



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

ALFREDO DE ARAÚJO SILVA

**ASSOCIAÇÃO DO SNP rs113488022 DO GENE BRAF NA SUSCEPTIBILIDADE DO
CARCINOMA BASOCELULAR UTILIZANDO O MÉTODO PCR ALELO
ESPECÍFICO ESTENDIDO EM AMOSTRAS DE PACIENTES DA PARAÍBA**

João Pessoa - PB

2022

ALFREDO DE ARAUJO SILVA

**ASSOCIAÇÃO DO SNP rs113488022 DO GENE BRAF NA SUSCEPTIBILIDADE DO
CARCINOMA BASOCELULAR UTILIZANDO O MÉTODO PCR ALELO
ESPECÍFICO ESTENDIDO EM AMOSTRAS DE PACIENTES 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. Leonardo Ferreira Soares

João Pessoa - PB

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586a Silva, Alfredo de Araújo.

Associação do SNP rs113488022 do gene BRAF na susceptibilidade do carcinoma basocelular utilizando o método PCR alelo específico estendido em amostras de pacientes da Paraíba / Alfredo de Araújo Silva. - João Pessoa, 2022.

68 f. : il.

Orientação: Leonardo Ferreira Soares.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Carcinogênese. 2. Carcinoma basocelular. 3. Single nucleotide polymorphisms - SNP. 4. Genotipagem. 5. Epidemiologia. I. Soares, Leonardo Ferreira. II. Título.

UFPB/BC

CDU 576.385.5(043)

ALFREDO DE ARAÚJO SILVA

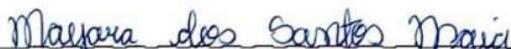
Dissertação de Mestrado avaliada em 05/12/2022

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular
e Molecular Universidade Federal da Paraíba
Orientador



Prof.ª. Dra. Mayara dos Santos Maia
Examinadora Externa



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

Dedico a Deus por se fazer presente em todas as etapas, abrindo portas onde não havia esperança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por ser o meu tudo.

Uma gratidão especial a minha esposa Rossana e meu filho Tiago pela paciência que tiveram todo esse tempo, suportando meus momentos de desânimo, impaciência e não ter dado a atenção que lhes eram devidas.

Ao meu orientador, **Professor Dr. Leonardo Ferreira Soares**, pela orientação neste trabalho, pelo acompanhamento ao longo destes anos tão difíceis à ciência, por todas as oportunidades a mim oferecidas, pela confiança e compreensão em todos os momentos.

Ao **Professor Dr. Eleonidas Moura Lima**, pela dedicação e excelência no seu trabalho, transmitindo para este estudo conhecimentos essenciais, críticas construtivas e sugestões.

À **Dra. Sylvia Satomi Takeno**, pela sua amizade, por todo apoio, parceria e paciência durante a realização desse trabalho. Obrigado por dividir o seu conhecimento comigo. Minha sincera gratidão!

Ao **Dr. João Ricardo Gonçalves de Oliveira**, pelos seus conhecimentos e sempre disponível a ajudar.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**, grato pelos conhecimentos compartilhados.

Aos colegas e amigos **pós-graduandos**, pelo apoio, incentivo e companheirismo. Em especial ao Ronne Richard, pelo compartilhamento de seus conhecimentos e contribuição na organização da dissertação.

RESUMO

O Carcinoma basocelular (CBC) é um tipo de tumor de pele mais frequente de origem de células basais epiteliais com perda de sua capacidade de diferenciação e queratinização normais. Os SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) são frequentes na população e apresentam variações no genoma que podem ser utilizadas como alvos de estudo para predisposição à susceptibilidade a doenças, incluindo o câncer. O objetivo deste estudo foi realizar a genotipagem do SNP rs113488022 do gene BRAF em amostras de CBC e determinar a associação desses SNP com a susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de pele. Foram analisadas 150 amostras de tecido parafinado de pacientes do estado da Paraíba com diagnóstico histopatológico de CBC, totalizando 300 alelos de cada polimorfismo. O método PCR alelo específico modificado foi a técnica utilizada para a genotipagem das amostras. O *software* BioEstat versão 5.3 foi utilizada para análises das frequências genotípicas. Foram estabelecidas segundo o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* com aplicação do teste *Qui-quadrado* um p-valor < 0,05. Nossos resultados sugerem, que o SNP rs113488022 não está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, portanto, apresentou associação significativa com o CBC nas amostras analisadas ($X^2=16,167$ e $P < 0,003$). Os resultados sugerem que o SNP rs113488022 tem potencial de biomarcador molecular para susceptibilidade ao Carcinoma basocelular na população Paraibana.

Palavras-chaves: Carcinoma basocelular, SNP, epidemiologia

ABSTRACT

Basal cell carcinoma (BCC) is one of the most common types of skin tumors that originate from epithelial basal cells that have lost their ability to differentiate and normalize keratinization. SNPs (Single nucleotide polymorphisms) occur frequently in the population and these variations in the genome can be studied with a predisposition to susceptibility to diseases, including cancer. This study aimed to genotype the BRAF gene rs113488022 SNP in BCC samples and determine the association of these SNPs with susceptibility to skin cancer development. 150 samples of paraffin tissue from patients in the State of Paraíba with a histopathological diagnosis of BCC were analyzed, totaling 300 alleles of each polymorphism. The modified allele-specific PCR method was the technique used for the genotyping of the samples. The Biostat software version 5.3 was used to analyze the genotypic frequencies. A p-value < 0.05 was established according to the Hardy-Weinberg equilibrium with an application of the chi-square test. Our results suggest that the SNP rs113488022 is not in Hardy-Weinberg equilibrium, it is showed a significant association with the BCC in the analyzed samples ($X^2=16.167$ and $P < 0.003$). The results suggest that the SNP rs113488022 has the potential as a molecular biomarker for susceptibility to basal cell carcinoma in the population of Paraíba.

Keywords: Basal Cell Carcinoma, SNP, epidemiology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático da estrutura da pele humana.....	16
Figura 2 – Modelo esquemático da estrutura da pele.....	17
Figura 3 – Demonstração esquemática da penetração da radiação UV na pele humana.....	20
Figura 4 – Estimativa por 100 mil habitantes no ano de 2020 da incidência e do número de novos casos de câncer para sexo masculino.....	22
Figura 5 – Estimativa por 100 mil habitantes no ano de 2020 da incidência e do número de novos casos de câncer para sexo feminino.....	23
Figura 6 – Estimativa de casos de câncer de pele não melanoma (CPNM) e câncer de pele melanoma (CPM) para homens e mulheres do Brasil no triênio de 2020-2022.....	24
Figura 7 – Estimativas para o triênio de 2020-2022 de novos casos de câncer de pele não melanoma (CPNM) de acordo com o sexo e regiões do Brasil.....	24
Figura 8 – Estimativas para o triênio de 2020-2022 de novos casos de câncer de pele não melanoma (CPNM) de acordo com o sexo para o município de João Pessoa –PB.....	25
Figura 9 – Esquema demonstrando a mudança na sequência do nucleotídeo que origina a formação de um SNP.....	27
Figura 10 – Via de sinalização MAP quinase.....	29
Figura 11 – Localização no cromossomo 7 da região do gene BRAF.....	30
Figura 12 – Localização anatômica das 150 amostras estudadas dos pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.....	36
Figura 13 – Frequência genotípica dentro das 150 amostras de pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.....	38
Figura 14 – Curva de <i>melting</i> representativa da maior Tm (73,08°C) para o alelo AA do SNP rs113488022 no gene BRAF estudado em pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.....	39
Figura 15 – Curva de <i>melting</i> representativa da maior Tm (76,41°C) para o alelo TT do SNP rs113488022 no gene BRAF estudado em pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.....	40
Figura 15 – Curva de <i>melting</i> representativa da maior Tm (76,80 °C) para o alelo AT do SNP rs113488022 no gene BRAF estudado em pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela1 - Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.....34

Tabela 2 – Distribuição genotípica e frequência alélica do SNP rs113488022 no gene BRAF estudado em pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.....35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Desenhos dos Primers: rs113488022 do gene BRAF.....	30
Quadro 2 – Condições da PCR para rs113488022 do gene BRAF.....	31
Quadro 3 – Programação no termociclador da reação de PCR para rs113488022 do gene BRAF.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AEE-PCR	PCR Alelo Específico Expandido
ATC	Câncer de tireoide anaplásico
Braf	Proto-oncogene B-Raf
CBC	Carcinoma basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCM	Carcinoma de célula <i>Merkel</i>
CPNM	Câncer de pele não melanoma
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LBMEO	Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenético
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RTO	Receptores de transplante de órgão
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CÂNCER	15
1.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PELE	16
1.2.1 Epiderme	17
1.2.2 Derme	18
1.2.3 Hipoderme	19
1.3 CARCINOMA BASOCELULAR	19
1.3.1 Classificação do CBC	20
1.3.2 Etiologia	20
1.3.3 Epidemiologia	22
1.3.4 Problemática do CBC	26
1.4 Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNPs - <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)	27
1.5 Via de Sinalização MAPK	28
1.6 O gene BRAF	29
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Aspectos Éticos	32
3.2 Amostras	32
3.3 Biologia Molecular	32
3.3.1 Extração de DNA Genômico	32
3.3.2 Validação <i>in silico</i>	33
3.3.2.1 Desenho dos primers do SNP (rs113488022) do gene BRAF.	33
3.3.2.2 Método PCR Alelo Específico Estendido	34
3.3.2.3 Condições do PCR alelo específico estendido e hibridização.	34
3.3.2.4 Análise de Curva de <i>Melting</i>	35
3.4 Análise Estatística	35

4. RESULTADOS	36
4.1 Dados demográficos e histopatológicos	36
4.2 Análise da frequência do genótipo de acordo com equilíbrio Hardy-Weinberg	37
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2021), o termo câncer, representa uma desordem no crescimento celular, representado em mais de 100 doenças malignas diferentes. Essas células desordenadas quando iniciadas em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas são classificadas como carcinomas.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a principal causa de morte diminuindo a expectativa de vida no mundo. Em estimativa realizada em 2019, mostrou o câncer como a primeira ou segunda causa de morte antes dos 70 anos de idade em 112 de 183 países analisados (SUNG et al, 2021). O aumento populacional, o envelhecimento e o desenvolvimento socioeconômico contribuíram para a elevação da incidência e mortalidade de câncer (BRAY et al, 2018).

Segundo Weinberg (2008), todos os órgãos do corpo podem ser acometidos pelo câncer, alguns são mais afetados do que outros, apresentando classificações conforme a sua proliferação. Os que não são invasivos a tecidos adjacentes, se restringindo ao local acometido, são referidos como benigno. Quando ocorre uma proliferação desordenada, não mais se restringindo a um único local, acometendo metástases, passa a ser maligno.

Estudos observaram que não só mutações no DNA (Ácido Desoxirribonucleico) de células germinativas e somáticas originavam o câncer, mas também, alterações epigenéticas contribuíam na formação de tumores. Essas alterações causam um desequilíbrio genômico ao comprometer genes ligados a carcinogênese, podendo desencadear oncogênese ou inativando gene de supressão, afetando o mecanismo de reparo do DNA (KNUDSON, 1971; BAYLIN et al, 1986; VOGELSTEIN; KINZLER, 1993).

Hananhan e Weinberg (2011) observaram a falta de regulação no ciclo celular presente no crescimento tumoral, comprometendo o circuito de processamento de sinais biológicos e induzindo a proliferação celular, continuamente. Esse desenvolvimento carcinogênico, mostrou-se complexo, principalmente, por incluir a sinalização proliferativa desordenada, dos supressores de crescimento, sendo resistente a morte celular, angiogênese induzida, invasão e metástase. Segundo os autores, a carcinogênese leva as diversidades de doenças neoplásicas a tumorações que terminam no estado maligno. Outros fatores como, a dieta do indivíduo, o tabaco, a ingestão de álcool, processos patológicos infecciosos,

exposição contínua ou acumulativa a radiação ultravioleta e ionizante, agentes químicos cancerígenos contribuem ao risco de câncer.

