05	4,00
Laringe	150	7,63	7,51	30	9,41	10,44	30	1,29	1,08	**	1,01	1,04
Bexiga	70	3,46	3,17	**	4,08	5,00	50	2,43	1,89	**	2,60	2,19
Esôfago	110	5,54	5,60	20	5,68	6,40	50	2,58	1,72	**	1,55	1,29
Ovário	-	-	-	-	-	-	90	4,48	3,81	30	6,40	5,35
Linfoma de Hodgkin	**	0,75	0,70	**	1,36	1,35	**	0,73	0,55	**	1,02	0,81
Linfoma não Hodgkin	80	4,02	3,81	20	5,60	5,85	60	3,06	2,34	20	5,67	4,28
Glândula Tireoide	60	3,04	2,08	**	3,97	3,32	210	9,94	5,88	50	12,88	7,64
Sistema Nervoso Central	100	5,36	5,61	30	7,34	8,00	90	4,49	4,34	20	5,34	4,68
Leucemias	110	5,42	4,54	30	7,24	7,45	100	4,63	4,35	20	4,87	4,36
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	100	4,70	3,89	20	5,84	4,94
Pele Melanoma	30	1,42	1,29	**	1,69	1,75	30	1,66	1,18	**	1,94	1,46
Outras Localizações	740	37,64	37,50	150	41,01	46,21	740	36,46	29,04	180	44,18	37,81
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	3.380	172,44	155,83	670	184,44	204,77	3.460	165,51	143,42	880	212,13	178,74
Pele não Melanoma	1.400	71,37	-	180	48,35	-	1.190	56,81	-	160	38,41	-
Todas as Neoplasias	4.780	243,86	-	850	233,99	-	4.650	222,43	-	1.040	250,70	-

*População padrão mundial (1960). / **Números arredondados para múltiplos de 10. / ***Número de casos menor que 20.

Fonte: INCA, 2018

1.4 Via Hedgehog

O funcionamento da via Hedgehog (HH) foi, inicialmente, descrito em estudos com *Drosophila*, porém grande parte dos componentes desta via são preservados em humanos (KOGA et al, 2008).

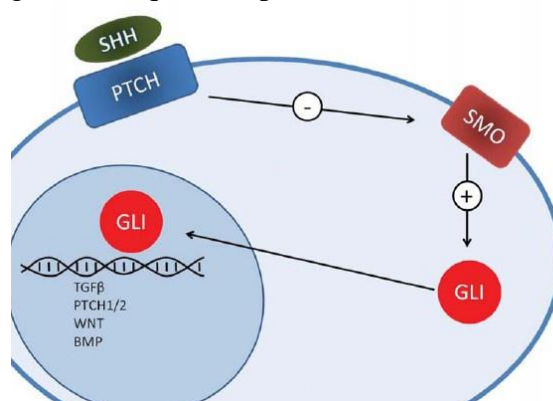
A via Hedgehog (HH) desempenha um papel de destaque no desenvolvimento embrionário de invertebrados e vertebrados, através da secreção de proteínas que controlam autocrina e paracrinamente, a proliferação e diferenciação celular (VORECHOVSKY et al, 1999).

Muitos defeitos embrionários e doenças resultam de mutações nesta via (CHANG-CLAUDE et al, 2003), de modo que a regulação temporal e espacial da sinalização SHH é a essencial para a organogênese adequada.

A família HH dos vertebrados é representada, principalmente, por 3 componentes, Desert Hedgehog (DHH), Indian hedgehog (IHH) e Sonic hedgehog (SHH), que são expressos em diferentes fases da ontogenia, em diferentes tecidos e podem ter funções biológicas distintas. Estes se ligam e inativam o receptor transmembrana Patched (PTCH). PTCH é uma proteína transmembrana de doze passagens que, em condições normais, inibe constitutivamente a proteína Smoothened (SMO). Quando o SHH se liga ao PTCH, as interações PTCH-SMO são alteradas de forma que o SMO deixa de ser reprimido, o que leva à ativação de um ou mais membros da família de fatores de transcrição GLI1, GLI2, GLI3.

Após essa ativação, as proteínas Gli são translocadas para o núcleo onde irão controlar a transcrição de genes alvo (figura 4). GLI1 representa o principal ativador dos genes- alvos da via SHH GLI3 atua, principalmente, como repressor; enquanto GLI2 pode exercer ambas funções (THOMAS ZI et al, 2011).

Figura 4- Esquema representativo da via Hedgehog



Fonte: CHINEM,2011

A caracterização das proteínas SHH, SMO e GLI1 como protooncogenes e PTCH como supressor tumoral, possui um papel importante via da oncogênese. As primeiras evidências de envolvimento da via SHH no desenvolvimento de tumores foi demonstrado em Carcinomas Basocelular (CBC) esporádicos e associados a Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide (SCBCN) (KOGA et al, 2008). Desde então, a mutação da via HH tem sido relacionada com um número crescente de tumores humanos, como câncer de próstata, estômago, sistema nervoso, pulmão, cólon, esôfago e pâncreas (RIOBO et al, 2006).

Pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual o ligante HH atua nas células cancerígenas, mas tem sido sugerido que a superexpressão de ligante HH também pode exercer papel relevante para a proliferação e sobrevivência do tumor e metástases. Sabendo-se dessa participação da via SHH no desenvolvimento e progressão tumoral, muitos estudos atualmente, analisam esta via para entender a proliferação das células tumorais, seu prognóstico e possíveis tratamentos (CHARI; MCDONNELL, 2007).

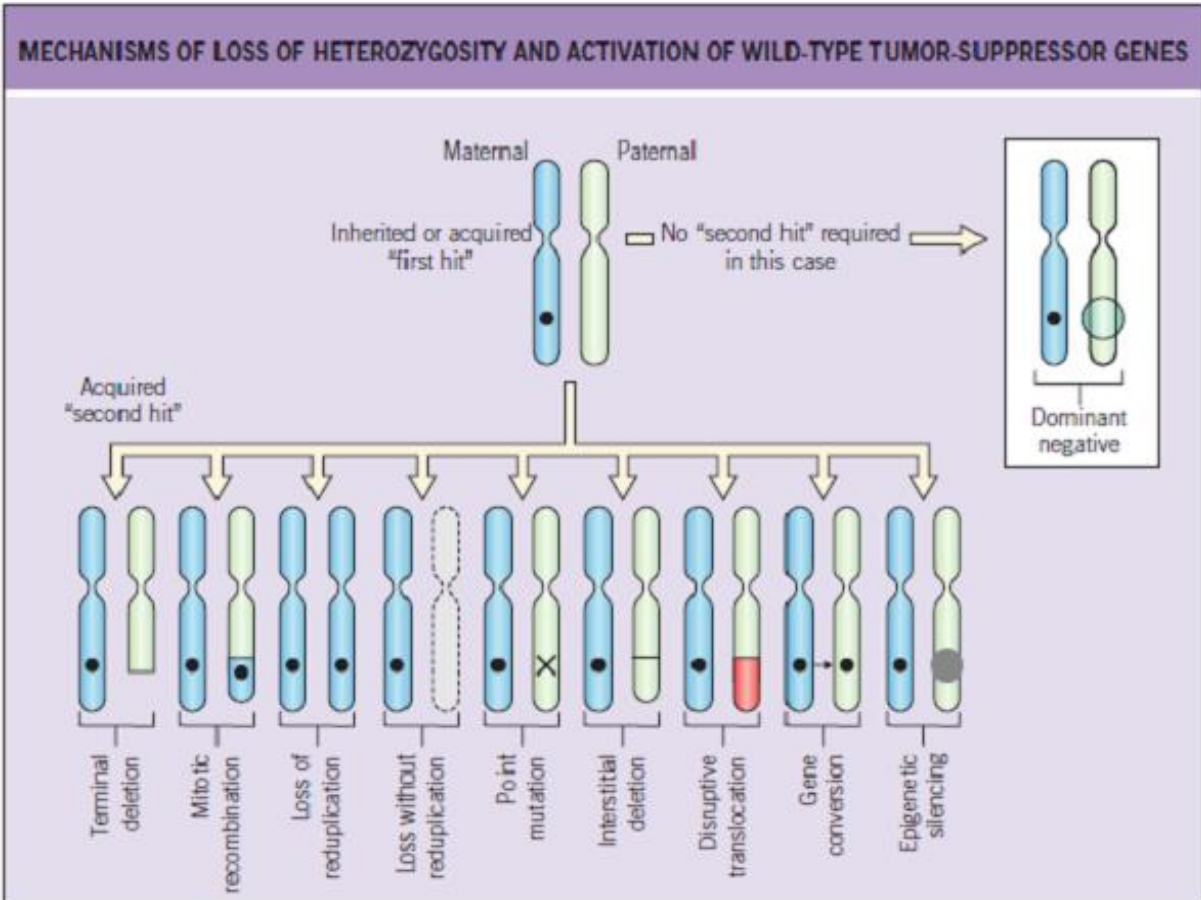
1.4.1 Gene SMO

O gene SMO codifica uma proteína chamada *smoothened* e essa proteína tem papel importante na via de sinalização hedgehog, participando do desenvolvimento embrionário que quando alterado, pode levar ao aparecimento de tumores e malformações (ATHAR et al, 2006). Normalmente essa proteína está acoplada à proteína *patched*, regulando a proliferação celular. O gene SMO pode funcionar como um oncogêneo. Mutações neste gene podem levar a uma ativação irregular da via de sinalização hedgehog com surgimento de tumores como CBCs (DAYA-GROSJEAN, 2005).

A ativação desta via ocorre pela interação do ligante SHH com o receptor transmembrânico *Patched* (Ptch). A proteína Ptch, ao ligar-se à SHH, libera a proteína transmembrana *Smoothened* (Smo) cuja atividade encontra-se previamente suprimida. Uma vez ativada, a proteína Smo altera o destino de proteínas citoplasmáticas da família *Glioma-associated oncogene* (Gli). As proteínas Gli1 e Gli2 migram para o núcleo celular, onde atuam como um ativador dos genes alvo (Shh, Ptch, Gli), enquanto a proteína Gli3 age como inibidor. O supressor de proteínas *fused* (SUFU) também tem importante papel na patogênese do CBC ao ligar-se à proteína Gli no citoplasma e no núcleo prevenindo esta de ativar os genes alvo desta cascata (WICKING, 1999; EVANGELISTA, 2006).

A inativação *Ptch1*/SMO pode ocorrer por diferentes processos: redução da dosagem genética por haploinsuficiência (perda de um alelo funcional), anulação dessa dosagem genética (uma segunda alteração age sobre a primeira e inativa os dois alelos) e o silenciamento do gene, (Figura 5) em que uma hipermetilação no gene pode causar perda de função dos alelos sem perder a carga genética (alteração epigenéticas) (MENDES, 2010).

Figura 5 – Vários mecanismos podem inativar um gene. Um mecanismo comum de silenciamento epigenético é a metilação de uma região promotora de um gene.



Fonte: Third Edition Dermatology, 2012

A proteína codificada por este gene (SMO) é um receptor acoplado à proteína G que interage com a proteína patched, um receptor para proteínas da via de sinalização hedgehog. A proteína codificada traduz os sinais para outras proteínas após a ativação por um complexo proteico hedgehog / proteína patched (OPENSTAX COLLEGE,2015).

Em humanos o gene SMO está localizado citogeneticamente na região 7q32.1; cromossomo 7, braço longo(q), na região 3, banda 2, sub-banda 1(figura 6).

Localização Molecular: pares de bases 129,188,872 a 129,213,548 no cromossomo 7 (NCBI,2018)

Os dois polimorfismos de interesse neste estudo se encontra nessa região cromossômica.

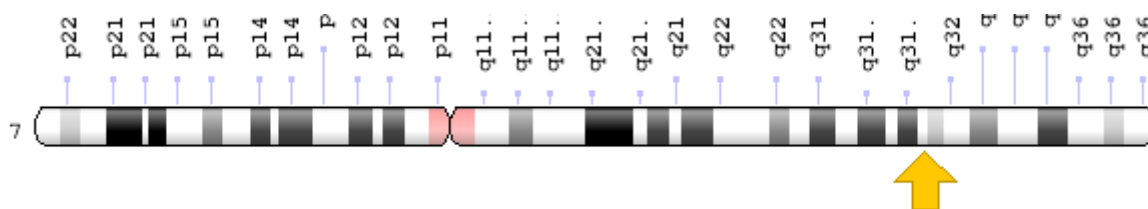


Figura 6 - Localização do gene SMO no genoma humano.

Fonte: Genome Decoration Page / NCBI

1.5 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (snp)

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) são posições únicas de pares de bases no DNA genômico com sequências de diferentes alternativas existentes em indivíduos normais de alguma população, em que o alelo menos frequente tem uma abundância de 1% ou superior (BROOKES, 1999). Isso indica que polimorfismos não são mutações pontuais, mas mutações que se estabeleceram em pelo menos 1% na população.

Conforme Brookes (1999), os SNP podem ser bi-, tri-, ou tetra-polimorfismos alélicos. No entanto, nos seres humanos, os SNP tri-alélicos e tetra-alélica são raros quase ao ponto de não existência.

A maior incidência na população sugere que um polimorfismo ocorre naturalmente, ou com um efeito neutro ou benéfico. O SNP exemplifica o polimorfismo mais comum, podendo surgir a cada 1000 pares de bases do genoma humano, e é normalmente encontrado em áreas que ladeiam genes codificadores de proteínas – regiões reconhecidas como críticas para a

ligação e regulação de microRNA a expressão do gene/proteína. Os SNPs também podem estar presentes em sequências não codificantes, íntrons, ou em regiões intergênicas. Essas variações no genoma podem ser alvo de estudo como propensas à susceptibilidade a doenças, incluindo o câncer. (KARKI et al, 2015)

O reparo do DNA é essencial para manter a estabilidade genômica e sobrevivência da célula. No entanto, polimorfismos em genes de reparo de DNA e as taxas de mutações podem resultar em diferenças individuais na atividade de reparo e estas podem ser utilizadas para prever a susceptibilidade a determinados tipos de câncer, incluindo câncer de pele (ZHANG, 2011).

A descoberta de milhões de polimorfismos genéticos no genoma do ser humano desencadeou a esperança de que essas variações nas sequências de DNA são a base das variações interindividuais e será útil para a avaliação de risco e tratamento de doenças, incluindo câncer. Se considerar que todos os genótipos de um indivíduo podem tecnicamente ser descritos e, a partir deste conhecimento, extrapolar a atividade funcional potencial, também conhecido como o fenótipo (DECORDIER et al, 2010).

De acordo com Pesz (2014), estudos de caso têm investigado a influência de vários SNPs no desenvolvimento de CBC. O mesmo autor; observa em seu estudo que um único gene de cada vez pode não revelar associações de que um SNP pode transmitir um efeito suficiente no desenvolvimento do CBC, contudo pode haver um efeito aditivo ou mais pares de SNPs que podem influenciar o risco de CBC.

Uma vez que os SNPs podem determinar o grau de diversidade genética existente em uma determinada população, estes podem ser utilizados como marcadores genéticos, com finalidade de contribuir para o prognóstico de pacientes susceptíveis a desenvolver CBC, e explicar a evolução clínica e resposta terapêutica dos indivíduos acometidos pela doença (NELSON; COX 2014)

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a Genotipagem dos SNPs do gene SMO RS769334511 e RS749414966, em amostras de Carcinoma basocelular.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a frequência alélica dos SNPs RS79334511 e RS749414966 em amostras de Carcinoma basocelular;

- Estimar a associação dos SNPs dos genes em questão à susceptibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma basocelular.

3.MATERIAL E METODOS

3.1 Aspectos éticos

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

3.2 Amostras

No presente estudo foram analisadas 100 amostras de tecido parafinado com tempo superior a cinco anos do banco de laudos expedidos pelo Laboratório UNILAB/ João Pessoa - PB, com diagnóstico histopatológico de Carcinoma Basocelular e informações sobre idade, gênero, localização do tumor e tipo histológico (**Tabela 3**). Nesse estudo foram analisadas 100 amostras para cada polimorfismo.

Tabela 3 - Dados histopatológicos das amostras de Carcinoma Basocelular

AMOSTRA	SEXO	IDAD E	LOCALIZAÇÃO DA NEOPLASIA	TIPO HISTOLÓGICO
1. CBC PB	Feminino	78	Orelha esquerda	Esclerodermiforme
2. CBC PB	Masculino	65	Região molar esquerda	Nodular ulcerado
3. CBC PB	Masculino	78	Orelha direita	Nodular ulcerado
4. CBC PB	Feminino	77	Região temporal esquerda	Superficial
5. CBC PB	Masculino	66	Orelha esquerda	Nodular ulcerado
6. CBC PB	Feminino	57	Partes Moles do Nariz à esquerda	Esclerodermiforme
7. CBC PB	Masculino	70	Partes moles da orelha direita	Nodular
8. CBC PB	Masculino	51	Ombro Direito	Nodular
9. CBC PB	Feminino	63	Dorso do nariz	Nodular
10. CBC PB	Masculino	85	Partes moles do nariz	Superficial

Continuação da tabela 3

11. CBC PB	Masculino	78	Região molar esquerda	Superficial
12. CBC PB	Masculino	78	Ponta nasal	Nodular
13. CBC PB	Masculino	53	Pálpebra inferior do olho	Nodular
14. CBC PB	Masculino	92	Região molar direita	Nodular ulcerado
15. CBC PB	Feminino	65	Orbita esquerda, canto lateral	Nodular
16. CBC PB	Feminino	58	Nariz Esquerdo	Nodular pigmentado
17. CBC PB	Feminino	58	Partes moles nariz direito	Superficial multifocal
18. CBC PB	Feminino	61	Região molar esquerdas	Superficial pigmentado
19. CBC PB	Masculino	45	Ombro direito	Superficial multifocal
20. CBC PB	Feminino	58	Sulco nasolabial esquerdo	Nodular
21. CBC PB	Feminino	58	Partes moles do nariz	Nodular
22. CBC PB	Feminino	55	Braço direito	Superficial multifocal
23. CBC PB	Feminino	80	Pescoço	Nodular
24. CBC PB	Masculino	54	Lábio superior esquerdo	Nodular
25. CBC PB	Feminino	74	Dorso nasal	Nodular
26. CBC PB	Masculino	66	Orelha esquerda	Nodular ulcerado
27. CBC PB	Feminino	78	Orelha esquerda	Nodular
28. CBC PB	Feminino	81	Partes moles do nariz	Nodular ulcerado
29. CBC PB	Masculino	78	Orelha direita	Nodular ulcerado
30. CBC PB	Feminino	74	Orelha direita	Nodular
31. CBC PB	Feminino	53	Partes moles do nariz	Basoescamoso nodular
32. CBC PB	Feminino	74	Região molar esquerda	Nodular pigmentado
33. CBC PB	Feminino	57	Região maxilar esquerda	Infiltrado tecido fibroso
34. CBC PB	Masculino	78	Joelho direito	Nodular
35. CBC PB	Masculino	53	Parede torácica	Pigmentado ulcerado

Continuação da tabela 3

36. CBC PB	Feminino	82	Partes moles do nariz a direita	Nodular pigmentado
37. CBC PB	Feminino	68	Partes moles do nariz	Nodular
38. CBC PB	Feminino	59	Orbita esquerda, canto lateral	Superficial pigmentado
39. CBC PB	Masculino	47	Nariz esquerdo	Nodular
40. CBC PB	Masculino	81	Abdome	Nodular
41. CBC PB	Masculino	77	Orelha direita	Ulcerado
42. CBC PB	Masculino	70	Nariz a direita	Nodular
43. CBC PB	Feminino	66	Região retro auricular direita	Nodular
44. CBC PB	Feminino	69	Dorso nasal	Nodular
45. CBC PB	Feminino	62	Canto medial do olho direito	Nodular, pigmentado
46. CBC PB	Feminino	71	Canto interno do olho esquerdo	Nodular
47. CBC PB	Masculino	62	Face esquerda	Nodular
48. CBC PB	Masculino	33	Região temporo-frontal	Nodular pigmentado
49. CBC PB	Masculino	36	Nariz	Nodular ulcerado
50. CBC PB	Feminino	89	Região pré-auricular	Nodular
51. CBC PB	Feminino	58	Malar esquerdo	Nodular
52. CBC PB	Feminino	77	Nariz	Nodular
53. CBC PB	Feminino	68	Mento esquerda	Nodular
54. CBC PB	Masculino	63	Região cervical	Nodular pigmentado ulcerado
55. CBC PB	Masculino	60	Região fronto-temporal	Nodular
56. CBC PB	Feminino	66	Nariz	Nodular
57. CBC PB	Masculino	88	Olho	Nodular
58. CBC PB	Masculino	88	Tórax	Nodular
59. CBC PB	Feminino	52	Ombro direito	Superficial, multifocal
60. CBC PB	Feminino	83	Nariz	Nodular

Continuação da tabela 3

61. CBC PB	Feminino	78	Temporã esquerda	Nodular
62. CBC PB	Masculino	72	Mandibular	Nodular
63. CBC PB	Masculino	62	Nariz	Esclerodermiforme
64. CBC PB	Feminino	76	Lábio superior esquerdo	Nodular
65. CBC PB	Masculino	70	Nariz	Nodular
66. CBC PB	Feminino	63	Região molar direita	Nodular pigmentado
67. CBC PB	Feminino	69	Dorso nasal	Nodular
68. CBC PB	Masculino	86	Região pré-auricular direita	Nodular
69. CBC PB	Masculino	82	Canto interno do olho direito	Nodular
70. CBC PB	Feminino	66	Sulco nasolabial direito	Nodular
71. CBC PB	Masculino	89	Região temporal direita	Nodular
72. CBC PB	Masculino	94	Pele esternal	Superficial
73. CBC PB	Feminino	74	Região infra palpebral	Nodular
74. CBC PB	Feminino	70	Asa nasal direita	Nodular ulcerado
75. CBC PB	Masculino	86	Região mandibular direita	Nodular pigmentado
76. CBC PB	Feminino	70	Zigomático	Nodular pigmentado
77. CBC PB	Masculino	94	Orelha direita	Superficial
78. CBC PB	Masculino	66	Nariz	Nodular pigmentado
79. CBC PB	Feminino	36	Dorso do nariz	Nodular
80. CBC PB	Feminino	70	Peitoral esquerdo	Nodular pigmentado
81. CBC PB	Masculino	53	Pescoço	Superficial
82. CBC PB	Feminino	69	Couro cabeludo	Nodular
83. CBC PB	Masculino	62	Nariz	Esclerodermiforme
84. CBC PB	Masculino	39	Pele fronte	Superficial
85. CBC PB	Masculino	88	Pescoço	Esclerodermiforme ulcerado