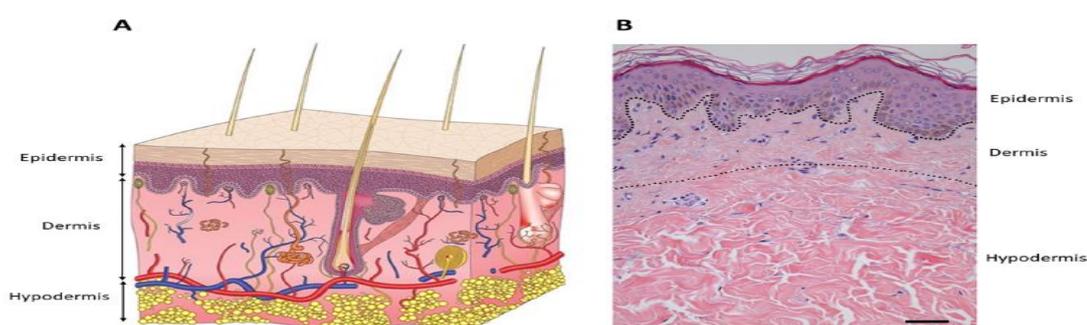
Os carcinomas de pele são doenças malignas que acometem com maior frequência o corpo humano (SCHIERBECK; VESTERGAARD; BYGUM, 2019), sendo classificados de acordo com suas células de origem, localizadas na epiderme, derme ou anexos cutâneos. Os carcinomas decorrentes da epiderme incluem melanoma cutâneo (CM) e os carcinomas não melanoma, como o Carcinoma basocelular (CBC), Carcinoma de Células Escamosas (CCE) e Carcinoma de Células *Merkel* (CCM) (CATALANO et al, 2019).

1.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, apresentando uma área aproximada de 2m² em adultos que corresponde de 15 a 20% do peso corporal (MARTIN; VULIN; HENDRY, 2016; RISUEÑO, et al, 2021). Além disso, possui uma proteção, principalmente, contra as adversidades externas; apresenta diversas funções sensoriais e regulatórias, servindo também como barreira de proteção contra radiação ultravioleta (UV); evita ingresso de agentes patogênicos que possam causar infecção. Quando esse órgão sofre agressão mecânica e química leva o corpo a perdas nocivas de água, nutrientes e mudança de temperatura (BLANPAIN; FUCHS, 2006; BRAGAZZI, 2019).

A pele humana apresenta três camadas estruturais: a epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). A camada média, a derme, é um tecido conjuntivo principalmente composto de fibroblastos que incorporam colágeno. A hipoderme consiste em células de gordura, os adipócitos. De acordo com a parte do corpo onde se encontra, ocorre variação de sua espessura. Na pálpebra a epiderme é mais fina 0,1 mm, enquanto na planta dos pés é mais grossa chegando a 1,5 mm, por exemplo (RISUEÑO, et al, 2021).

Figura 1 - Modelo esquemático da estrutura da pele humana.



Fonte: Risueño et al. (2021) modificado

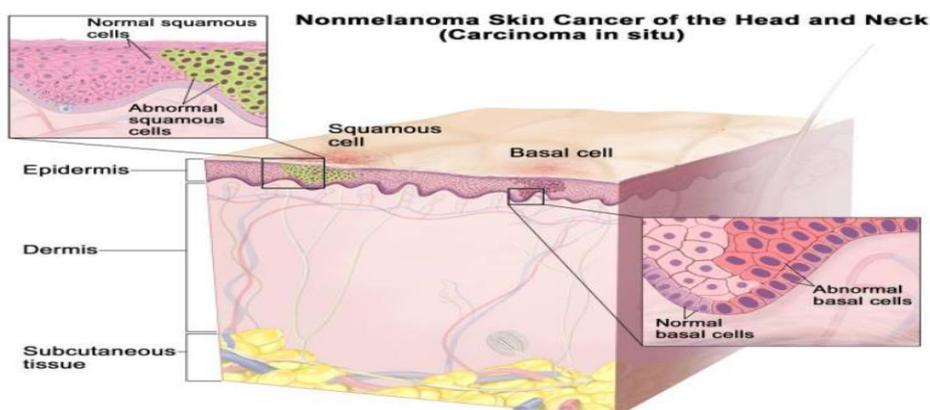
A Figura 1 representa a estrutura da pele da camada mais interna para a externa: a hipoderme, sendo a camada mais interna da pele, tendo como principal função o armazenamento de gordura; a derme que constitui em um tecido conjuntivo denso protegendo o corpo de estresse e impacto e a epiderme apresenta-se em camadas estratificadas de queratinócitos.

1.2.1 Epiderme

A epiderme apresenta-se como uma camada escamosa estratificada queratinizada, a mais externa camada da pele, possui células chamadas queratinócitos, que inclui as células espinhosas e células basais. Outras células, menos abundantes estão presentes como melanócitos que produzem o pigmento melanina, as células de *Langerhans* que participam da resposta imune e as células de *Merkel* contribuem na sensibilidade tátil.

A epiderme é importantíssima no organismo como uma verdadeira barreira física entre o corpo humano e o meio ambiente, promovendo a proteção aos efeitos químicos e microbianos e realizando controle e a integração do tecido conjuntivo subjacente. As células epidérmicas são constituídas por pelo menos 80% de queratinócitos, em seu processo migratório da camada basal à superfície, sofrem a diferenciação terminal levando a queratinização que conduz a perda de organelas citoplasmática resultando num complexo de filamentos devido a morte celular (RISUEÑO, et al, 2021).

Figura 2: Modelo esquemático da estrutura da pele



Fonte: Board, 2020.

A epiderme possui quatro camadas devido à diferenciação e cornificação dos queratinócitos (Figura 2): a camada córnea (*stratum corneum*), mais externa, onde se encontram os queratinócitos anucleados e sem organelas citoplasmáticas, com grande quantidade de filamentos de queratina; a camada granulosa; a camada espinhosa (camada escamosa) que se assemelha ao formato de escama de peixe, iniciando a partir das células basais e diferenciando até as células escamosas, onde se origina o Carcinoma espinocelular e a camada basal (camada germinativa), camada mais profunda responsável pela renovação celular da epiderme, promovido pela intensa atividade mitótica pelas células-tronco.

Recentemente as células basais são consideradas as células-tronco da pele (BLANPAIN; FUCHS, 2006; LIU-SMITH; JIA; ZHENG, 2017; RISUEÑO, et al, 2021). A homeostase das várias áreas epidérmicas, leva a um constante *turnover* das células-tronco. Uma desregulação da diferenciação e renovação são controladas pelas vias de sinalização que pode desencadear a oncogênese (SOTIROPOULOU; BLANPAIN, 2012).

De acordo com STANDRING *et al.* (2016) a diversidade celular na epiderme ocorre devido a predominância de queratinócitos que são modificados sucessivamente na sua morfologia e na composição de sua queratina e dependendo de suas localizações pode ocorrer a participação de outras células que desempenham importantes funções no reconhecimento de antígenos, como as células de *Langerhans*, células de *Merkel* que se sinalizam com os nervos sensoriais, e os melanócitos que promovem a proteção da epiderme dos raios UV através da sua produção de melanina, que promovem a renovação celular e a proteção da pele (LUMPKIN, 2008; KHAN et al, 2012; HAEBERLE; HIROBE, 2014).

Quando a pele sofre a exposição a radiação UV, suas células podem sofrer alterações em seu genoma (YIN, et al, 2014; KIM; HE, 2014). As células possuem mecanismos de defesas, dentre os quais, o reparo de DNA e apoptose, porém, os danos pela exposição à radiação podem ocasionar surgimento de um câncer de pele (DUBAS; INGRAFFEA, 2013; ESPINHA et al, 2015).

1.2.2 Derme

A derme apresenta um sistema complexo de tecidos, composto de colágenos dando a resistência à tração e fibras de elastina do tipo I e II tendo como função principal a resiliência e elasticidade da pele. A derme é relativamente acelular quando comparada a

estrutura da epiderme. Na matriz extracelular dérmica, o ácido hialurônico é um importante componente para a manutenção da hidratação da pele (RISUEÑO et al, 2021).

1.2.3 Hipoderme

A hipoderme é composta principalmente de adipócitos, fibroblastos e macrófagos. Sendo constituída de tecido conjuntivo frouxo e bem vascularizado, apresentando sua espessura variando de 1,9 a 7,1 mm, dependendo do gênero e da região do corpo. Tendo importante papel no processo de hemostasia térmica, fornece fluutuabilidade, armazenamento de energia, e conversão hormonal (RISUEÑO et al, 2021).

1.3 CARCINOMA BASOCELULAR

O Carcinoma basocelular (CBC) foi descrito pela primeira vez em 1827 por Jacob, tendo a denominação de *ulcus rodens*, sendo 1903 atualizada a sua nomenclatura por Krompecher (ABULAFIA, 1963). Os Canceres de Pele Não Melanoma (CPNM) são os mais frequentemente encontrados na pele humana. Os CPNM são em sua maioria os Carcinomas basocelulares e Carcinomas Espinocelulares (também denominados de carcinomas de células escamosas cutâneas).

O câncer de pele não melanoma é o mais frequentemente diagnosticado no mundo. Embora o câncer de pele possa aparecer em qualquer célula que a constitua, no não melanoma observa-se uma incidência de 70% no Carcinoma basocelular e 25% no Carcinoma Espinocelular. Os carcinomas não melanoma mostra um crescimento e capacidade de metástases diferentes, entretanto, quando detectado na fase inicial os Carcinomas basocelular e espinocelular apresentam um bom prognóstico. (SCHLESSINGER, 2022; DIDONA, 2018).

A carcinogênese do CBC tem sido alvo de vários estudos buscando a sua compreensão, sendo um tumor maligno, com maior predominância em seres humanos e com características peculiares (MADAN et al, 2010). O Carcinoma basocelular ainda tem uma etiologia não confirmada, alguns estudos apontam para o seu surgimento a partir das próprias células basais da epiderme humana (LEWIN; CARUCCI, 2015).

Outros estudos evidenciam o seu surgimento a partir das células-tronco da epiderme interfolicular e da raiz do folículo capilar (YOUSSEF et al, 2010). Os tumores do CBC apresentam um crescimento lento, podendo ser agressivo, metástases raras e apresentar

aumento na morbidade decorrente de negligência ou procedimento inadequado ao tratamento (CRAYTHORNE, 2017).

1.3.1 Classificação do CBC

Mendaçolli *et al.* (2015) ao classificar o Carcinoma basocelular, evidenciou os subtipos histologicamente distintos em: nodular, superficial e esclerodermiforme. Os CBC podem comprometer as funções normais dos órgãos, conforme a sua localização apresentando um crescimento lento e lesões proeminentes levando a danos teciduais. Nas áreas que são mais expostas a luminosidade, os subtipos nodular, micronodular e infiltrantes são responsáveis pelas lesões mais frequentes na cabeça e no pescoço (80%), onde predominam a face, principalmente o nariz e as bochechas. Em outras regiões do corpo há uma prevalência do subtipo superficial (CHANG; GAO, 2013; MOHAMMAD *et al.*, 2015; CRAYTHORNE, 2017).

De acordo com Craythorne (2017) o Carcinoma basocelular tem classificação baseada no grau de risco de morte que acomete o indivíduo: subtipos de baixo risco - os CBC superficiais se apresentam clinicamente com placas bem definidas, com crescimento lento e geralmente com coloração vermelha, rosa ou marrom. Encontram-se no tronco e podem apresentar lesões múltiplas. A borda tende a tornasse semelhante a um fio com escama, crosta e sangramento. Os tipos nodulares são os mais frequentes apresentando lesões nodulares brancas peroladas, clinicamente bem definidas com telangiectasia associada; subtipos de alto risco - tendem a seguir uma forma mais agressiva no padrão de crescimento, infiltrando-se profunda e amplamente. Os infiltrativos e morfóicos podem ser semelhantes na aparência, tendo uma qualidade esclerótica semelhante a uma cicatriz. O subtipo micronodular tem uma superfície cerosa amarela/branca e apresenta uma textura rígida.

1.3.2 Etiologia

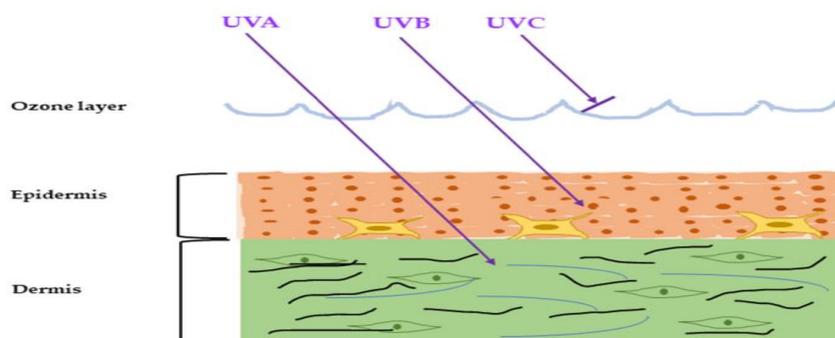
Existe uma complexidade na probabilidade do desenvolvimento do CBC, por depender da interação predisponente de características genótípicas e fenotípicas a subsequente exposição a fatores de risco ambientais (VERKOUTEREN *et al.*, 2017). A incidência do CBC é muito mais comum em pessoas com idade entre 55-70 anos,

possivelmente por exposição a radiação solar cumulativa e com redução da capacidade do mecanismo de reparo aos danos ocorridos no DNA (QUAZI et al, 2020; LABANI et al, 2021).

A radiação UVB (290-320nm) é um importante fator de risco no desenvolvimento do câncer, causa mutações no gene supressor de tumor. Os outros fatores de risco incluem histórico familiar de algumas síndromes genéticas como síndrome do nevo-basocelular. O aumento em crianças e adultos jovens do CBC, devido a maior exposição ao sol e possível associação as Síndromes genéticas como *Bazex*, Síndrome do nervo basocelular (síndrome de Gorlin) e xeroderma pigmentoso, instabilidade genômica, resultantes de mutações e polimorfismos (DEPRY, 2011; NOUBISSI, 2014; QUAZI I, 2020).

Para um alerta dos níveis de UV e possíveis danos à saúde, o índice dessa radiação (Figura 3) mostra o perigo para a saúde independente da tonalidade da pele de qualquer indivíduo, mesmo podendo ser mais rápido os danos para uma pele clara em relação a uma pele mais escura, dependendo também de outros fatores secundários como saúde geral, tipos de alimentos consumidos e outras características orgânicas individuais (CORRÊA, 2015).

Figura 3 - Demonstração esquemática da penetração da radiação UV na pele humana.



Fonte: Ansary *et al.*, 2021

Naturalmente, a radiação ultravioleta é emitida pelo sol, entretanto, fontes artificiais podem, também, emitir radiação, como: lâmpadas de vapor de mercúrio, lâmpadas refrigeradas, entre outros. Em baixas dosagens de exposição crônica da radiação UV, pode levar a um bronzeamento e um envelhecimento precoce da pele (ANSARY *et al.*, 2021).

A carcinogênese cutânea é um processo pouco compreendido. Muitos estudos buscam explicar o que o direciona à malignidade do câncer de pele não melanoma (DIDONA et al, 2018). A identificação precoce dessa doença é através de características clínicas e histopatológicas, onde são feitas intervenções que devem ser implantadas no início

do prognóstico (NAGARAJAN *et al.*, 2019). O carcinoma de pele não melanoma, raramente é fatal, com um prognóstico favorável, porém, há evidências de outros resultados adversos à saúde com a possível associação do aumento de outras mortalidades (BARTON *et al.*, 2017).

1.3.3 Epidemiologia

No Brasil, cerca de 30% de todos os registros de câncer, são de pele não melanoma, apresentando alto índice de cura quando diagnosticado e efetuado precocemente o tratamento. O câncer de pele é menos frequente em crianças e negros, em contrapartida, apresenta uma alta incidência em pessoas com idade acima dos 40 anos com pele clara. O Carcinoma basocelular é o que apresenta maior incidência entre os cânceres de pele não melanoma sendo o menos agressivo (INCA, 2021).

Em análise comparativa da incidência do câncer de pele entre o Japão e outros países por Niino e Matsuda (2021), com dados obtidos do Observatório Global do Câncer, os países observados apresentaram similaridade na taxa de incidência de câncer de pele em ambos sexos. O Brasil apresentou uma taxa de incidência crescente após os 30 anos de idade em comparação aos outros países estudados; apresentando a maior taxa de incidência de 1225,7 por 100.000 mulheres com 80 anos ou mais.

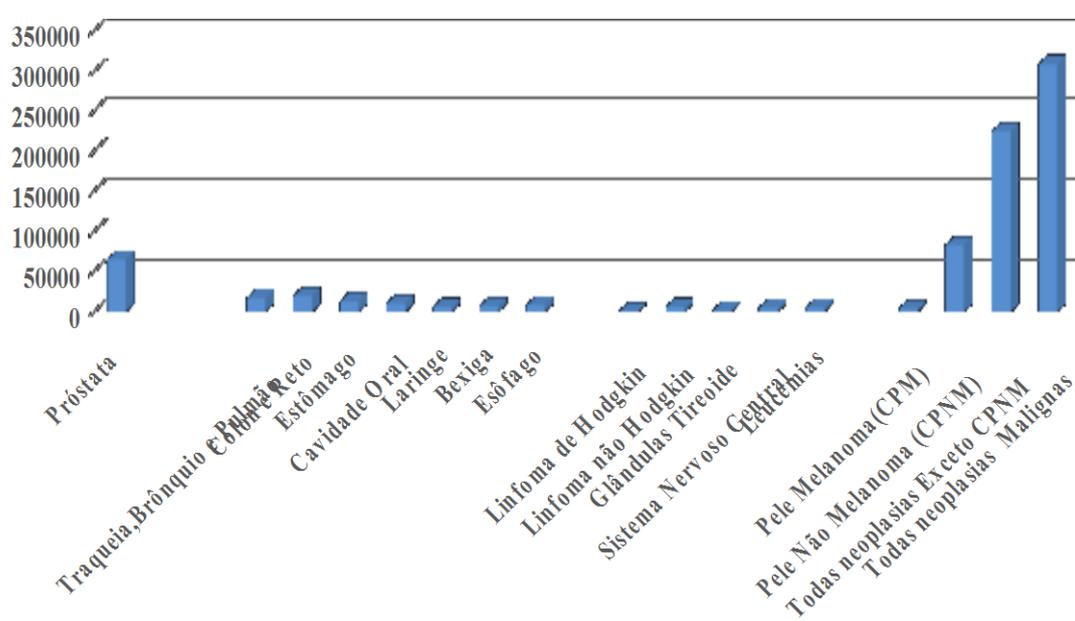
Em crescente incidência no mundo poucos países fazem registros de Carcinoma basocelular em âmbito regional/nacional, deixando uma lacuna no monitoramento, tornando deficitário a estimativa de incidência necessária para alocação de serviços de saúde. Provavelmente, este baixo registro nesses países se expliquem pela baixa mortalidade e não pelos dados histopatológicos de CBC confirmados (VERKOUTEREN *et al.*, 2017)

Nas últimas décadas, o câncer de pele no Brasil teve o maior número de notificação, principalmente, relacionado ao histórico de saúde da família e a exposição aos raios UV (BERTEMES-FILHO; IMAI, 2016). O Carcinoma basocelular (CBC) na Austrália, em relação aos outros tipos de cânceres, tem a maior incidência (DORAN *et al.*, 2015). Estudos realizados em 2011 a 2013 observaram um aumento do CBC na Índia, embora seja de baixa incidência entre os Asiáticos (KUMAR *et al.*, 2014). Rogers *et al.* (2015) relataram em um estudo nos Estados Unidos, apresentou um aumento entre 2006 a 2012 de 14% no diagnóstico de CBC, sendo estimado 2 milhões de novos registros por ano.

O CPNM tem como principais fatores de risco a pele clara, sexo masculino e

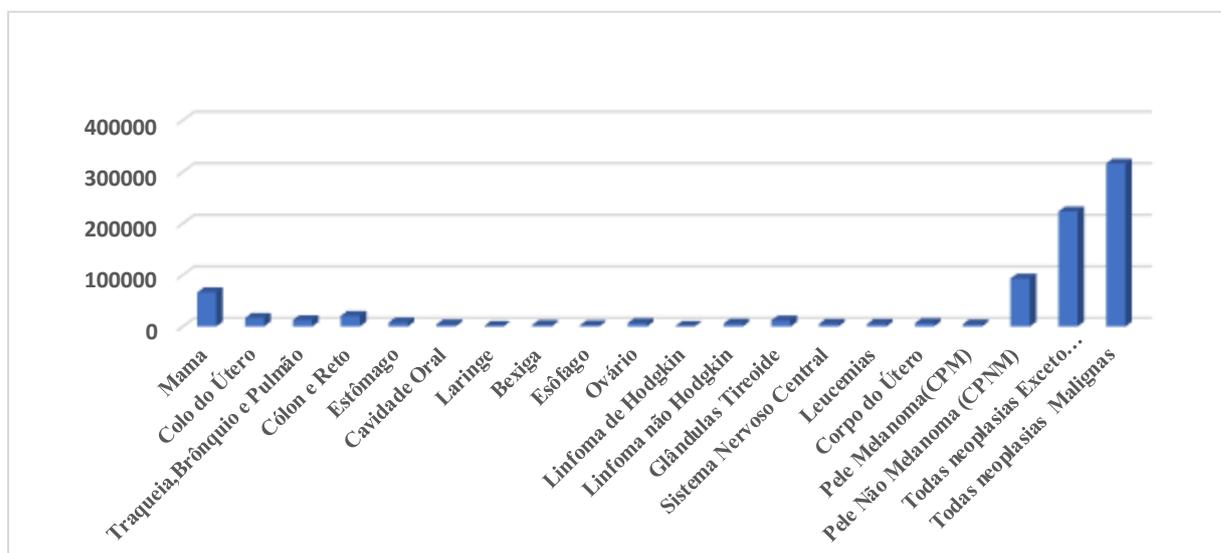
exposição ao sol, como mostra um estudo de Burns *et al.* (2017), apresentando os homens como o dobro do risco para CBC e três vezes maior a incidência para CEC em relação as mulheres (Figura 4 e 5). Vecchiato *et al.* (2021) relataram em um estudo de *cohort* retrospectivo que pacientes transplantados de pulmão apresentam um alto risco de câncer de pele, corroborando com outros estudos relativos aos receptores de transplante de órgãos (RTO).

Figura 4 - Estimativa por 100 mil habitantes no ano de 2020 da incidência e do número de novos casos de câncer para sexo masculino.



Fonte: INCA, 2020.

Figura 5 - Estimativa por 100 mil habitantes no ano de 2020 da incidência e do número de novos casos de câncer para sexo feminino.

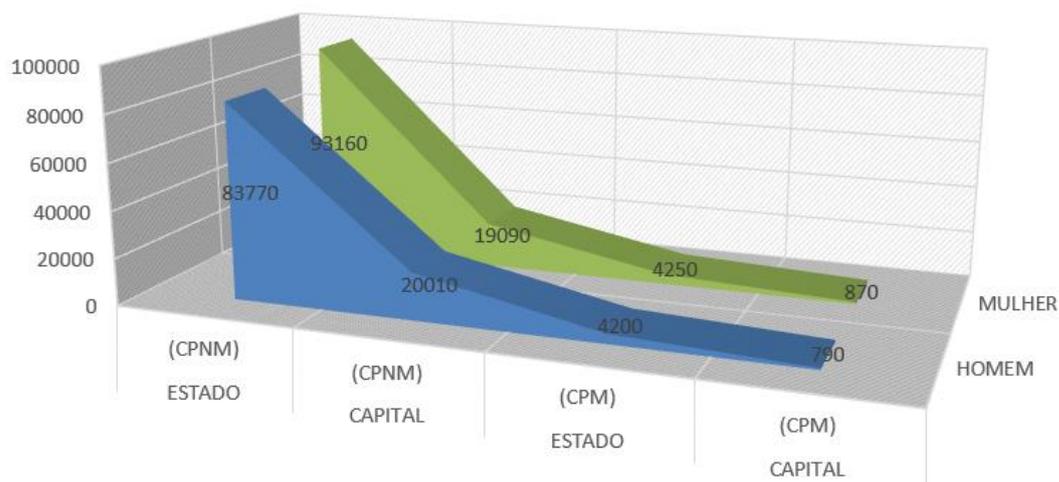


Fonte: INCA, 2020.

O risco aumentado em doenças cutâneas e em particular de CPNM em pacientes RTO, parecem estar relacionados a exposição à radiação ultravioleta, fatores genéticos, infecções virais e o uso terapêutico de imunossupressores. A ação profilática da vacina contra o papilomavírus humano nos Carcinomas espinocelular (CEC) e basocelular (CBC) em dois pacientes com histórico de múltiplas incidências de CECs e CBCs mostrou que um dos pacientes após a vacinação apresentou 62,5% na redução de novos casos de CEC e 100% de redução de novas incidências de CBC, o outro paciente estudado apresentou uma redução dos novos casos de CEC de 66,5% e os casos novos de CBC teve 100% de redução. Segundo os autores, provavelmente, a vacina contra HPV poderá ser utilizada como um possível tratamento profilático em pacientes de alto risco a desenvolver esses carcinomas (TRAGER et al, 2020).