Continuação da tabela 3

86. CBC PB	Feminino	83	Peri orbitaria direita	Esclerodermiforme ulcerado
87. CBC PB	Masculino	77	Nariz	Nodular ulcerado
88. CBC PB	Feminino	72	Nariz	Nodular
89. CBC PB	Feminino	68	Malar direita	Nodular
90. CBC PB	Feminino	68	Canto do olho	Nodular
91. CBC PB	Feminino	67	Face	Nodular
92. CBC PB	Masculino	51	Pescoço	Nodular
93. CBC PB	Feminino	75	Orelha	Nodular esquerdo
94. CBC PB	Feminino	40	Lábio superior esquerdo	Nodular
95. CBC PB	Masculino	71	Orbita esquerda	Nodular
96. CBC PB	Feminino	57	Nariz	Nodular
97. CBC PB	Feminino	65	Orbita	Nodular
98. CBC PB	Masculino	64	Nariz	Superficial
99. CBC PB	Feminino	56	Malar direita	Esclerodermiforme
100. CBC PB	Feminino	78	Nariz	Nodular ulcerado

Fonte: Dados da pesquisa

3.3 Biologia Molecular

3.3.1 Extração do DNA

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

As amostras de tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA segundo Shang-Rong Shi et al (2002), utilizando-se de 5 a 8 cortes histológicos com 3µm de espessura cada. Os cortes histológicos foram adicionados em microtubos de 1,7mL e sofreram lavagens de xilol aquecido para retirada da parafina do tecido como descrito por Shang-Rong Shi et al (2002), após o processo de lavagem por xilol e amostra seca foi adicionado 1mL de tampão de Extração

(Tris/HCL 0,01M; Sacarose 0,32M; MgCl₂ 5mM; Triton X-100 1%, KCl 50mM, NP-40 0,45%; Tween 20 0,45%) e adicionados 5µL de proteinase K (10 mg/mL) e aquecidas a 55°C por 3 horas.

Decorrido este tempo, foram adicionados 1,5mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Neste novo passo, a mistura sofreu inversões suaves por aproximadamente 5 minutos para a completa homogeneização. A solução homogeneizada foi centrifugada a 3000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de centrífuga, onde foram adicionados 1,5mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Este microtubo também sofreu inversões suaves até sua homogeneização. Neste último procedimento (clorofórmio/álcool isoamílico), o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, onde foi adicionado um volume de acetato de amônio 7.5M equivalente a um terço do volume do sobrenadante.

Para precipitação do DNA foi adicionado 1ml de álcool etílico gelado e foi realizada a centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. O DNA foi desidratado em estufa a 60°C. Após a secagem o DNA foi ressuscitado em 500µl de água Milli-Q estéril.

3.3.2 Validação in Sílico

3.3.2.1 Técnica e desenho dos iniciadores

A técnica utilizada no projeto foi o método de genotipagem Didesoxi Único Alelo Específico PCR (Didesoxi single Allele-specific PCR- DSASP) desenvolvida por Lima et al (2015). Os iniciadores foram desenhados por validação in sílico com auxílio de bancos de dados e software de análise de alinhamento de sequência como: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Ensembl (<http://www.ensembl.org>), GeneRunner (<http://www.generunner.net/>).

3.3.2.2 Método Didesoxi Único Alelo Específico PCR (Didesoxi single Allele-specific PCR-DSASP)

O método DSASP se apresenta como um novo método de genotipagem e consiste em desenhar o iniciador e sequencias complementares específicos, apresenta alta sensibilidade e pode ser usada para qualquer polimorfismo de base única.

A genotipagem pelo método DSASP deve considerar as seguintes recomendações:

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

O método DSASP foi padronizado para os SNPs dos genes SMO RS769334511 e RS749414966, ver tabela 3.

Quadro 1 - Genes e seus respectivos polimorfismos, bem como a sequência dos iniciadores e sequencia complementar específica para cada polimorfismo amplificado pelo método DSASP.

Gene	SNPs	Alelos	Didesoxi	Iniciadores/ Sequências complementares
SMO	RS769334511	A/C	A	5' -GGCATAGGTGAGGACCACAAACCAAA-3' 26pb 5' -TGKGGTTTGGTTTGTGGTCCTCACCTATGCC-3' 31pb
SMO	RS749414966	T/C	T	5' -AAGTCAGGCCAGCCCGCTCCCTCT-3' 25pb 5' -GTGCCRTCCTGGAGAGGGAGCGGGGCTGGCCTGACTT-37pb

Fonte: Dados da pesquisa.

3.3.2.3 SNP rs769334511 do gene SMO

Polimorfismo de substituição de Valina para Glycina no códon 329 (Val329Gly). Abaixo segue a sequência do genoma flanqueada e a localização do polimorfismo K= G ou T (Figura 7).

Coordenadas genômicas: 129206215 (ENSEMBL, 2018).

Figura 7- Sequencia genoma de referência e o polimorfismo em destaque



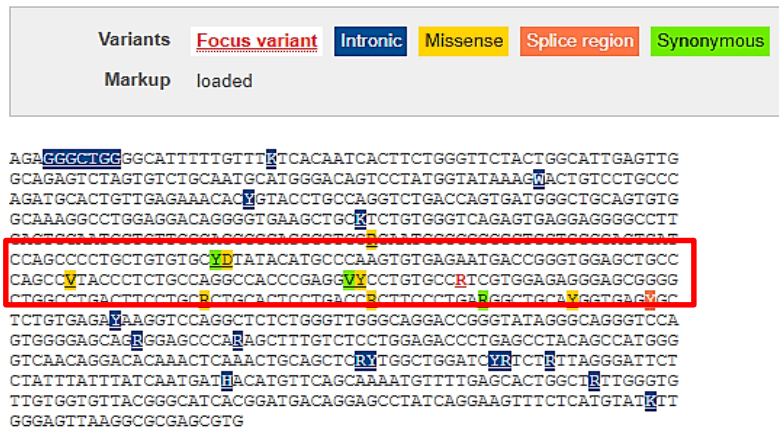
Fonte: Ensembl release 94 - October 2018 © EMBL-EBI

3.3.2.4 SNP rs749414966 do gene SMO

Polimorfismo de substituição de Valina para Glycina no códon 156 (Ile156Val). Abaixo segue a sequência do genoma flanqueada e a localização do polimorfismo R= A ou G (Figura 8).

Coordenadas genômicas: 129203518 (ENSEMBL, 2018).

Figura 8- Sequencia genoma de referência e o polimorfismo em destaque



Fonte: Ensembl release 94 - October 2018 © EMBL-EBI

3.3.2.5 O método DSASP e suas condições

As condições da PCR

A PCR foi realizada num volume final de 25µl para cada reação; contendo 200pM de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) + o didesoxinucleotídeo de interesse (ddATP, ddTTP) 4µl, 10X PCR Tampão sem Mg 3µl, cloreto de magnésio MgCl₂ 50mM 2µl, DNA concentrado a 100ng/µl 2µl, 200pM (2µl) iniciadores (Tabela 3), 1unidade (0,2µl) AmpliTaq Gold (Life Technologies - Carlsbad, CA), completando a reação com 11,82µl de água Ultra pura (ver quadro 2).

Quadro 2 - Protocolos para PCR assimétrica e amplificação dos SNPs nos gene SMO

GENE	PCR	SMO	SMO
SNPs		rs769334511	rs749414966
Preparo da Reação	H ₂ O	11,8 µl	11,8 µl
	Tampão	3 µl	3 µl
	MgCl ₂	2 µl	2 µl
	DNTP+ddNTP	4 µl	4 µl
	Iniciador	2 µl	2 µl
	Taq	1U (0,2 µl)	1U (0,2 µl)
	DNA	2µl 100ng/µl	2µl 100ng/µl
	Volume final da reação	25ul	25ul

Fonte: Oliveira, PJR 2018

As condições da PCR assimétrica foram as seguintes: uma pré-desnaturação durante 3 minutos a 94°C e 40 ciclos de 94°C durante 45 segundos de 62°C durante 30 segundos e 72°C durante 90 segundos com uma última extensão de 10 minutos a 72°C.

As condições de hibridação

O produto da amplificação por PCR de cada amostra foi submetida ao protocolo de hibridação sob as seguintes condições: 200pM da sequência complementar, a 90°C durante 01 minuto e 12°C durante 20 minutos.

Análise da Curve Melting

A análise da curva de Melting para determinação da T_m foi realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies - Carlsbad, CA), seguindo, as condições: Pré-aquecimento a partir de 25°C a 95°C durante 1 minuto, dobrando até 60°C para 5 minutos, e um aquecimento gradual (1°C por minuto) até uma temperatura de 95° C durante 5 minutos. Para análise da curva de Melting foi utilizado mistura de SYBR Green 40X e Rox 1X (Life Technologies - Carlsbad, CA).

3.4 Análise estatística

Nas amostras de Carcinoma Basocelular foram calculadas as frequências alélicas e testadas quanto ao seu equilíbrio segundo a lei de Hardy-Weinberg (HWE). Dessa forma, a lei de Hardy-Weinberg forneceu as frequências alélicas esperadas como controle.

Para verificar a distribuição dos genótipos dos polimorfismos na população estudada e a distribuição de idade, sexo, localização do tumor e tipo histológico na população de pacientes; foi utilizado o teste do Qui-Quadrado (X^2) ou, quando necessário, o teste Exato de Fisher. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Associação dos SNPs nos gene SMO com o risco de CBC

Foram analisadas 100 amostras de pacientes do Estado da Paraíba com Carcinoma Basocelular para cada polimorfismo, totalizando 200 alelos para cada SNP estudado. (Tabela 4).

Os dois polimorfismos estudados; rs769334511 e rs749414966 do gene *SMO* mostraram-se associados ao desenvolvimento de CBC nas amostras analisadas, estando ambos fora do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (χ^2)

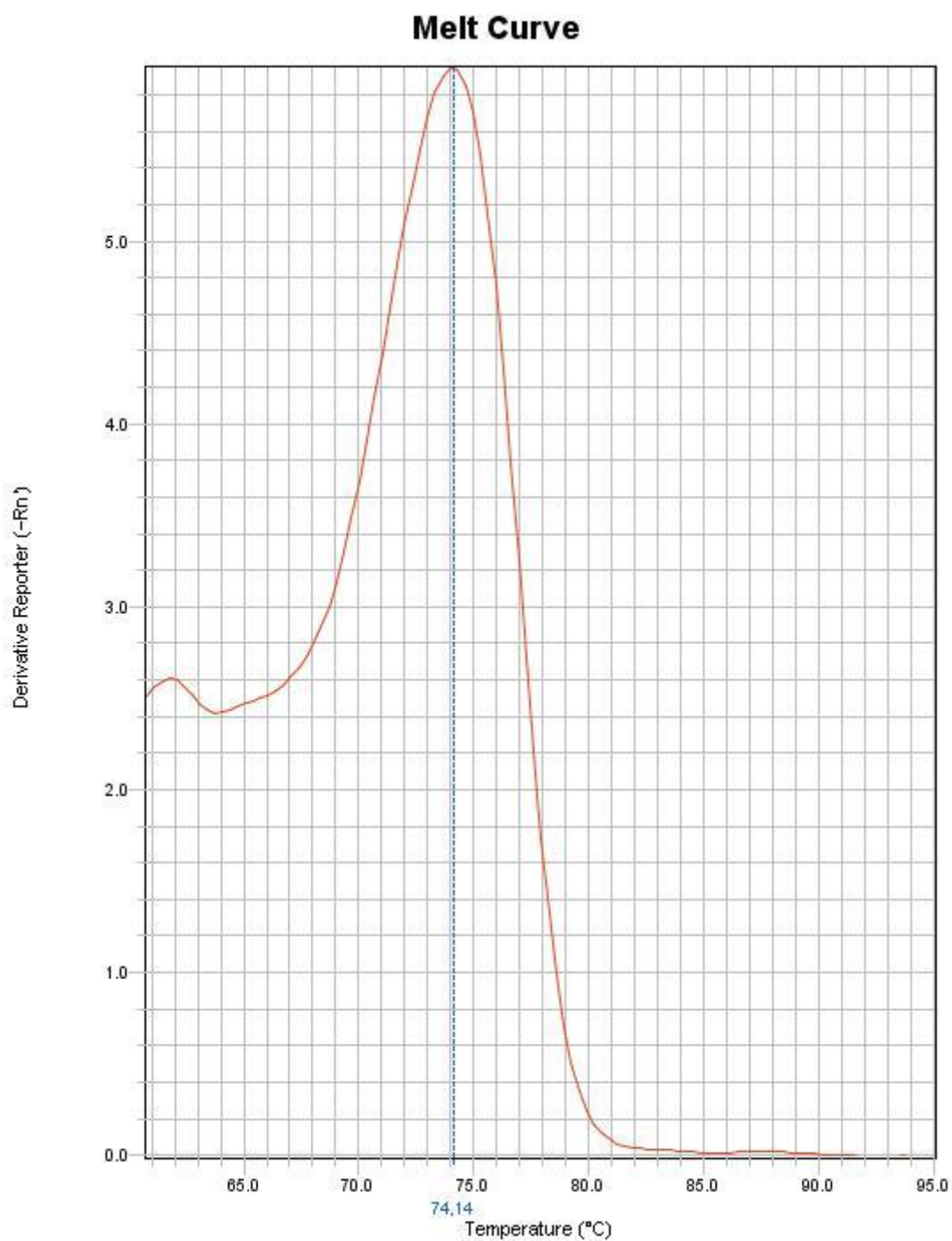
Tabela 4 - Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNP nos genes estudados.

POLIMORFISMOS	GENÓTIPOS (%)			FREQUÊNCIA ALÉLICA		χ^2	P-VALOR
	A/A	A/C	C/C	A	C		
RS769334511	43	26	32	0,55	0,45	23,11	0,0001
RS749414966	T/T	T/C	C/C	T	C		
	20	15	66	0,27	0,73	39,91	0,0001

Fonte: Oliveira PJR, 2018

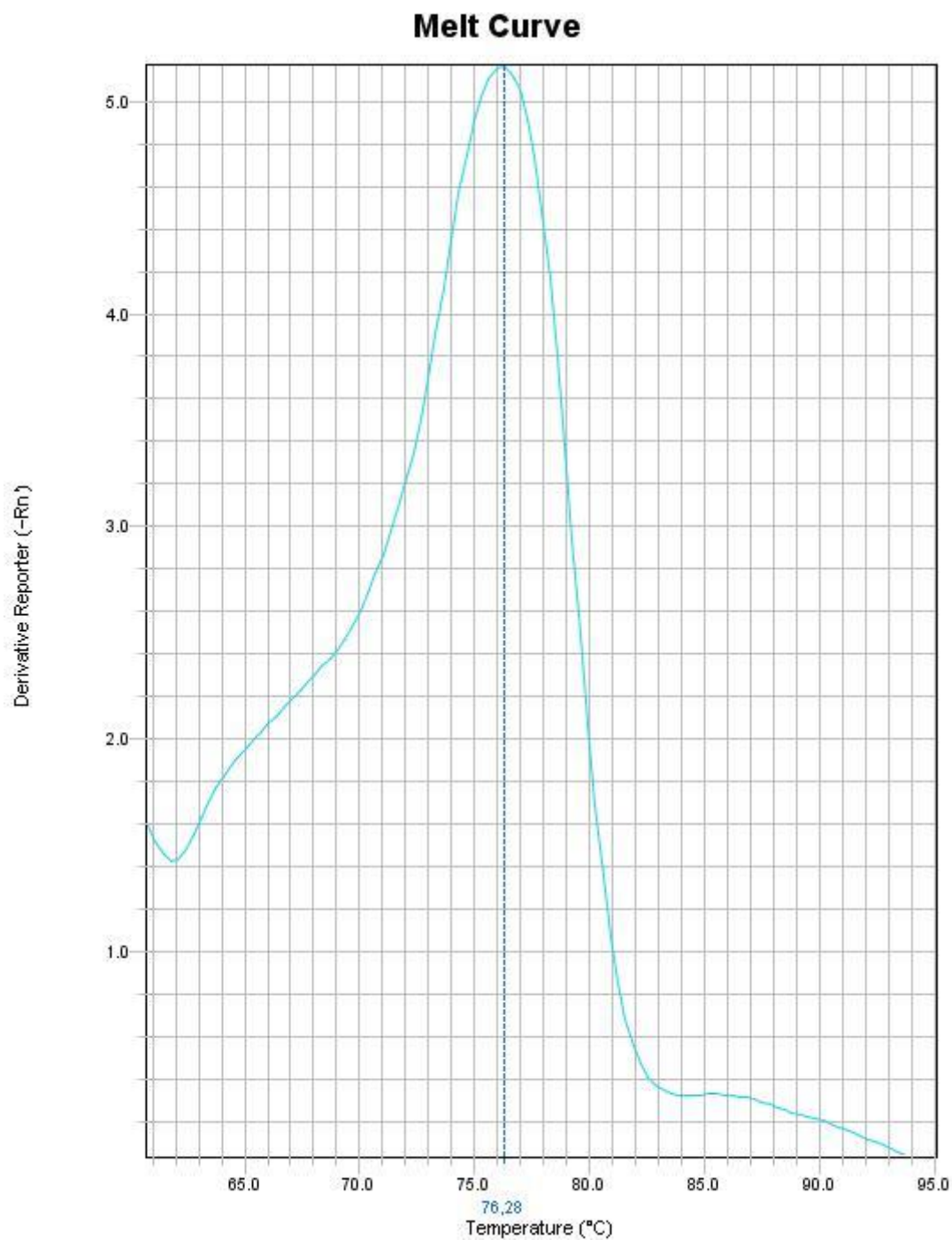
A frequência genotípica do polimorfismo rs769334511 do gene *SMO* foram as seguintes: 43% (n=43) de A/A (Val/Val/), 26% (n=26) de A/C (Val/Gly) e 32% (n=32) de C/C (Gly/Gly). As frequências genotípicas do polimorfismo rs769334511, indica que estão em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=23.11$ e $P<0,0001$); revelando uma associação com a incidência de CBC. A temperatura de Melting (T_m) observada do alelo A variou entre 72°C e 74°C, enquanto que o alelo C apresentou T_m de 75°C a 78°C (Figuras 9,10 e 11) além de apresentar ocorrência de heterozigoto. O polimorfismo rs749414966 do gene *SMO*, também apresentou-se estatisticamente em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, com uma associação significativa com o risco de desenvolvimento de CBC ($\chi^2=39,91$ e $P<0,0001$). A frequência genotípica foi: 20% (n=20) de T/T (Ile/Ile), 15% (n=15) de T/C (Ile/Val) e 66% (n=66) de C/C (Val/Val). A Temperatura de Melting observada do alelo T foi 78°C e 80°C para o alelo C; também houve ocorrência de heterozigotos. (Figuras 12, 13e 14).

Figura 9 - Curva de Melting representando o genótipo A/A do SNP rs769334511 do gene SMO.



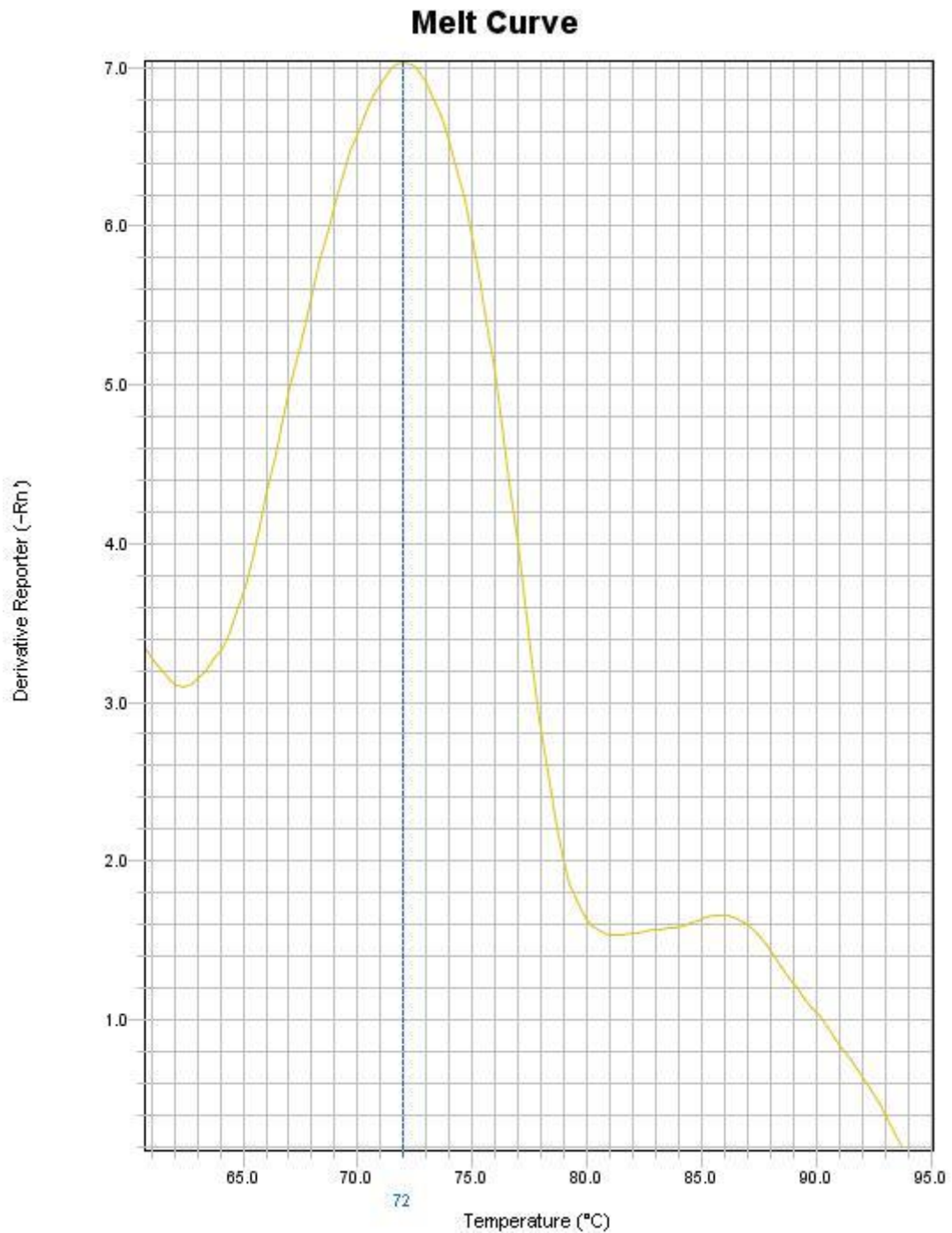
Fonte: Oliveira, PJR 2018

Figura 10 - Curva de Melting representando o genótipo C/C do SNP rs769334511 do gene SMO.