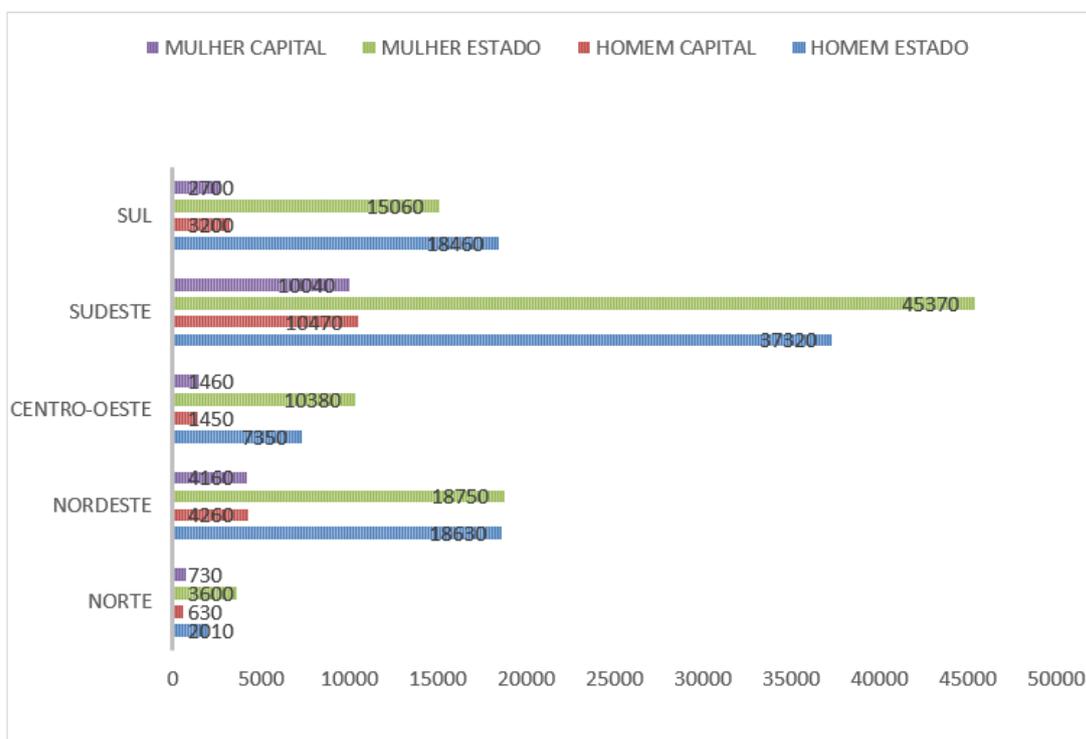
A estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 no Brasil, aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). Sendo o mais incidente (177 mil) para o câncer de pele não melanoma, seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil). O câncer de pele não melanoma representará 27,1% de todos os casos de câncer em homens e 29,5% em mulheres (INCA, 2020). (Figura 6,7 e 8)

Figura 6 - Estimativa de casos de câncer de pele não melanoma (CPNM) e câncer de pele melanoma (CPM) para homens e mulheres do Brasil no triênio de 2020-2022.



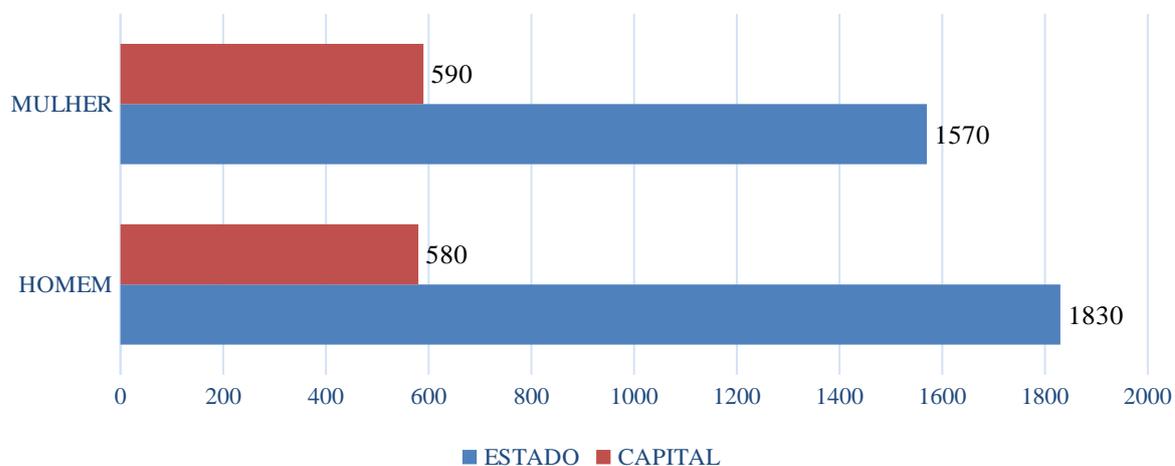
Fonte: INCA, 2020.

Figura 7: Estimativas para o triênio de 2020-2022 de novos casos de câncer de pele não melanoma (CPNM) de acordo com o sexo e regiões do Brasil.



Fonte: INCA, 2020.

Figura 8: Estimativas para o triênio de 2020-2022 de novos casos de câncer de pele não melanoma (CPNM) de acordo com o sexo para o município de João Pessoa – PB.



Fonte: INCA, 2020.

O cálculo das estimativas permite uma visão global da distribuição do câncer de pele melanoma e não melanoma por sexo, região geográfica, Estados e capitais, não substituindo as abordagens contínuas e sistemáticas geradas pelos Registros de Câncer e pelo Sistema de Informação sobre Mortalidade (INCA, 2020).

De acordo com Braya et al e Ferlay et al (2018), novos casos de câncer de pele não melanoma, estimado em 1,04 milhão (5,8%) em 2018, sendo 640 mil em homens (16,6/100 mil) e 400 mil mulheres (10,7/100 mil). O câncer de pele melanoma estima-se em 2018 1,6%, correspondendo a 290 mil, com 150 mil casos novos em homens (3,9/100 mil) e 140 mil em mulheres (3,6/100 mil).

Em 2017, no Brasil, foram registrados 1.301 óbitos de câncer de pele em homens, correspondendo a um risco de 0,92/100 mil e o registro de 949 óbitos em mulheres, com um risco de 0,92/100 mil (INCA, 2020). É de grande importância intensificar os estudos na etiologia do câncer, em particular do câncer de pele que cresce a sua incidência no mundo, sendo de relevância no meio científico.

1.3.4 Problemática do CBC

Segundo Ozgediz et al (2008), o carcinoma com a característica invasiva, ou seja, metastático é pouco evidente mesmo apresentando uma baixa incidência de mortalidade, mas os resultados são significativos de morbidade, visto que as lesões comumente ocorrem em

locais expostos ao sol, como a face. GRIFFIN; ALI; LEAR (2016) relataram que será um grande problema para o sistema público e privado de saúde sendo cada vez mais crescentes o número de pessoas acometidas quando não diagnosticadas precocemente, podendo ter suas vidas comprometidas com lesões irreversíveis em tecidos epiteliais, cartilagem e ossos, levando a desfiguração de sua aparência e redução da sua qualidade de vida (SCHLESSINGER, 2022).

Com uma incidência alta, os custos com o tratamento excedem os gastos com outros cânceres, necessitando de várias ações terapêuticas como excisão cirúrgica, curetagem e terapia tópica (GOLDENBERG et al, 2016; GUY et al, 2015). Uma política pública preventiva com incentivo a pesquisa que pode proporcionar um diagnóstico precoce e efetivo do câncer de pele, evitando os danos físicos, psicológicos e socioeconômicos.

1.4 Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*)

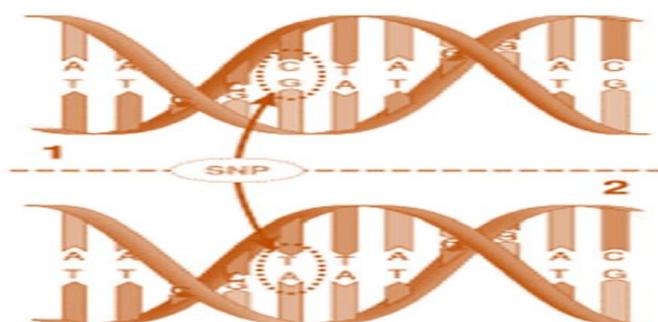
A instabilidade genômica é uma característica de quase todos os cânceres humanos, mas em que estágio do desenvolvimento surge e qual a sua base molecular são questões para as quais estamos apenas começando a obter respostas (NEGRINI, GORGOULIS, HALAZONETIS, 2010). De acordo com o *International Snp Map Working Group* (2001), diferenças herdadas na sequência de DNA contribuem para a variação fenotípica, influenciando as características antropométricas de um indivíduo, risco de doença e resposta ao meio ambiente.

Cerca de 30 milhões de pares de bases de nucleotídeos estão presentes o genoma humano, dentre estes pares de bases, 99% contém a mesma sequência em todos seres humanos. No processo evolutivo, as mutações que ocorrem nas sequências locais apresentando mais de 1% na população são chamados de polimorfismo. No genoma humano existem vários tipos de polimorfismo e relatados em estudos associação à progressão do câncer. Tendo como um dos mais frequentes os SNPs, que são variações de uma única base na sequência nucleotídica (A, C, G ou T) do DNA genômico que varia do nucleotídeo regulamentar esperado. Programas de sequenciamentos genéticos revelaram a identificação de milhões de SNPs que estão localizados dentro dos *introns* e regiões intergenéricas do genoma (Figura 9) (BROOKES, 1999; ALLEMAILEM et al, 2021).

Variantes de substituição de aminoácidos em vários genes de reparo de DNA estão sendo identificados e estimados na frequência polimórfica em determinadas populações. A

função biológica de muitas dessas substituições de aminoácidos ainda não foi esclarecida, mas algumas dessas variantes podem estar associadas a uma redução na capacidade de reparo e aumento da susceptibilidade ao câncer (BUTKIEWICZ *et al.*, 2001; QIAN *et al.*, 2011).

Figura 9 - Esquema demonstrando a mudança na sequência do nucleotídeo que origina a formação de um SNP.



Fonte: Allemailem *et al.*, 2021.

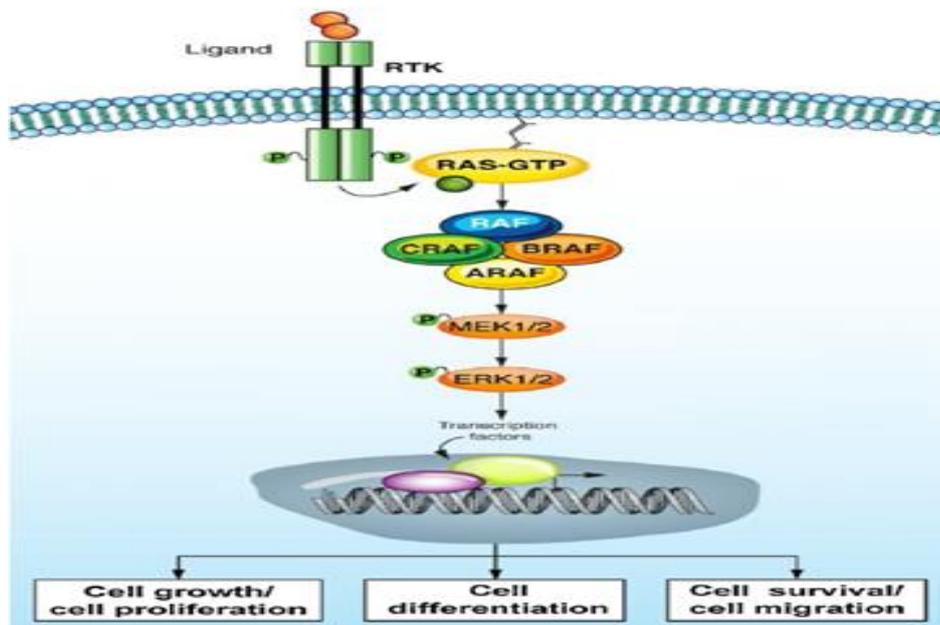
1.5 Via de Sinalização MAPK

Composta por vários proto-oncogenes RAS/RAF/MEK/ERK, como um dos membros da família RAF, o proto-oncogene BRAF, apresenta uma frequência de mutação maior que ARAF e CRAF (LIU, *et al.*, 2020).

As mutações no gene da família RAS foram na década de 1990 amplamente analisados, onde foi proposto que RAS contribui para o desenvolvimento do câncer. 10-20% da frequência de mutação RAS podia contribuir com o desenvolvimento do carcinoma espinocelular e CBC (Libra, *et al.*, 2006).