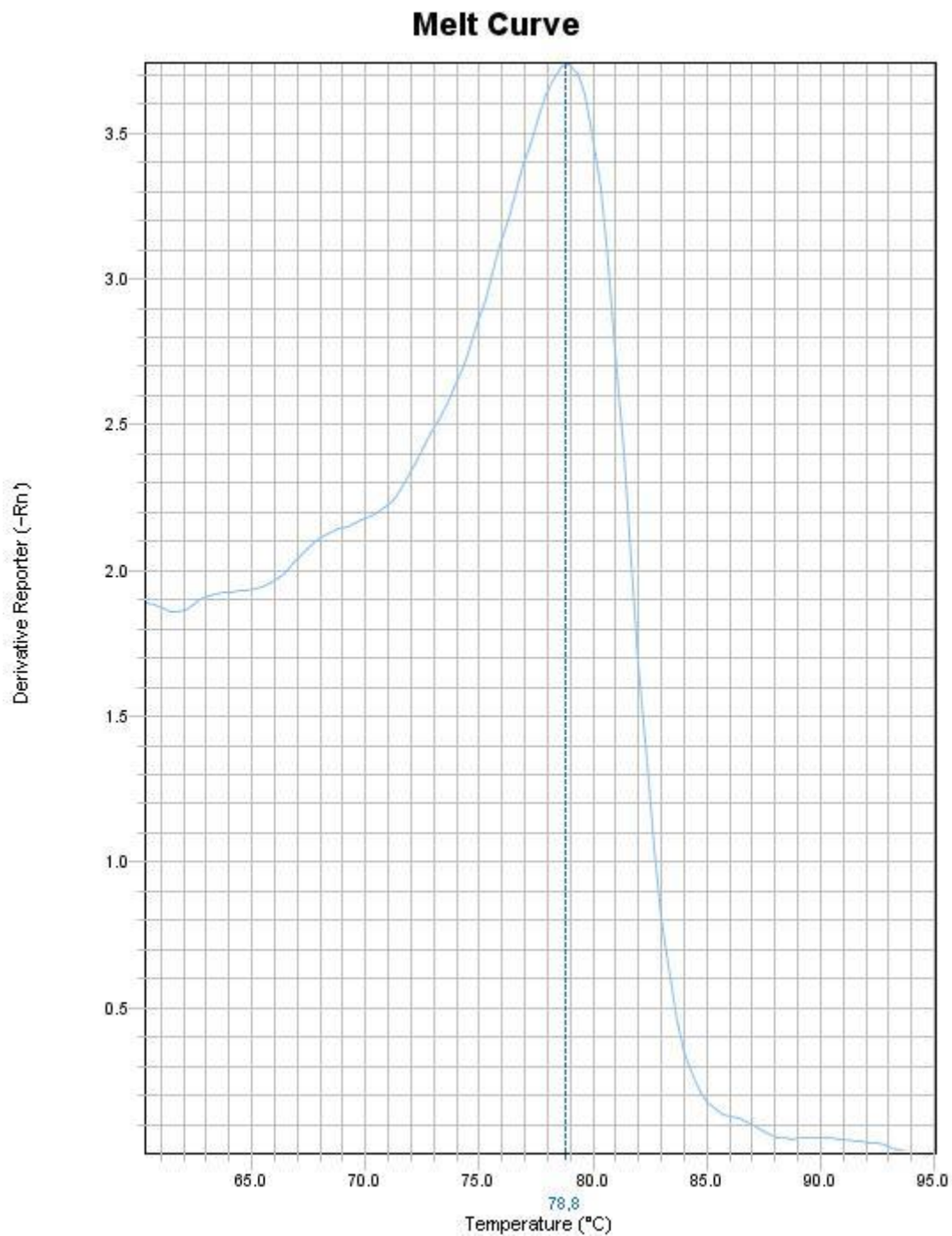
Fonte: Oliveira, PJR 2018

Figura 11- Curva de Melting representando o genótipo A/C do SNP rs769334511 do gene SMO.



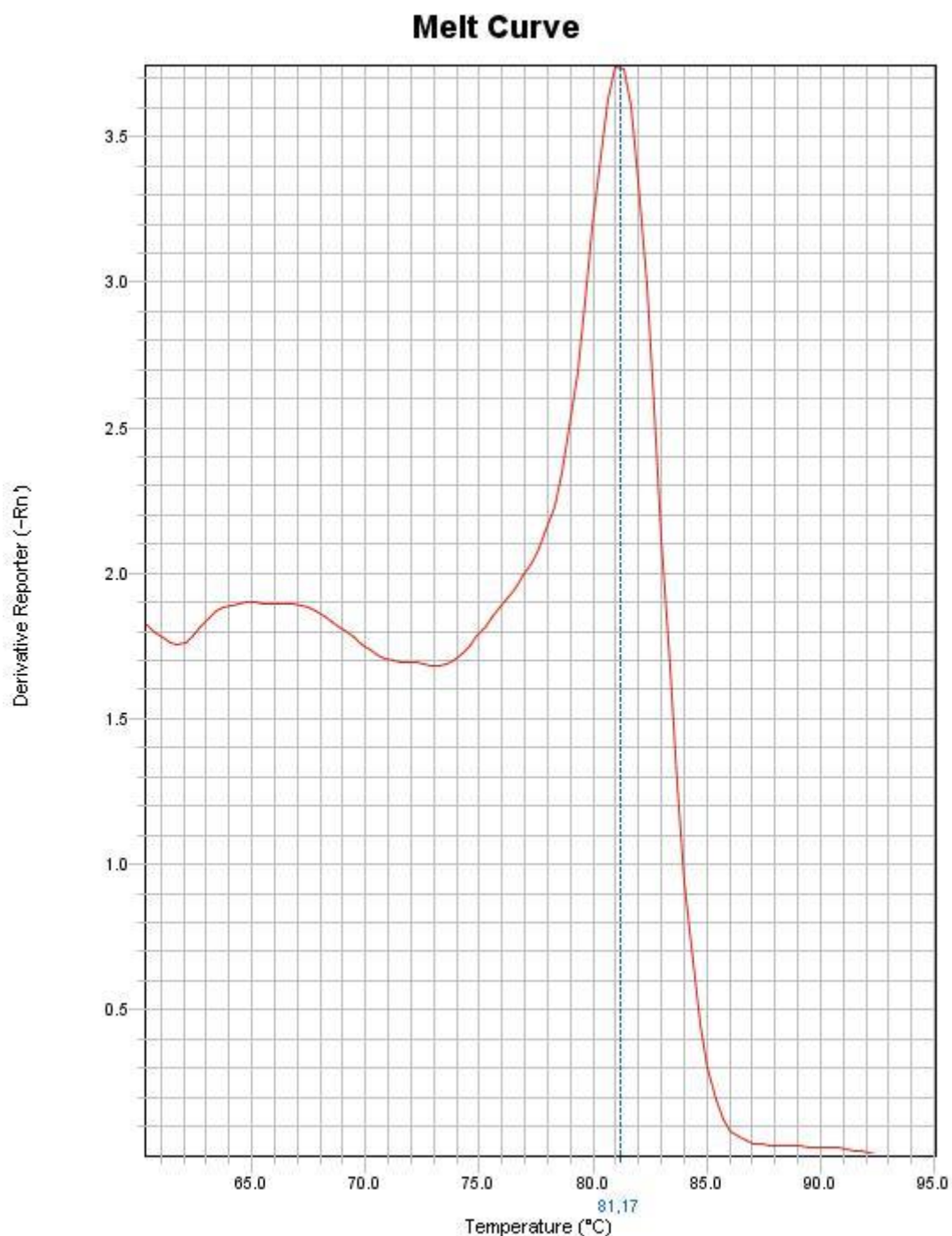
Fonte: Oliveira, PJR 2018

Figura 12 - Curva de Melting representando o genótipo T/T do SNP rs749414966 do gene SMO.



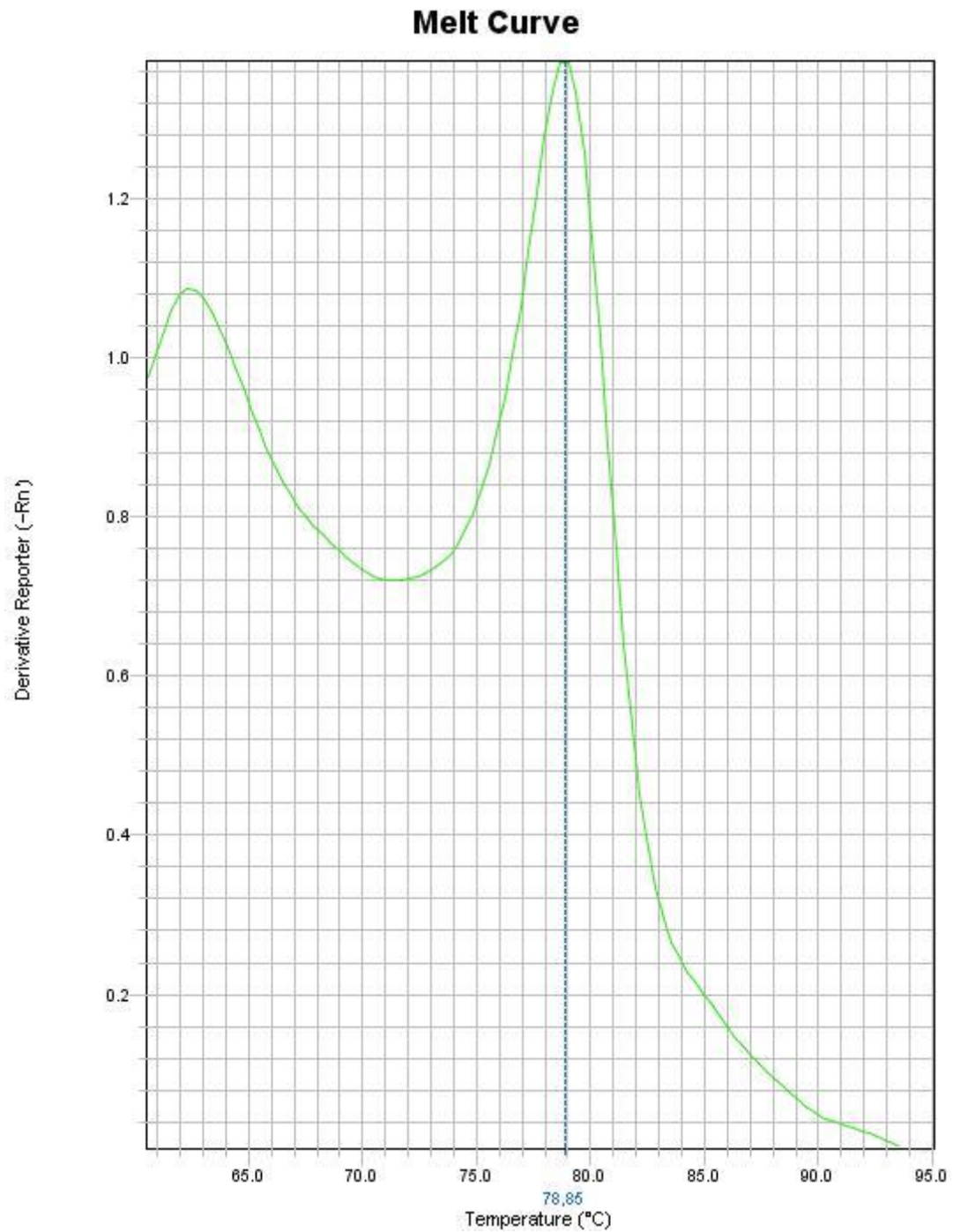
Fonte: Oliveira, PJR 2018

Figura 13 - Curva de Melting representando o genótipo C/C do SNP rs749414966 do gene SMO.



Fonte: Oliveira, PJR 2018

Figura 14 - Curva de Melting representando o genótipo T/C do SNP rs749414966 do gene SMO.



Fonte: Oliveira, PJR 2018

4.2 Dados demográficos e histopatológicos – Teste de Fisher

Quando analisada a associação dos genótipos encontrados para o SNP rs769334511 (A>C) no gene SMO e as variáveis gênero, faixa etária, localização anatômica da neoplasia e tipos histopatológicos, não foi observado significância estatística ($P>5\%$) para todas as variáveis citadas, que as relaciona-se ao CBC. (Tabela 5).

Tabela 5 - Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs769334511 (A>C) e susceptibilidade ao CBC.

SMO rs769334511 (A>C)					
Variável	Total	Genótipo	Genótipo	Genótipo	P-valor
		A/A	A/C	C/C	
Gênero	100				= 0.9668 (96,6%)
Feminino	55 (55%)	22	14	18	
Masculino	45(45%)	21	12	14	
Faixa etária					= 0.8189 (81,8%)
30-50	06(06%)	2	1	3	
51-70	52(52%)	23	12	17	
71-100	42(42%)	17	13	12	
Localização anatômica					
Cabeça e pescoço	89(89%)	39	22	28	= 0.7770 (77,7%)
Tronco	6(6%)	2	3	1	
Membros superiores	4(4%)	2	0	2	
Membros inferiores	1(1%)	0	1	0	

Tipos histopatológicos					
Nodular	64(64%)	28	20	16	= 0.5521 (55,21%)
Esclerodermiforme	7(7%)	2	2	3	
Superficial	14(14%)	6	2	6	
Infiltrante	1(1%)	0	0	1	
Ulcerado	14(!4%)	8	2	4	

Fonte: Oliveira PJR, 2018.

Em relação aos genótipos encontrados para o SNP rs749414966 (T>C) do gene SMO não foi observada significância estatística para as variáveis; gênero, faixa etária e tipo histopatológico, (P>5%). No entanto, para a variável localização anatômica, (p<5%), foi constatada significância estatística que pode indicar uma correlação com o CBC (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs749414966 (T>C) e susceptibilidade ao CBC

SMO rs749414966 (T>C)					
Variável	Total	Genótipo TT	Genótipo TC	Genótipo CC	P-valor
Gênero	100				= 0.3176 (31,76%)
Feminino	55 (55%)	8	6	41	
Masculino	45(45%)	10	8	27	
Faixa etária					= 0.9286 (92%)
30-50	06(06%)	1	0	5	
51-70	52(52%)	11	9	32	
71-90	42(42%)	7	7	28	

Continuação da tabela 6

Localização anatômica					
Cabeça e pescoço	89(89%)	16	9	64	= 0.0105 (1,05%)
Tronco	6(6%)	1	4	1	
Membros superiores	4(%)	1	1	2	
Membros inferiores	1(1%)	0	0	1	
Tipos histopatológicos					
Nodular	64(64%)	10	8	46	= 0.2893 (28%)
Esclerodermiforme	7(7%)	1	2	4	
Superficial	14(14%)	2	2	10	
Infiltrante	1(1%)	0	1	0	
Ulcerado	14(14%)	5	2	7	

Fonte: Oliveira PJR, 2018

5. DISCUSSÃO

A via Sonic Hedgehog (SHH) vem sendo associada já a bastante tempo com o diagnóstico de diversas neoplasias malignas, em especial os casos de Câncer Basocelular. Estudos *in vitro* e em modelo animal tem sugerido o potencial para tratamentos, da inibição de alvos moleculares desta via. A associação entre a via e progressão neoplásica é relativamente bem documentada para tumores de CBC, no entanto a literatura ainda é restrita sobre SNPs e sua relação com este tipo de neoplasia.

A literatura evidencia que o CBC se origina a partir de células pluripotentes imaturas da epiderme interfolicular e células presentes no revestimento exterior do folículo capilar (YOUSSEF et al., 2010). Estudos sugerem ainda que, a via de sinalização Hedgehog (HH) está ativa em diferentes compartimentos da epiderme e na expressão das citoqueratinas (ARMSTRONG & KRICKER, 2001).

Logo, a via de sinalização celular HH desempenha um papel crucial nos padrões de desenvolvimento e organogênese do tecido epitelial em estágios iniciais, bem como na sua função de reparação e manutenção (VORJASOLO & TAIPALE, 2008).

A via de sinalização HH é composta de três ligantes segregados (Sonic HH, Indian HH, e Desert HH), um receptor de regulação negativa (PTCH1), um receptor de regulação positiva (SMO), fatores oncogênicos associados com glioma (GLI), e fatores de transcrição associados a proteína SMO (Gli1, Gli2 e Gli3) (JOHNSON et al., 1996).

Quando mutações ocorrem no gene PTCH1, o seu efeito inibidor sobre a proteína SMO é perdido; mutações diretamente na SMO também inviabilizam o controle da via HH; em ambos os casos, ocorre ativação descontrolada do fator de Gli-1, que induz a transcrição de vários oncogênes envolvidos no desenvolvimento de CBC, o que resulta na proliferação descontrolada de células epiteliais, e conseqüente formação de tumor (CHINEM & MIOT, 2011).

A ativação desordenada da via de sinalização celular HH tem sido implicada em mais de 30% de todas as carcinogêneses; não apenas de câncer de pele, mas em outros canceres humanos, tais como: meduloblastomas, leucemia, pulmão, gastrointestinal, do ovário, da mama e câncer de próstata (BERMAN et al, 2003; THAYERET al, 2003; MA et al, 2005; YANAI et al, 2007; SZKANDERA et al, 2013).

Os SNPs alvos deste estudo fazem parte do gene SMO; cuja proteína é composta por uma região N-terminal extracelular CRD, seguido por um pequeno domínio de ligação LD, que então se conecta ao TMD e a um domínio intracelular C-terminal (ANEXO1) (CHEN, 2002; FRANK-KAMENETSKY, 2002; BYRNE,2016).

Foi postulado recentemente que o colesterol ocupa uma posição central nesta via, interagindo com os três domínios SMO (o CRD, domínio de ligação DL e TMD; e adota uma extensa conformação com o seu anel de esterol tetracíclico, se ligando a um sulco superficial no CRD, um sítio anteriormente conhecido por ligar somente a proteína patched1 ao receptor SMO (NACHTERGAELE, 2013; MYERS, 2013).

Em 2012, a Food and Drug Administration (FDA) autorizou a comercialização do medicamento Vismodegib para o tratamento de CBCs metastáticos e CBC avançado inoperável. O Vismodegib é considerado o primeiro medicamento sistêmico para o tratamento de CBC, cujo mecanismo de ação é a inibição da via de sinalização celular HH (CIRRONE & HARRIS, 2012).

O local de ligação ao esterol do SMO é predominantemente revestido com resíduos hidrofóbicos do CRD, que estabilizam o colesterol. Mutações em vários destes resíduos neste local (Leu108, Trp109, Pro164 e Phe166) foram observadas prejudicando a sinalização dirigida pela patch1 ao SMO; o medicamento vismodegib atua restaurando este mecanismo de comunicação/interação estrutural que era anteriormente observada. (BYRNE et al, 2016).

Este medicamento é um inibidor de baixo peso molecular da via Hedgehog. A sinalização da via Hedgehog através da proteína transmembrana Smoothened (SMO) leva à ativação e localização nuclear de fatores de transcrição do oncogene associado ao glioma (GLI) e indução de genes alvo de Hedgehog. Muitos desses genes estão envolvidos na proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. O Vismodegib se liga e inibe a proteína SMO, impedindo a transdução do sinal da via Hedgehog.

Uma vez que estes tumores apresentam grande variabilidade na morfologia, agressividade e respostas aos tratamentos. A integração de dados genéticos com características ambientais, clínicas e patológicas de tumores pode melhorar o sistema de classificação do CBC, o qual vai mudar definitivamente algoritmos de diagnóstico e tratamentos (PELLEGRINI et AL, 2017).

Mecanismos genéticos que envolvem os genes supressores de tumor e protooncogenes têm sido implicados na patogênese do CBC, incluindo alterações moleculares nos genes chave da via de sinalização celular HH, o PTCH1 e gene SMO (CHINEM & MIOT, 2011).

A primeira associação entre a ativação da via de sinalização celular HH, e câncer de pele não-melanoma foi estabelecida por meio de mutações no gene PTCH1 observados em pacientes com a síndrome de Gorlin (Síndrome SNCBC) (HAHN et al, 1996).

Estudos sugere m que o principal mecanismo molecular envolvido na carcinogênese do CBC, alterando os genes da via de sinalização celular HH é o mecanismo genético, especialmente mutações missense, e variantes genéticas (JORGENSEN et al, 2012; OTSUKA et al, 2015).

Mutações de ativação do gene SMO foram encontrados em 10 a 20% de CBCs esporádicos e são representados principalmente por alterações no códon trp535leu (rs121918347) localizado no cromossomo 7, uma mutação missense, onde ocorre a substituição da base G por T, levando a formação de um códon que codifica um aminoácido diferente do original. (DAYA-GROSJEAN & COUVÉ-PRIVAT, 2005; JAYARAMAN et al, 2014;).

Ambos os polimorfismos deste estudo são mutações “missense”; onde ocorre uma alteração de uma das bases do DNA, de tal forma que o tripleto de nucleotídeos da qual ela faz parte se altera, passando a codificar um aminoácido incorreto (diferente do que seria esperado na posição correspondente da proteína). Isto pode alterar a função da proteína em maior ou menor grau, dependendo da localização e da importância desse aminoácido em particular.

Mutações que alteram bases do DNA, de tal forma que o tripleto de nucleotídeos alterado leve a uma mudança de aminoácido, podem ter por vezes pouca ou nenhuma repercussão na função da proteína. Isoladamente podem levar a uma redução da função da proteína em questão mas, por si só, não são suficientes para causar doença. No entanto, podem ser fatores de risco quando se juntam mais do que um na mesma proteína. Um exemplo paradigmático em relação aos polimorfismos é a já citada mutação rs121918347, presente em praticamente todos os casos de CBC (DAYA-GROSJEAN & COUVÉ-PRIVAT, 2005).