A ativação na via MAP quinase de RAF é regulado pela sinalização de RAS (Figura 10), que ativada como GTP-RAS por receptores de tirosina quinase diferentes e por fosforilação. Numa cascata de sinalização o RAF ativa MEK1 e, por sua vez, o ERK1/2, promovendo uma ativação da transcrição de fatores de nas atividades fisiológicas celulares, como crescimento, diferenciação, proliferação, apoptose e senescência (Frisone, *et al.*, 2020); (LIU, *et al.*, 2020).

Figura 10: Via de sinalização MAP quinase.



Fonte: FRISONE, et al. 2020 (Modificado)

GONZALEZ-DEL PINO *et al.* (2021) observaram que no sítio alostérico MEK em BRAF/MEK complexos, estabilizam a alça de ativação MEK sendo resistente à dupla fosforilação mediada por BRAF necessário para a ativação completa de MEK. Os inibidores de MEK atuam mais potentemente nos complexos BRAF/MEK em vez de MEK ativo livre, evidenciando a relevância farmacológica do alvo para esta classe de compostos.

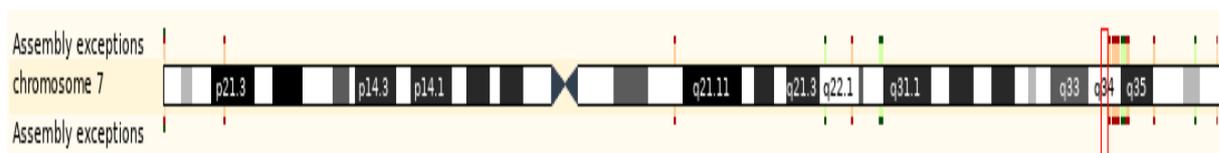
1.6 O gene BRAF

Descrito pela primeira vez em 1993, sendo um dos genes de proteína quinase com maior frequência de mutação em tumores humanos. A mutação BRAF na patologia tem um valor prognóstico e diagnóstico em muitos tumores, incluindo melanoma, câncer de tireoide, câncer colorretal, células pilosas leucêmicas (HCL), tumores cerebrais e em vários outros cânceres (Ghorbani-Aghbolaghi *et al.*, 2017; Shukla, 2021).

O gene codificador humano Raf quinase do tipo B (BRAF) está incluído na família RAF quinase, uma família serina/treonina-proteína quinase, localizado no cromossomo 7 (7q34) (Figura 11), da região de 140.715.951 a 140.924.764 com pares de base de 190kb, sendo sua composição formada por 18 éxons. Importante papel a via MAP quinase, sendo um dos principais indutores da sinalização intracelular que promove o crescimento e

proliferação celular, sendo assim, um gene de importância na análise funcional para se explorar as possíveis associação entre mutações genéticas e variações fenotípicas (Hassan et al, 2016; Frisone et al, 2020).

Figura 11 - Localização no cromossomo 7 da região do gene BRAF.



Fonte: NCBI, 2022.

Um dos importantes papéis da via MAP quinase, sendo um dos principais indutores da sinalização intracelular que promove o crescimento e proliferação celular, sendo assim, um gene de importância na análise funcional para se explorar as possíveis associação entre mutações genéticas e variações fenotípicas (Hassan et al, 2016; Frisone et al, 2020).

Hassan *et al* (2016) observaram mutações do gene BRA, com uma variedade de frequência de > 80% em melanomas, de 5 -15% em tumores de tireoide, 1-3% em câncer pulmonar e 5% no câncer colorretal. No Carcinoma basocelular (CBC), o oncogene RAS tem contribuído com o aumento de sua incidência. As mutações BRAF são frequentemente encontradas em linhagens celulares de melanoma, que foram submetidos a biópsia.

O presente estudo analisou a associação do SNP rs113488022 do gene BRAF a partir de amostras de material parafinado de pacientes da Paraíba com diagnóstico histopatológico de Carcinoma basocelular. A associação desse SNP com os tumores poderá fornecer informações sobre a susceptibilidade na carcinogênese.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Associar o SNP rs113488022 do gene BRAF, em amostras de tecido parafinado de pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a frequência alélica do SNP rs113488022 do gene *BRAF* em amostras de pacientes com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.
- Estimar a associação do SNP do gene em questão à susceptibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma basocelular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Atendendo às resoluções nº 196/96 e 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos e armazenamento de material biológico, o presente estudo faz parte do projeto temático aprovado pelo 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 150 amostras de tecido parafinado com tempo superior a cinco anos do banco de laudos expedidos pelo Laboratório UNILAB/patologia Ivan Rodrigues/ João Pessoa - PB, com diagnóstico histopatológico de Carcinoma basocelular e informações sobre gênero, localização do tumor e tipo histológico.

Foram admitidos no estudo os dados clínico-patológicos das amostras autorizados pelos pacientes, ou seus responsáveis legais quando informados do procedimento e ratificando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que autoriza a utilização das amostras. Todas as mostras foram codificadas com o intuito de resguardar o direito à privacidade dos seus doadores.

3.3 Biologia Molecular

3.3.1 Extração de DNA Genômico

As amostras foram submetidas à extração do DNA no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO) do Departamento de Biologia Molecular (DBM), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), 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 aquecidos para retirada da parafina do tecido e colocados em microtubos de 1,7mL. Após o processo de aquecimento, foi adicionado 1mL

de tampão de extração (Tris/HCL 0,01 M; Sacarose 0,32 M; MgCl₂ 5 mM; Triton X-100 1%, KCL 50mM, NP-40 0,45%; Tween 20 0,45%), adicionados 5µl de proteinase K (10mg/mL), 100µl de SDS (30%) e aquecidas em banho-maria a 55°C por 3 dias.

Passado esse tempo, foi adicionado 1,5mL de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado com inversões suaves por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, a solução homogeneizada foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro microtubo, onde foi adicionado 1,5mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e homogeneizado. Para precipitação do DNA foi adicionado 1mL de álcool etílico absoluto gelado e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O DNA foi desidratado em estufa a 60°C. após a secagem o DNA e ressuspendido em 200 µl de água Milli-Q estéril.

3.3.2 Validação *in silico*

3.3.2.1 Desenho dos primers do SNP (rs113488022) do gene BRAF.

O método de genotipagem utilizado nesse trabalho foi o PCR (*polymerase chain reaction*), Os iniciadores foram desenhados por validação *in silico* (Quadro 1) com auxílio de bancos de dados e *software* de análise de alinhamento de sequência: Ncbi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>); GenRunner (<http://www.generunner.net/>); Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>); Ensembl (<http://www.ensembl.org>) e Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Quadro 1 - Desenhos dos Primers: rs113488022 do gene BRAF.

Braf/aF:	5'-TGGGACCCACTCCATCGAGATTTCA-3'/ Tm: 56°C
Braf/gF:	5'-TTTTTTGGGACCCACTCCATCGAGATTTTCG-3'/ Tm: 56°C
Braf/cF:	5'-TTTTTTTTTTTTGGGACCCACTCCATCGAGATTTCC-3'/ Tm: 56°C
Braf/tF:	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGACCCACTCCATCGAGATTTCT-3'/Tm: 56°C
Braf/R:	5'-CCTAAACTCTTCATAATGCTTGCTCTGATAGGAA-3'/ Tm: 56°C
Amplicons:	
Alelo A: 155pb; Alelo G: 160pb, Alelo C: 165pb e Alelo T: 170pb	

Fonte: Silva, A., 2022.

3.3.2.2 Método PCR Alelo Específico Estendido.

O método PCR Alelo Específico Estendido é uma técnica de genotipagem que consiste em desenhar um iniciador (*primer*) em que a DNA polimerase amplifica o DNA-alvo somente se os *primers* forem perfeitamente complementares ao sítio do DNA-alvo, utilizando-se assim *primers* específicos para detectar cada alelo. Os genótipos do SNP podem ser revelados segundo a massa ou segundo a fluorescência.

A hibridização tem como base a estabilidade térmica do DNA de dupla fita. Em condições de alta estringência, essa estabilidade é suficiente para distinguir entre pares de sonda – DNA-alvo perfeitos e imperfeitos. A hibridização só acontece se ocorrer pareamento perfeito entre sonda e DNA-alvo podendo ser construídas sondas específicas para cada alelo.

Este método consistiu em avaliar qualquer polimorfismo em uma única reação de PCR. Cada *primer* foi desenhado com uma sequência de cauda TTT gerando fragmentos de tamanhos e temperaturas de *melting* (T_m) diferentes correspondentes ao seu alelo específico, permitindo a sua discriminação.

3.3.2.3 Condições do PCR alelo específico estendido e hibridização.

A PCR foi realizada a um volume total de 20ul contendo Mastermix (*Promega – Madison - USA*), *primer R*, *primer mix* (A, T, G, C) e água ultrapura (Quadro 2 e 3).

Quadro 2 - Condições da PCR para rs113488022 do gene BRAF.

Preparo da Reação	PCR rs113488022 BRAF	
		PCR
Preparo da Reação	Mastermix	15ul
	Primer R	1 ul
	Primer Mix	1 ul
	Água ultrapura	1ul
	DNA	100ng/ul
	Volume final da reação	20ul

Fonte: Silva, A., 2022.

Quadro 3 - Programação no termociclador da reação de PCR para rs113488022 do gene BRAF.

Nº de Ciclos	Etapas	Temperaturas	Tempo
1	Desn. Inicial	95°C	3 min
	Desnaturação	95°C	20 seg
40	Anelamento	56°C	1 min e 30 seg
	Extensão	72°C	45 seg
1	Extensão Normal	72°C	5 min
1	Tempo de Espera	12°C	Infinito

Fonte: Silva, A., 2022.

3.3.2.4 Análise de Curva de *Melting*

A análise da curva 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 analisar a curva de *melting*, utilizou-se SYBR Green 2X e Rox 1X (Promega – Madison - USA), que possui ligação específica ao DNA dupla fita.

3.4 Análise Estatística

As amostras de Carcinoma basocelular terão suas frequências alélicas testadas e calculadas quanto seu equilíbrio segundo a lei de *Hardy-Weinberg* que apresentou como controle as frequências alélicas esperadas.

Na amostragem populacional estudada, foi utilizado o Teste de *Qui-Quadrado* ou X^2 , sendo verificado a distribuição dos genótipos dos polimorfismos. A significância entre tais associações foi baseada no valor de $p \leq 0,05$, determinado com intervalos de confiança de 95%.

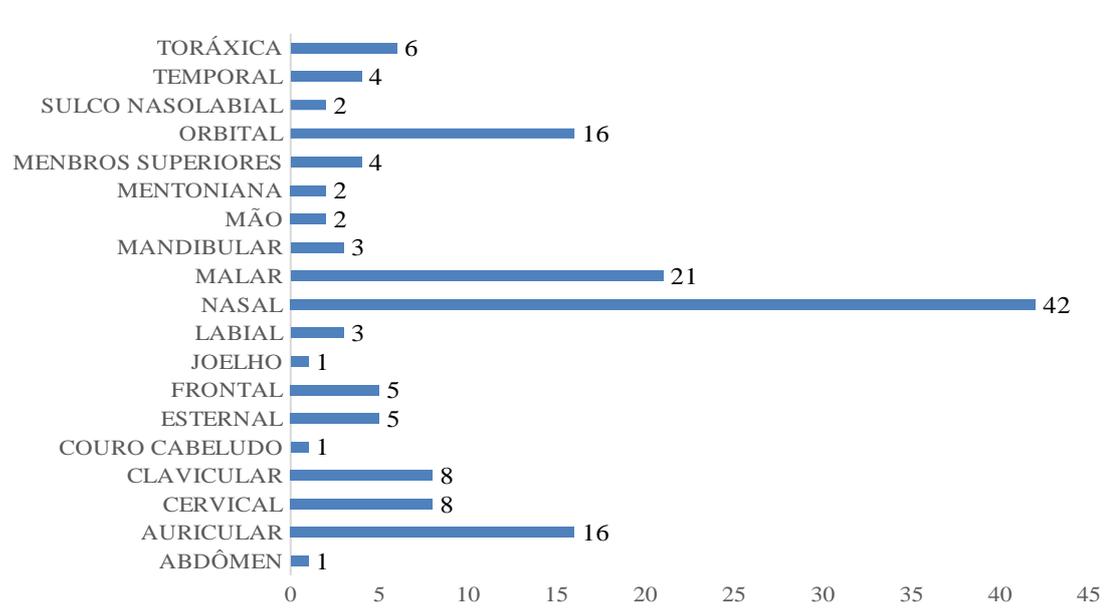
4. RESULTADOS

4.1 Dados demográficos e histopatológicos

O presente estudo foi realizado com 150 amostras de pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba, destes 73 foram do gênero masculino e 77 do gênero feminino apresentou uma predominância de faixa etária acima dos 50 anos de idade (Tabela 1).

A Figura 11 representa a distribuição quanto a localização do tumor, evidenciando a incidência de tumores na região da cabeça e pescoço em relação as outras regiões como membros superiores, região do tronco e membros inferiores. A predominância do tipo histológico é caracterizada por nodular 115, superficial 22, esclerodermiforme 09, ulcerado 03 e infiltrante 01.

Figura 12: Localização anatômica das 150 amostras estudadas dos pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.



Fonte: Silva, A.A. (2022)

Tabela 1: Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.

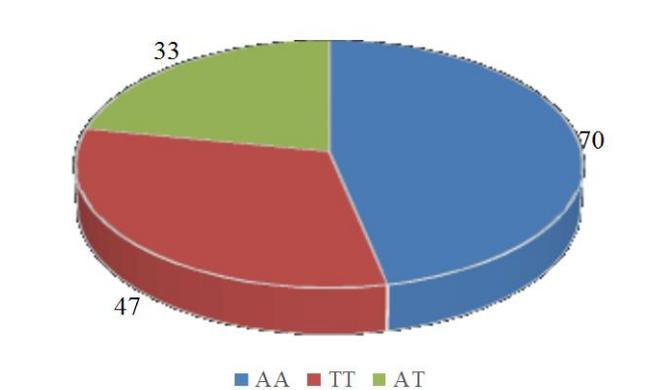
VARIÁVEL	TOTAL	Genótipo AA	Genótipo TT	Genótipo AT	P valor
Gênero					
Feminino	77	38	23	16	0,7947
Masculino	73	32	24	17	
Faixa Etária					
20 – 40	11	2	8	1	0,0213
41 – 60	42	20	10	12	
61 – 80	68	33	24	11	
81 – 100	29	15	5	9	
Localização do Carcinoma					
Cabeça	115	50	39	26	0,5728
Tronco	28	15	6	7	
Membro superior	6	4	2	0	
Membro inferior	1	1	0	0	
Tipos histológicos					
Nodular	115	53	28	34	0,2610
Esclerodermiforme	09	3	2	4	
Superficial	22	10	4	8	
Infiltrante	01	0	1	0	
Ulcerado	03	1	1	1	

Fonte: Silva, A.A. (2022)

4.2 Análise da frequência do genótipo de acordo com equilíbrio Hardy-Weinberg

Foram analisadas 150 amostras de pacientes com Carcinoma basocelular para o polimorfismo rs113488022 do gene BRAF. O presente trabalho é o primeiro estudo a avaliar a associação desses SNPs com a suscetibilidade ao desenvolvimento do Carcinoma basocelular no estado da Paraíba. O estabelecimento e análise das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs, segundo o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Tabela 2) mostrou estar associado ao desenvolvimento de CBC nas amostras analisadas.

Figura 13: Frequência genotípica dentro das 150 amostras de pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.



Fonte: Silva, A.A. (2022)

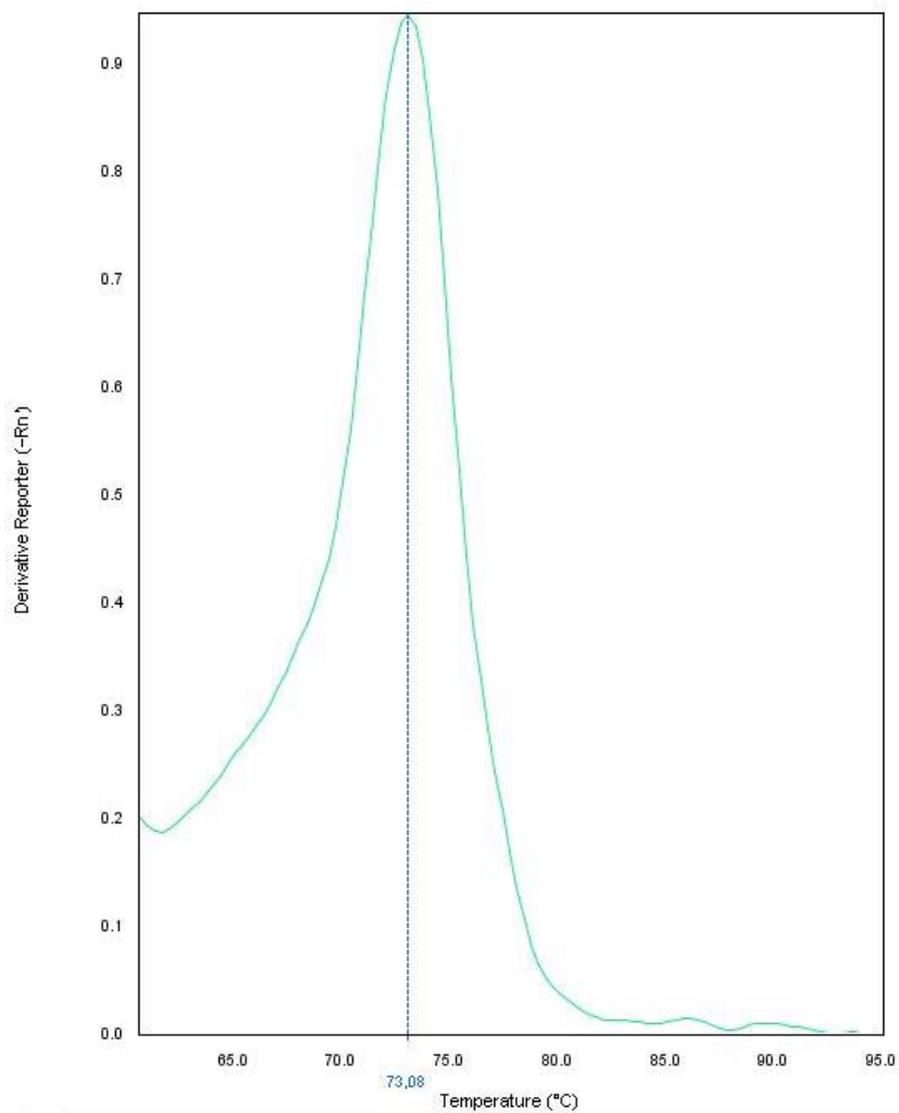
Tabela 2: Distribuição genotípica e frequência alélica do SNP rs113488022 no gene BRAF estudado em pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.

SNP	GENÓTIPOS	GENÓTIPOS	FREQUÊNCIA		X ²	P VALOR
	OBSERVADO	ESPERADOS	ALÉLICA			
rs113488022	AA 47	AA 33	A	T	16,167	0,0003
	AT 22	AT 49				
	TT 31	TT 18				

Fonte: Silva, A., 2022.

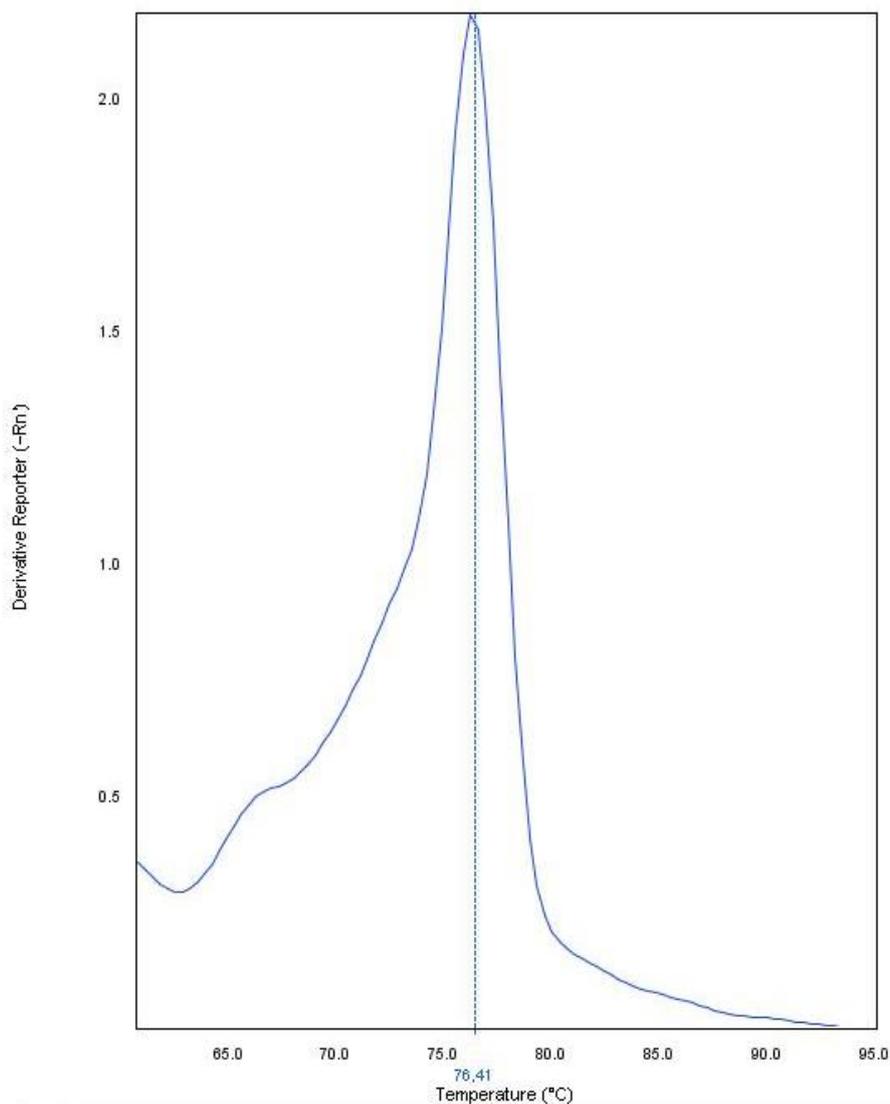
A frequência alélica do SNP rs113488022 no gene BRAF obtida pelo método PCR alelo específico estendido foi de 70 indivíduos para o alelo ancestral A, 47 indivíduos para o alelo polimórfico T e 33 indivíduos para AT. Com a seguinte distribuição genotípica: 47% AA (Lys/Lys), 31% TT (Arg/Arg) e 22 AT (Lys/Arg). A temperatura de *Melting* (T_m) observada para o alelo A variou de 72,67°C a 73,4°C (Figura 13), enquanto que o alelo T apresentou T_m em torno de 75,90°C a 76,75°C (Figura 14), já o alelo AT apresentou a temperatura média dos alelos A e T (Figura 15).

Figura 14 – Curva de *melting* representativa da maior T_m (73,08°C) para o alelo AA do SNP rs113488022 no gene BRAF estudado em pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.



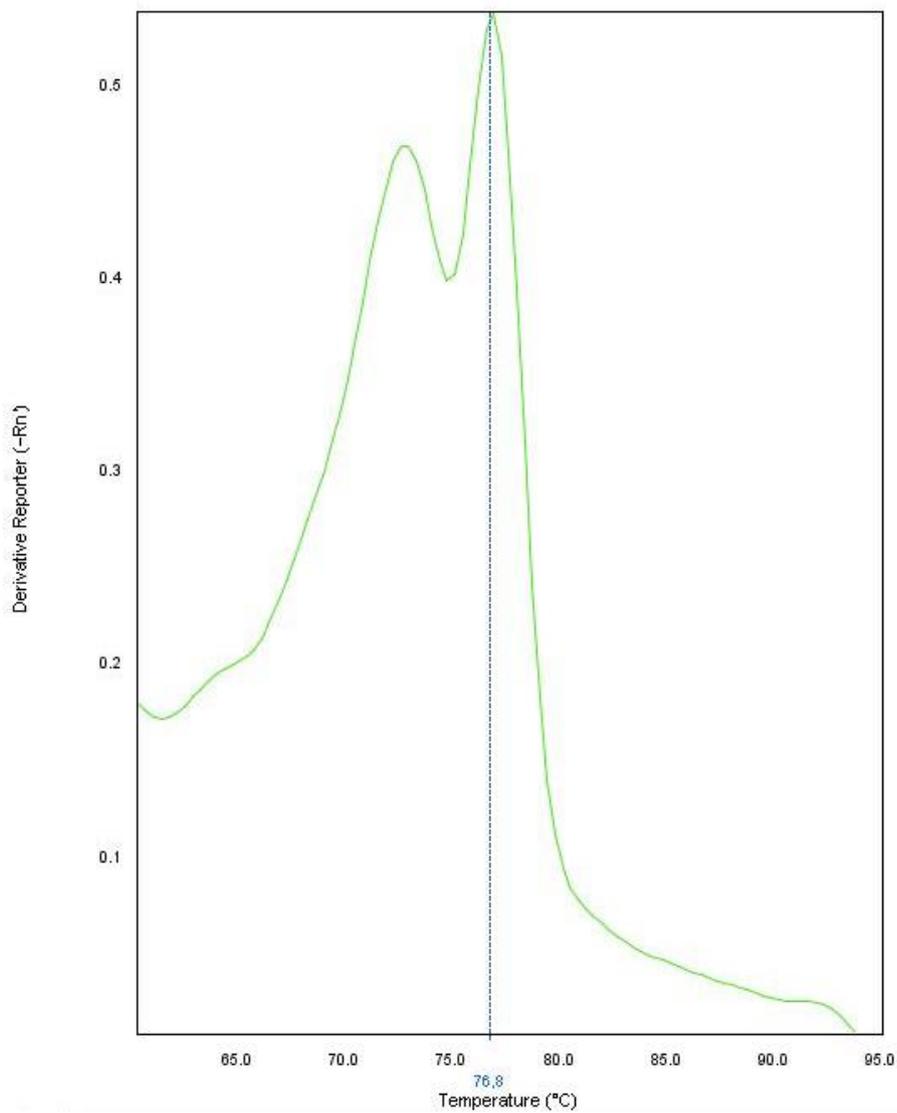
Fonte: Silva, A., 2022.