Quanto a estatística deste estudo; foi encontrada associação entre o polimorfismo rs769334511 (SMO) com o diagnóstico de CBC. Segundo as análises, os genótipos para os alelos A e T estão em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2= 23,11$ e $P<0,5$). Além disso estudos onde uma mutação foi induzida (Val329Phe) na proteína SMO; no mesmo códon do polimorfismo rs769334511 (Val329Gly), provocou uma inativação na região de interação/ligação do colesterol com a proteína (BYRNE, 2016), uma região muito estudada devido a falhas que levam a inativação desta proteína, levando a perda de sua capacidade de parada; o que acarreta muitas vezes em CBC.

Para o SNP rs749414966 (SMO), 156(Ile156Val), os resultados sugerem que ocorreu associação estatística significativa, com um alto desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2=39,91$ e $P<0,005$) entre esse polimorfismo e a susceptibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma Basocelular. Este polimorfismo se encontra também em uma região muito crítica de interação entre o colesterol e a proteína SMO, podendo estar associado ao desenvolvimento de CBC.

As variáveis clínicas histopatológicas do trabalho, corroboram com os dados do INCA (2018), no qual as mulheres são mais afetadas pelo CBC do que os homens.

Os registros da literatura indicam ainda que as mulheres têm apresentado tumores em idades mais precoces (REINAU et al., 2014; ARNSPANG Et al., 2015), o que pode ser justificado, de um modo geral, pelo aumento da exposição solar pelas mulheres (WU et al., 2013).

O encontro do comprometimento das faixas etárias mais avançadas, a partir dos 50 anos, está em plena consonância com a literatura; (SCHÄFER et al, 2014), apenas 6% da nossa amostra de indivíduos estavam abaixo de 50 anos.

Nossos resultados evidenciaram expressivo predomínio topográfico do segmento cefálico (89%), comparado a outras regiões anatômicas, o que é corroborado por inúmeros registros na literatura e estabelece a forte relação com áreas de exposição à radiação ultravioleta (UV) (JURCIUKONYTE et al., 2013; STOICA et al., 2009; WEHNER et al., 2015), e a distribuição anatômica do CBC é consistente com os níveis de exposição solar das áreas do corpo (RICHMOND-SINCLAIR et al. 2009).

Portanto, a determinação de mutações polimórficas no gene SMO da via de sinalização celular HH , e o impacto destas mutações quanto ao funcionamento da via, permitem hipoteticamente estabelecer neste estudo, os SNPs rs769334511 e rs749414966 como marcadores moleculares preditivos do desenvolvimento de CBC; e também como marcadores moleculares para orientação nas intervenções terapêuticas, que têm como alvo o gene SMO; uma vez que podem servir de indicadores de uma resposta positiva ou não ao tratamento administrado, especialmente no uso do medicamento vismodegib; pode-se evitar assim, a imposição de efeitos colaterais desagradáveis aos pacientes, além é claro do desperdício de caros recursos e tempo, ampliando em muito as estratégias para o tratamento de CBC.

6. CONCLUSÃO

Foi realizada a genotipagem dos SNPs dos gene SMO rs769334511 e rs749414966; bem como sua frequência alélica.

Ocorreram significativa associação estatística entre o polimorfismo rs769334511 e rs749414966 do gene SMO; e o desenvolvimento de Carcinoma Basocelular nas amostras analisadas.

Os resultados sugerem uma possível aplicação dos SNPs estudados, como possíveis marcadores moleculares, para uso específico de drogas antitumorais de CBC; especialmente do polimorfismo rs769334511

O estudo revelou ainda significância estatística entre os genótipos do SNP rs749414966 do gene SMO, e a localização anatômica dos tumores nas amostras estudadas; indicando uma possibilidade deste polimorfismo estar associado ao CBC, em diversas partes do corpo.

A compreensão da estatística e mecanismos genéticos que associam os SNPs deste estudo a carcinogênese do CBC, e outros canceres ainda; é promissor, por conseguinte, mais estudos; com amostragens maiores devem ser levados a cabo com o objetivo de verificar se a hipótese se comprova ou se trata apenas de um mero erro amostral.

7. REFERENCIAS

- ABULAFIA J (1963). [Cutaneous epithelioma. Attempted histogenetic classification]. **An Bras Dermatol**, 38, 14-31.
- ALMEIDA, A. C. C. (et al). Frequência do carcinoma basocelular na população menor de 50 anos: estudo do serviço e revisão da literatura. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, 2009; 84(6):692-4.
- AMATO, I. <https://emaze.me/>. Disponível em: <https://emaze.me/g.ivan.amato.anatomiaumana.#Apparato%20Tegumentario>. Acesso em 23 nov. 2018
- ARMSTRONG BK, KRICKER A (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. **J Photochem Photobiol**, 63, 8-18.
- ARNSPANG S, POTTEGÅRD A, FRIIS S, CLEMMENSEN O, ANDERSEN KE, HALLAS J, et al. Statin use and risk of nonmelanoma skin cancer: a nationwide study in Denmark. **Br J Cancer**. 2015;112:153-6.
- ATHAR M, TANG X, LEE JL, KOPELOVICH L, KIM AL. Hedgehog signalling in skin development and cancer. **Exp Dermatol**. 2006;15(9):667-77.
- BERMAN DM, KARHADKAR SS, MAITRA A, et al (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. **Nature**, 425, 846–851. doi: 10.1038/nature01972
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene** 234 (1999) 177–186, May 1999.
- C, SMYTH I, BALE A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. **Oncogene**. 1999;18(55):7844–51.
- CHAFFER CL, WEINBERG RA (2011). A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, 331, 1559-64. doi: 10.1126/science.1203543
- CHANG-CLAUDE J1, DUNNING A, SCHNITZBAUER U, GALMBACHER P, TEE L, WJST M, CHALMERS J, ZEMZOU M, HARBECK N, PHAROAH PD, HAHN H. The patched polymorphism Pro1315Leu (C3944T) may modulate the association between use of oral contraceptives and breast cancer risk. **Int. J. Cancer**: 103, 779 –783 (2003)

CHARINS, MCDONNELL TJ. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. **Adv Anat Pathol**. 2007;14(5):344-52.

CHEN, J. K., TAIPALE, J., YOUNG, K. E., MAITI, T. & BEACHY, P. A. Small molecule modulation of Smoothed activity. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 99, 14071–14076 (2002).

CHINEM VP, MIOT HÁ (2011). Epidemiology of basal cell carcinoma. **An Bras Dermatol**, **86**, 292-305.

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

CIRRONE F, HARRIS CS (2012). Vismodegib and the hedgehog pathway: a new treatment for basal cell carcinoma. **Clin Ther**, **34**, 2039-2050. doi: 10.1016/j.clinthera.2012.08.011

CLOUGH GORR KM, TITUS ERNSTOFF L, PERRY AE, SPENCER SK, ERNSTOFF MS. Exposure to sunlamps, tanning beds, and melanoma risk. **Cancer Causes Control** 2008; 19: 659–69. <http://dx.doi.org/10.1007/s10552-008-9129-6> PMID:18273687

CRAYTHORNE, E., & AL-NIAMI, F. (2017). Skin cancer. **Medicine**, 45(7), 431–434. doi:10.1016/j.mpmed.2017.04.003

DAYA-GROSJEAN, LEELA & COUVÉ-PRIVAT, SOPHIE. (2005). Daya-Grosjean L. Sonic Hedgehog signaling in basal cell carcinomas. **Cancer Lett** 225: 181-192. *Cancer letters*. 225. 181-92. 10.1016/j.canlet.2004.10.003.

DECORDIER, I. (et al). Phenotyping for DNA repair capacity. **Mutation Research** 705 (2010) 107–129.

DISEASEFIX. Disponível em: <https://www.diseasefix.com/graphics/skin-cancer/115/1/>. Acesso em 23 nov. 2018.

EINSPHR JANINE G, STEVEN P STRATTON, G TIMOTHY BOWDEN, DAVID S ALBERTS. Chemoprevention of human skin cancer. **Critical Reviews in Oncology / Hematology** 2002; 41: 269–85. [http://dx.doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00185-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00185-8)

ENSEMBL. Genoma de referência que flanqueia a localização do SNP

RS769334511. Disponível em http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Sequence?db=core;r=7:129205715129206715;v=rs769334511;vdb=variation;vf=423437251
Acessado em: 23 Nov. de 2018.

ENSEMBL. Genoma de referência que flanqueia a localização do SNP
RS749414966. Disponível em http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=7:129203018-129204018;v=rs749414966;vdb=variation;vf=422426059
Acessado em: 23 Nov. de 2018.

ERIVEDGE®: Vismodegib. Rio de Janeiro: **Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos**
S.A. Farm. Resp.: Tatiana Tsiomis Díaz - CRF-RJ nº 6942. Bula de remédio. Disponível
em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmResultado.asp

EVANGELISTA M, TIAN H, DE SAUVAGE FJ. The Hedgehog Signaling Pathway in
Cancer for molecular oriented treatment - **An overview. Oral Oncol.** 2010;46(1):19-24

FRANK-KAMENETSKY, M. ET AL. Small-molecule modulators of Hedgehog
signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. **J.
Biol.** 1,10 (2002).

GREENLEE RT, MURRAY T, BOLDEN S, WINGO PA. Cancer statistics, **CA Cancer
J Clin** 2000; 50: 7–33. <http://dx.doi.org/10.3322/canjclin.50.1.7> PMID:10735013

HAHN H, WICKING C, ZAPHIROPOULOS PG, et al (1996). Mutations of the Human
Homolog of Drosophila patched in the Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome. **Cell**, **85**,
841–851. doi:10.1016/s0092-8674(00)81268-4

HOBAN, P.R.; RAMACHANDRAN, S; STRANGE, R.C. Environment, Phenotype and
Genetics: Risk Factors Associated with BCC of the Skin. **Expert Review of anticancer
Therapy**, v.2, n. 5, p.570-579, 2002.

I.VORECHOVSKY, K.P. BENEDIKTSSON, R. TOFTGARD The
patched/hedgehog/smoothed signalling pathway in human breast cancer: no evidence
for H133Y SHH, PTCH and SMO mutations. **Eur. J. Cancer**, **35** (1999), pp. 711-713

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **ABC do câncer: abordagens básicas
para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer.** – Rio de Janeiro: Inca, 2011.

128 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer.** – Rio de Janeiro: Inca, 2018.

JAYARAMAN SS, RAYHAN DJ, HAZANY S, et al (2014). Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. *J. Investig. Dermatol*, **134**, 213–220.

JOHNSON RL, ROTHMAN AL, XIE J, et al (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*, **272**, 1668–71. doi: 10.1126/science.272.5268.1668

JOHNSON TM, DOLAN OM, HAMILTON TA, LU MC, SWANSON NA, LOWE L. Clinical and histologic trends of melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1998;38: 681–6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622\(98\)70196-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622(98)70196-3)

JORGENSEN TJ, RUCZINSKI I, YAO SHUGART Y, et al (2012). A population-based study of hedgehog pathway gene variants in relation to the dual risk of basal cell carcinoma plus another cancer. *Cancer Epidemiology*, **36**, e288–e293. doi:10.1016/j.canep.2012.05.001

JURCIUKONYTE R, VINCERZEVSKIENE I, KRILAVICIUTE A, BYLAITE M AND SMAILYTE G. Epidemiology of basal cell carcinoma in Lithuania, 1996-2010. *British Journal of Dermatology*. 2013;169:1100-5.

KARKI, R. (et al). Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics*, 2015; 8:37 DOI 10.1186/s12920-015-0115-z.