Figura 15 – Curva de *melting* representativa da maior Tm (76,41°C) para o alelo TT do SNP rs113488022 no gene BRAF estudado em pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.



Fonte: Silva, A., 2022.

Figura 16 – Curva de *melting* representativa da maior Tm (76,80 °C) para o alelo AT do SNP rs113488022 no gene BRAF estudado em pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.



Fonte: Silva, A., 2022.

5 DISCUSSÃO

Dos 150 pacientes estudados e diagnosticados com Carcinoma basocelular do estado da Paraíba 73 eram do gênero masculino e 77 do gênero feminino, com predominância de faixa etária acima dos 50 anos de idade. Beiraghi, *et al.* (2017) observaram maior número de pacientes CBC, 63%, para o sexo masculino, com média de idade de 64 anos, já nas mulheres, a idade média foi de 67 anos, sendo o fator preponderante desses casos relacionados, a maior exposição à luz solar do gênero masculino.

De acordo com Saginala *et al.* (2021), o melanoma é mais comum em homens brancos, idosos, com idade média de diagnóstico de 65 anos. A exposição aos raios UV ao ar livre sem proteção é o principal fator de risco, embora câmaras de bronzeamento artificial, imunossupressão, histórico familiar e doenças congênitas raras, pintas e obesidade contribuam para a doença e o mesmo ocorre para o aparecimento do CBC. A média no número de gênero desse estudo foi de aproximadamente 50% entre os sexos, somente a idade corroborou com os achados.

Outros estudos relacionados com a mutação do gene BRAF apontam que mulheres diagnosticadas com melanoma possuem uma taxa de sobrevivência quase duas vezes maior que a dos homens. No entanto, recentes descobertas mostram que a chave para a maior sobrevivência da população feminina parece estar ligada aos genes no cromossomo X. Ao avaliar os genes no cromossomo X, os autores observaram a associação de dois genes (KDM6A e ATRX) principalmente na sobrevivência em pacientes diagnosticadas com melanoma. Altos níveis de expressão desses genes podem ajudar o sistema imunológico feminino a combater o câncer (EMRAN, *et al.*, 2020).

Estudos com agricultores portadores de CBC mostraram que há uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da doença na região do nariz e bochechas em relação as áreas da orelha, lábios, couro cabeludo e olhos (SZEWCZYK *et al.*, 2016). Estes achados em relação a localização do tumor são consistentes com a influência da radiação UV e corroboram com os dados do presente trabalho, que demonstraram áreas da cabeça e pescoço mais suscetíveis em relação as outras localizações anatômicas.

Uma das técnicas para a detecção de SNPs como o método PCR alelo específico estendido foi utilizada nesse estudo por se tratar de associação de SNP na susceptibilidade do Carcinoma basocelular. De acordo com Calixto *et al.* (2017) a substituição da base em uma sequência de DNA em uma região pode alterar a regulação gênica no nível pós-

transcricional, surgindo novos locais de processamento e alterando elementos reguladores de *Splicing* podendo causar a formação do câncer.

O perfil genômico mostra que muitos tumores sólidos são caracterizados por aberrações específicas podendo ser utilizadas para opções terapêuticas para muitos pacientes. A via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) é uma via chave de sinalização celular envolvida na regulação do crescimento, proliferação e sobrevivência celular (DANKER, M *et al.* 2018).

Segundo os mesmos autores, mutações no gene BRAF na via MAPK, são descritas em vários tipos de tumores, incluindo subconjuntos de melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e câncer de tireoide anaplásico (ATC), tornando o BRAF um alvo desejável para inibição. O presente trabalho é o primeiro estudo a utilizar essa técnica para avaliar a associação do SNP rs113488022 do gene BRAF com a suscetibilidade ao desenvolvimento do Carcinoma basocelular no estado da Paraíba.

Os resultados obtidos mostraram uma associação significativa dos SNPs rs113488022 no gene BRAF apresentando uma frequência do alelo polimórfico indicando que este SNP está em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* $X^2=16,167$ com o P-valor $<0,0003$, sugerindo suscetibilidade no desenvolvimento de CBC.

A pesquisa forneceu a prevalência da mutação *BRAF* em casos de CBC de pacientes da Paraíba. Embora vários tumores sejam detectados por estudos de PCR, significa que os tumores identificados terão melhor resposta ao tratamento. Assim, o uso de métodos de PCR para detecção de mutações pode ser mais viável e econômico para o prognóstico e a tomada de decisão terapêutica.

6 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que, em relação a frequência alélica do SNP rs113488022 do gene *BRAF* em amostras de pacientes com Carcinoma basocelular no estado da Paraíba, sugere que está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, podendo ser associado ao desenvolvimento de CBC nas amostras analisadas.

Dessa forma, o SNP estudado está estatisticamente associado a predisposição ao Carcinoma basocelular nas amostras analisadas dos pacientes, podendo ser utilizados como marcador molecular nos parâmetros de prognóstico, diagnóstico e tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABULAFIA, Jorge. Epiteliomas cutâneos: ensayo de clasificación histogenética. **An Bras Dermatol**, v. 38, p. 14-31, 1963.
- ANSARY, Tuba M. et al. Inflammatory Molecules Associated with Ultraviolet Radiation-Mediated Skin Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 3974, 2021.
- 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.
- DANKNER, M.; SHIVSHANKARI, R.; RAJKUMAR M. Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. **Oncogene**, 2018.
- EMRAN, A.; *et al.* Study of the female sex survival advantage in melanoma focus on X-linked epigenetic regulators and immune responses in two cohorts. **Cancers**. P108-118. (2020).
- SAGINALA, K.; ALURU, J.; RAWLA, P. Epidemiology of Melanoma. *Med Sci (Basilea)* 2021.
- BARTON, Virginia et al. Nonmelanoma skin cancer and risk of all-cause and cancer-related mortality: a systematic review. **Archives of dermatological research**, v. 309, n. 4, p. 243, 2017.
- BERGER, M. F. E GERRAWAY, L. A Application of Genomics in Melanoma Oncogene Discovery. **Hemetol Oncol Cliin North Am**, v. 23 p.397-414, 2009.
- BERTEMES-FILHO, P.; IMAI, F. A Comparison between Solar Radiation and Skin Cancer in South Brazil. In: **VII Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2016, Bucaramanga, Santander, Colombia, October 26th-28th, 2016**. Springer, Singapore, 2017. p. 453-456

BIRCH-JOHANSEN, Fatima et al. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancer in Denmark 1978–2007: rapid incidence increase among young Danish women. **International journal of cancer**, v. 127, n. 9, p. 2190-2198, 2010.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal stem cells of the skin. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 339–373, 2006.

BOARD, PDQ Adult Treatment Editorial. Skin Cancer Treatment (PDQ®). In: **PDQ Cancer Information Summaries [Internet]**. National Cancer Institute (US), 2020.

BRAGAZZI, Nicola Luigi et al. **Fasting and its impact on skin anatomy, physiology, and physiopathology: A comprehensive review of the literature**. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 249, 2019.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177–186, 1999. CAHOON, Elizabeth K. et al. Female estrogen-related factors and incidence of basal cell carcinoma in a nationwide us cohort. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 34, p. 4058–4065, 2015.

BUDDEN, Timothy; BOWDEN, Nikola A. The role of altered nucleotide excision repair and UVB-induced DNA damage in melanomagenesis. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 1, p. 1132-1151, 2013.

BURNS, Erin M. et al. Association of vitamin D receptor polymorphisms with the risk of nonmelanoma skin cancer in adults. **JAMA dermatology**, v. 153, n. 10, p. 983-989, 2017.

CHANG, J.-M.; GAO, X.-M. Clinical and histopathological characteristics of basal cell carcinoma in Chinese patients. **Chinese medical journal**, v. 126, n. 2, p. 211–4, 2013.

CORRÊA, Marcelo de Paula. Solar ultraviolet radiation: properties, characteristics and amounts observed in Brazil and South America. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 90, p. 297-313, 2015.

CRAYTHORNE, Emma; AL-NIAMI, Firas. Skin cancer. **Medicine**, v. 45, n. 7, p. 431-434, 2017.

DANAEI, Goodarz. 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.

DEPRY, Jennifer L. et al. Iatrogenic immunosuppression and cutaneous malignancy. **Clinics in Dermatology**, v. 29, n. 6, p. 602-613, 2011.

DORAN, Christopher M. et al. Estimating the economic costs of skin cancer in New South Wales, Australia. **BMC Public Health**, v. 15, n. 1, p. 952, 2015.

DUBAS, L. E.; INGRAFFEA, A. Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 43–53, 2013.

ESPINHA, Gisele et al. Rac1 GTPase-deficient HeLa cells present reduced DNA repair, proliferation, and survival under UV or gamma irradiation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 404, n. 1-2, p. 281–297, 2015.

FERLAY, Jacques et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International journal of cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

FRISONE, Daniele et al. A BRAF new world. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 152, p. 1-6, 2020.

GANDHI, S. A.; KAMPP, J. Skin Cancer Epidemiology, Detection, and Management. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 6, p. 1323–1335, 2015.

GRIFFIN, Liezel L.; ALI, Faisal Rehman; LEAR, John T. Non-melanoma skin cancer. **Clinical medicine**, v. 16, n. 1, p. 62, 2016.

GOLDENBERG, Gary et al. Incidence and prevalence of basal cell carcinoma (BCC) and locally advanced BCC (LABCC) in a large commercially insured population in the United States: A retrospective cohort study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2016.

GONZALEZ-DEL PINO, Gonzalo L. et al. Allosteric MEK inhibitors act on BRAF/MEK complexes to block MEK activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 36, 2021.

GUY, Gery P. et al. Prevalence and costs of skin cancer treatment in the U.S., 2002-2006 and 2007-2011. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 48, n. 2, p. 183–187, 2015.

HADE, Noora A.; RAMADHAN, Rehab S.; FARAJ, Moneer K. Genetic polymorphism in Braf gene associated with the incidence of brain tumors in a sample of Iraqi patients. **Biochem. Cell. Arch.** Vol. 20, No. 1, pp. 149-154, 2020.

HAEBERLE, H.; LUMPKIN, E. A. Merkel cells in somatosensation. **Chemosensory Perception**, v. 1, n. 2, p. 110–118, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of câncer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646 -74, 2011.

HASSAN, Mohamed M. et al. Bioinformatics approach for prediction of functional coding/noncoding simple polymorphisms (SNPs/Indels) in human BRAF gene. **Advances in bioinformatics**, v. 2016, 2016.

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

HIROBE, Tomohisa. Keratinocytes regulate the function of melanocytes. **Dermatologica Sinica**, v. 32, n. 4, p. 200-204, 2014.

HUSEIN-ELAHMED, Husein et al. Alcohol intake and risk of aggressive histological basal cell carcinoma: a case-control study. **European Journal of Dermatology**, v. 22, n. 4, p. 525-530, 2012.

Instituto Nacional do Câncer (Brasil). **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. 122 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 02 out. 2021.

Instituto Nacional do Câncer. INCA, 2020. **O que é câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 02 out. 2021.

JACOB A. Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face. **Dublin Hospital Report**, v.4, p. 232-239, 1827.

KARAGAS, Margaret R. et al. Reported use of photosensitizing medications and basal cell and squamous cell carcinoma of the skin: results of a population-based case-control study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 12, p. 2901-2903, 2007.