KNUDSON JR, A. G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, vol. 68, No. 4, p. 820-823, April 1971.

KOGA K, NAKAMURA M, NAKASHIMA H, AKIYOSHI T, KUBO M, SATO N, ET AL. Novel link between estrogen receptor alpha and hedgehog pathway in breast cancer. *Anticancer research*. 2008 Mar-Apr; 28(2A):731-40.

KOSINIAK-KAMYSZ A, POŚPIECH E, WOJAS-PELC A, et al (2012). Potential association of single nucleotide polymorphisms in pigmentation genes with the development of basal cell carcinoma. *J Dermatol*, **39**, 693-8. doi: 10.1111/j.1346-

8138.2012.01559.

KOSINIAK-KAMYSZ, A. et al. Potential association of single nucleotide polymorphisms in pigmentation genes with the development of Basal Cell Carcinoma. **Journal of Dermatology**, 39: 693–698, 2012.

LEITER U, GARBE C. Epidemiology of melanoma and non melanoma skin cancer: the role of sunlight. **Adv Exp Med Biol** 2008; 624: 89–103. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-77574-6_8 PMID:18348450

LIMA, Eleonidas Moura et al. Dideoxy single allele-specific PCR - DSASP new method to discrimination allelic. **Braz. arch. biol. technol**, Curitiba, v. 58, n. 3, p. 414-420, June 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201500434>.

MA X, CHEN K, HUANG S, et al (2005). Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. **Carcinogenesis**, **26**, 1698-705. doi: 10.1093/carcin/bgi130

MENDES RA, CARVALHO JF, VAN DER WAAL I Biological pathways involved in the aggressive behavior of the keratocystic odontogenic tumor and possible implications for molecular oriented treatment - **An overview. Oral Oncol.** 2010;46(1):19-

MILLIE D LONG, HANS H HERFARTH, CLARE A PIPKIN, CAROL Q PORTER, ROBERT S SANDLER AND MICHAEL D KAPPELMAN. Increased Risk for NonMelanoma Skin Cancer in Patients With Inflammatory Bowel Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology** 2010;8:268–274
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2009.11.024> Pid:20005977 PMCID:PMC2838486

MYERS, B. R. ET al. Hedgehog pathway modulation by multiple lipid binding sites on the smoothed effector of signal response. **Dev. Cell** 26,346–357 (2013).

NACHTERGAELE, S. ET al. Structure and function of the Smoothed extracellular domain in vertebrate Hedgehog signaling. **eLife** **2**, e01340 (2013).

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: **Artmed**, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OPENSTAX COLLEGE. (2015). Signaling molecules and cellular receptors. Houston,

TX: **OpenStax CNX**. Obtido de <http://cnx.org/contents/185cbf87-c72e-48f5-b51e-f14f21b5eabd@9.85>.

OTSUKA A, LEVESQUE MP, DUMMER R, et al (2015). Hedgehog signaling in Basal Cell Carcinoma. *Japanese Society for Investigative Dermatology*, **78**, 95–100. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.02.007

PELLEGRINI C, MATURO M, DI NARDO L, et al (2017). Understanding the Molecular Genetics of Basal Cell Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, 2485. doi:10.3390/ijms18112485

PESZ, K. A. et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and basal cell carcinoma of the skin. *International Journal of Dermatology*, **53**, 1474–1477, 2014.

REINAU D, SURBER C, JICK SS, MEIER CR. Epidemiology of basal cell carcinoma in the United Kingdom: incidence, lifestyle factors, and comorbidities. *Br J Cancer*. 2014;111:203-6.

RICHMOND-SINCLAIR NM, et al. Incidence of basal cell carcinoma multiplicity and detailed anatomic distribution: longitudinal study of an Australian population. *J Invest Dermatol*. 2009;129:323-8

RIOBO NA, LU K, EMERSON CP, JR. Hedgehog signal transduction: signal integration and cross talk in development and cancer. *Cell cycle*. 2006 Aug;5(15):16125.

ROSARIO EMANUELE PERROTTA, MARIA GIORDANO, MARIANO MALAGUARNERA. Non-melanoma skin cancers in elderly patients. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* **2011**; 80: 474–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.04.011> PMID:21602051

RÜDIGER GREINERT, MATHIEU BONIOL. Skin cancer e Primary and secondary prevention (information campaigns and screening) -With a focus on children and sun beds. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2011; 107: 473-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2011.08.008> PMID:21906618

SALADI RN, PERSAUD AN. The causes of skin cancer: a comprehensive review. *Drugs Today (Barc)* 2005; 41(1): 37-53. <http://dx.doi.org/10.1358/dot.2005.41.1.875777> PMID:15753968

SAMARASINGHE V, MADAN V, LEAR JT (2011). Focus on Basal cell carcinoma. *J Skin Cancer*, 328615. doi: 10.1155/2011/328615.

SCHÄFER I, REUSCH M, SIEBERT J, SPEHR C, AUGUSTIN M. Health care characteristics of basal cell carcinoma in Germany: the role of insurance status and socio-demographic factors. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014;12:803-11

SHAHEEL CHUMMUN, NEIL R MCLEAN. Management of malignant skincancers. *Surgery (Oxford)*; 29(10): 529-33. 2011

SHANG-RONG S.; COTEL, R.J; WU, L.; LIU, C.; DATAR, R.; SHI, Y.; LIU, D.; LIM, H.; patched/hedgehog/smoothened signalling pathway in human breast cancer: no evidence for H133Y SHH, PTCH and SMO mutations. *European journal of cancer*. 1999 May; 35(5):7113.

SINEAD KEENEY, HUGH MCKENNA, PAUL FLEMING, SONJA MCILFATRICK. Attitudes, knowledge and behaviors with regard to skin cancer: A literature review. *European Journal of Oncology Nursing* 2009; 13: 29– 35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejon.2008.11.004> PMID:19153059

STOICA LE, GEORGESCU CV, PĂTRAȘCU V, RADU CC, TOLEA I, MOGOANTĂ L. Basal cell carcinomas - clinical-evolutional and histopathologic aspects. *Curr Health Sci J*. 2009;35:228-33.

SZKANDERA J, KIESSLICH T, HAYBAECK J, et al (2013). Hedgehog signaling pathway in ovarian cancer. *Int J Mol Sci*, 14, 1179-96. doi: 10.3390/ijms14011179

TAYLOR, C.R. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *The Journal of Histochemistry e Cytochemistry*. Thousand Oaks, CA. 50(8): 1005-1011, 2002.

THAYER SP, DI MAGLIANO MP, HEISER PW, et al (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, 425, 851-856. doi: 10.1038/nature02009

THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER WORKING

GROUP ON ARTIFICIAL ULTRAVIOLET (UV) LIGHT AND SKIN CANCER. The association of use of sun beds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: a systematic review. **Int J Cancer** 2007; 120: 1116-22. PMID:17131335

THOMAS ZI, GIBSON W, SEXTON JZ, AIRD KM, INGRAM SM, ALDRICH A, ET AL. Targeting GLI1 expression in human inflammatory breast cancer cells enhances apoptosis and attenuates migration. **British journal of cancer**. 2011 May 10; 104(10):1575- 86.

VARJOSALO M, TAIPALE J (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. **Genes Dev**, 22, 2454-72. doi: 10.1101/gad.1693608

VEIEROD MB, ADAMI HO, LUND E, ARMSTRONG BK, Weiderpass E. Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigmentary characteristics, and nevi. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2010;

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

WEHNER MR, LINOS E, PARVATANENI R, STUART SE, BOSCARDIN WJ, CHREN MM. Timing of subsequent new tumors in patients who present with basal cell carcinoma or cutaneous squamous cell carcinoma. **JAMA Dermatol**. 2015;151:382-8.

WEINBERG, Robert A. (et al). *A biologia do câncer*. – Porto Alegre: **Artmed**, 2008. 864p.

WIECKER TS, LUTHER H, BUETTNER P, BAUER J, GARBE C. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. **American Cancer Society** 2003; 97: 628-38. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.11114> PMID:12548604

WU S, HAN J, LI WQ, LI T, QURESHI AA. Basal-cell carcinoma incidence and associated risk factors in U.S. women and men. **Am J Epidemiol**. 2013;178:890-7.

WUNING, M. (et al). XRCC3 C18067T Polymorphism contributes a decreased Risk to both Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma: evidence from a meta-analysis. **PLoS ONE**; Vol. 9, Issue 1, e84195, 2014.

YANAI K, NAGAI S, WADA J, et al (2007). Hedgehog signaling pathway is a possible therapeutic target for gastric cancer. **J SurgOncol**, **95**, 55-62. doi: 10.1002/jso.20606

YOUSSEF KK, VAN KEYMEULEN A, LAPOUGE G, et al (2010). Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. **Nat Cell Biol**, **12**, 299-305. doi: 10.1038/ncb2031.

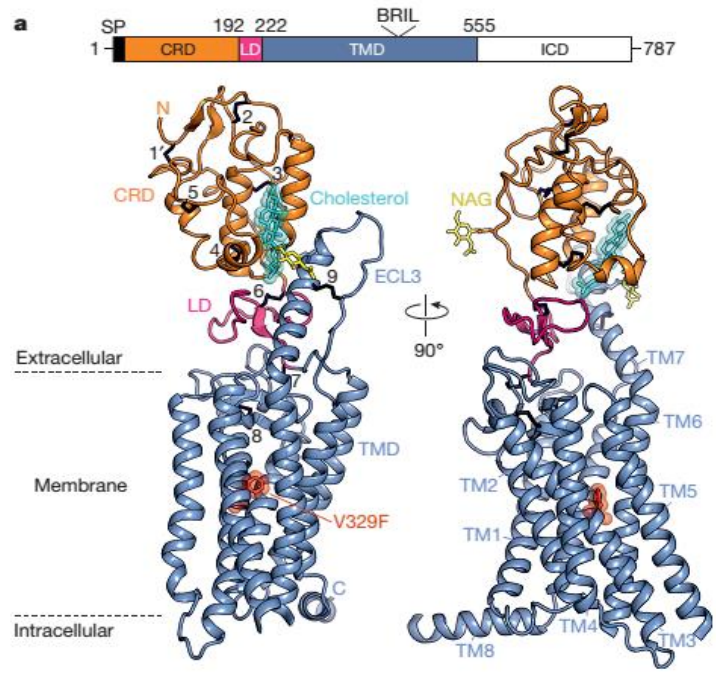
ZHANG, H. et al. Polymorphisms in DNA Repair Gene XRCC1 and Skin Cancer Risk: A Meta-analysis. **Anticancer Research**, 31: 3945-3952, 2011.

ZHOU, L. et al. Quantitative assessment of the association between XPC Lys939Gln polymorphism and Cutaneous Melanoma risk. **Tumor Biol**. 35:1427–1432, 2014.

ZHU, M. L. et al. Polymorphisms in the ERCC5 Gene and Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma (ESCC) in Eastern. **PLoS ONE** 7(7): e41500, vol. 7, 2012.

ANEXOS

Figura 15 - Estrutura do SMO Humano. Visão da estrutura geral mostrando os domínios extracelular e transmembrana do SMO humano na representação. Laranja, CRD; rosa, domínio de ligação (LD); azul, TMD; mutação de ponto vermelho, inativante Val329Phe; ciano, colesterol; preto, nove pontes dissulfeto numeradas; varas amarelas, duas N-glicanos (NAG).



Fonte: BYRNE, 2016