KHAN, Barkat A. et al. Human skin, aging and antioxidants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2012.

KNUDSON, Alfred G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 4, p. 820-823, 1971.

KIM, InYoung; HE, Yu-Ying. Ultraviolet radiation-induced non-melanoma skin cancer: Regulation of DNA damage repair and inflammation. **Genes & Diseases**, v. 1, n. 2, p. 188-198, 2014.

KIM, Sobin; MISRA, Ashish. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 9, p. 289-320, 2007.

KROMPECHER E. In: *Der Basalzellenkrebs*. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1903.

KUMAR, Sumir et al. A Study of Basal Cell Carcinoma in South Asians for Risk Factor and Clinicopathological Characterization: A Hospital Based Study. **Journal of Skin Cancer**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

LABANI, S. *et al.* Incidence of melanoma and nonmelanoma skin cancers in Indian and the global regions. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 17, n. 4, p. 906-911, 2021.

LEWIN, M.; CARUCCI, A. Advances in the management of basal cell carcinoma. **F1000prime Reports**, v. 7, P.1-8, 2015.

LIBRA, Massimo et al. Absence of BRAF gene mutation in non-melanoma skin

tumors. **Cell Cycle**, v. 5, n. 9, p. 968-970, 2006.

LICHTER, Michael D. et al. Therapeutic ionizing radiation and the incidence of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. **Archives of Dermatology**, v. 136, n. 8, p. 1007-1011, 2000.

LIU-SMITH, Feng; JIA, Jinjing; ZHENG, Yan. UV-induced molecular signaling differences in melanoma and non-melanoma skin cancer. **Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment**, p. 27-40, 2017.

LOMAS, A.; LEONARDI-BEE, J.; BATH-HEXTALL, F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 5, p. 1069-1080, 2012.

MADAN, Vishal; LEAR, John T.; SZEIMIES, Rolf-Markus. Non-melanoma skin cancer. **The Lancet**, v. 375, n. 9715, p. 673-685, 2010.

MARTIN, Michèle T.; VULIN, Adeline; HENDRY, Jolyon H. Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 349-368, 2016.

MATTHEWS, Helen K.; BERTOLI, Cosetta; DE BRUIN, Robertus AM. Cell cycle control in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1-15, 2021.

MENDAÇOLLI, Paola Jung *et al.* Nuclear morphometry and chromatin textural characteristics of basal cell carcinoma. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 90, n. 6, p. 874-878, Dec. 2015. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036505962015000600874&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 25 julho de 2016.

MENDAÇOLLI, Paola Jung *et al.* Nuclear morphometry and chromatin textural characteristics of basal cell carcinoma. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 90, n. 6, p. 874-878, 2015.

MOHAMMAD, Ebrahimzadeh-Ardakani et al. Assessment of clinical diagnostic accuracy compared with pathological diagnosis of basal cell carcinoma. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 6, n. 4, p. 258, 2015.

MOHAN, Shalini V.; CHANG, Anne Lynn S. Advanced basal cell carcinoma: epidemiology and therapeutic innovations. **Current dermatology reports**, v. 3, n. 1, p. 40-45, 2014.

MONTAGNA, Erik; LOPES, Otávio Sérgio. Molecular basis of basal cell carcinoma. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 92, p. 517-520, 2017.

NAGARAJAN, Priyadharsini et al. Keratinocyte carcinomas: current concepts and future research priorities. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 8, p. 2379-2391, 2019.

NIKOLAOU, V.; STRATIGOS, A. J.; TSAO, H. Hereditary Nonmelanoma Skin Cancer. **Semin Cutan Med Surg.**, v. 31, n. 4, p. 204–210, 2012.

NIINO, Mariko; MATSUDA, Tomohiro. Age-specific skin cancer incidence rate in the world. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 51, n. 5, p. 848-849, 2021.

NOUBISSI, Felicite K. et al. Role of CRD-BP in the growth of human basal cell carcinoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 6, p. 1718-1724, 2014.

OZGEDIZ, Doruk et al. Basal cell carcinoma does metastasize. **Dermatology online journal**, v. 14, n. 8, 2008.

PEREIRA, Samir. **RISCO DE CÂNCER DE PELE EM INDIVÍDUOS COM MENOS DE QUARENTA ANOS DE IDADE EM GOIÂNIA**. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/3385>>. Acesso em: 04 out. 2016.

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.

QUAZI, Sohail J. et al. Surgical margin of excision in basal cell carcinoma: a systematic review of literature. **Cureus**, v. 12, n. 7, 2020.

REVENGA ARRANZ, F. et al. Descriptive epidemiology of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma in Soria (north-eastern Spain) 1998–2000: a hospital-based survey. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 18, n. 2, p. 137-141, 2004.

RISUEÑO, I. et al. Skin-on-a-chip models: General overview and future perspectives. **APL bioengineering**, v. 5, n. 3, 2021.

ROGERS, Howard W. et al. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer (keratinocyte carcinomas) in the US population, 2012. **JAMA dermatology**, v. 151, n. 10, p. 1081-1086, 2015.

SCHIERBECK, Juliane; VESTERGAARD, Tine; BYGUM, Anette. Skin cancer associated genodermatoses: a literature review. **Acta Derm Venereol**, v. 99, n. 4, p. 360-369, 2019.

SHI, Shan-Rong *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.

SCHLESSINGER, Daniel I. et al. Development of a Core Outcome Set for Basal Cell Carcinoma (BCC), Including Low-Risk and Advanced Tumors. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2022.

SIQUEIRA, Silvia de. **Avaliação fotoquimiopreventiva do extrato de maçã e da rutina em modelos de pele in vitro e in vivo**. 2014. 61 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2014.

SLOMINSKI, Andrzej T. et al. Melatonin, mitochondria, and the skin. **Cellular and molecular life sciences**, v. 74, n. 21, p. 3913-3925, 2017.4

SNG, Judy et al. Skin cancer trends among Asians living in Singapore from 1968 to 2006. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 3, p. 426–432, 2009.

SOTIROPOULOU, Panagiota A.; BLANPAIN, Cedric. Development and homeostasis of the skin epidermis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 7, 2012.

STANDRING, Susan (Ed.). **Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice**. Elsevier Health Sciences, 2020.

SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

SURDU, Simona et al. Occupational exposure to arsenic and risk of nonmelanoma skin cancer in a multinational European study. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 9, p. 2182-2191, 2013.

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.

TAN, Eugene. S. T. et al. Basal cell carcinoma in Singapore: A prospective study on epidemiology and clinicopathological characteristics with a secondary comparative analysis between Singaporean Chinese and Caucasian patients. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 175–179, 2015.

TIBA, Chigueru; SILVA LEAL, Sérgio da. Enhancement of UV radiation by cloud effect in NE of Brazil. **International Journal of Photoenergy**, v. 2017, 2017.

TRAGER, Megan H. et al. Biomarkers in melanoma and non-melanoma skin cancer prevention and risk stratification. **Experimental dermatology**, 2020.

VECCHIATO, Marco et al. Skin cancers in Italian lung transplant recipients: Incidence and risk factors analysis. *Dermatologic Therapy*, v. 34, n. 2, p. e14749, 2021.

VERKOUTEREN, J. A. C. et al. Epidemiology of basal cell carcinoma: scholarly review. **British Journal of Dermatology**, v. 177, n. 2, p. 359-372, 2017.

WU, Timothy P.; STEIN, Jennifer A. Nonmelanoma skin cancer in young women. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 12, n. 5, p. 568-572, 2013.

WRIGHT, Fiona; WELLER, Richard 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.

YIN, Kelvin; STURM, Richard A.; SMITH, Aaron G. MC1R and NR4A receptors in cellular stress and DNA repair: implications for UVR protection. **Experimental dermatology**, v. 23, n. 7, p. 449-452, 2014.

YOUSSEF, Khalil Kass et al. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. **Nature cell biology**, v. 12, n. 3, p. 299–305, 2010.

ZENGARINI, Corrado et al. BRAF V600K vs. BRAF V600E: a comparison of clinical and dermoscopic characteristics and response to immunotherapies and targeted therapies. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, n. 6, p. 1131-1136, 2022.

ZINK, Beatrix Sabóia. Câncer de pele: a importância do seu diagnóstico, tratamento e prevenção **Revista HUPE**. v. 13, p. 76–83, 2014.

Dados da amostra de pacientes com Carcinoma basocelular utilizados no desenvolvimento da dissertação.

Nº	Sexo	Idade	Localização	Tipo Histológico
1	Feminino	78	Auricular	Esclerodermiforme
2	Masculino	66	Auricular	Nodular ulcerado
3	Masculino	65	Malar	Nodular pigmentado
4	Masculino	65	Malar	Nodular pigmentado
7	Feminino	77	Temporal	Superficial, multifocal
8	Masculino	66	Auricular	Nodular ulcerado
9	Feminino	81	Nasal	Nodular ulcerado
11	Feminino	78	Sulco nasolabial	Nodular ulcerado
12	Masculino	78	Auricular	Nodular ulcerado
13	Feminino	57	Nasal	Esclerodermiforme
14	Masculino	83	Orbital	Nodular pigmentado
15	Feminino	74	Auricular	Nodular
16	Feminino	78	Nasal	Nodular pigmentado
17	Masculino	70	Auricular	Nodular
18	Feminino	53	Nasal	Basoescamoso nodular
19	Masculino	85	Nasal	Superficial
20	Feminino	74	Malar	Nodular pigmentado
21	Feminino	57	Mandibular	Infiltrado tecido fibroso
22	Masculino	51	Clavicular	Nodular
23	Masculino	78	Joelho	Nodular
24	Feminino	63	Nasal	Nodular
25	Feminino	*	Clavicular	Nodular
26	Masculino	78	Malar	Superficial
27	Feminino	69	Nasal	Nodular
28	Masculino	78	Nasal	Nodular
29	Masculino	72	Nasal	Nodular
30	Masculino	92	Esternal	Nodular

Cont. Dados da amostra de pacientes com Carcinoma basocelular utilizados no desenvolvimento da dissertação.

31	Masculino	59	Orbital	Superficial multifocal
32	Feminino	61	Malar	Superficial pigmentado
33	Feminino	65	Orbital	Nodular
34	Feminino	82	Nasal	Nodular pigmentado
35	Feminino	53	Torácica	Pigmentado, ulcerado
37	Feminino	58	Nasal	Superficial multifocal
38	Feminino	68	Nasal	Nodular
39	Feminino	58	Sulco nasolabial	Nodular
41	Masculino	45	Temporal	Nodular
42	Masculino	45	Clavicular	Superficial multifocal
44	Masculino	86	Auricular	Nodular
45	Masculino	78	Nasal	Nodular
46	Feminino	53	Orbital	Nodular
47	Masculino	92	Esternal	Nodular
48	Feminino	58	Nasal	Nodular
49	Masculino	47	Nasal	Nodular
50	Masculino	81	Abdômen	Nodular
51	Masculino	77	Auricular	Ulcerado
52	Masculino	70	Nasal	Nodular
53	Masculino	77	Nasal	Ulcerado
54	Feminino	55	Membro superior	Superficial, multifocal
55	Masculino	89	Temporal	Nodular
56	Feminino	80	Cervical	Nodular
57	Masculino	94	Esternal	Superficial
58	Feminino	74	Orbital	Nodular
59	Masculino	54	Labial	Nodular
60	Feminino	74	Nasal	Nodular
61	Feminino	70	Nasal	Nodular, ulcerado
62	Feminino	80	Malar	Nodular
63	Feminino	66	Auricular	Nodular
64	Feminino	69	Nasal	Nodular

Cont. Dados da amostra de pacientes com Carcinoma basocelular utilizados no desenvolvimento da dissertação.

65	Masculino	86	Mandibular	Nodular, pigmentado
66	Feminino	62	Orbital	Nodular, pigmentado
67	Feminino	70	Malar	Nodular, pigmentado
68	Masculino	94	Auricular	Superficial
69	Masculino	66	Nasal	Nodular, pigmentado
70	Feminino	36	Nasal	Nodular
71	Feminino	70	Torácica	Nodular, pigmentado
72	Masculino	53	Frontal	*
73	Masculino	54	Nasal	Nodular
74	Masculino	51	Auricular	Nodular
75	Masculino	*	Nasal	Nodular
76	Feminino	69	Couro cabeludo	Nodular
77	Feminino	71	Orbital	Nodular
78	Feminino	71	Malar	Esclerodermiforme
79	Masculino	62	Malar	Nodular
81	Feminino	71	Malar	Esclerodermiforme
82	Feminino	67	Nasal	Nodular
83	Masculino	88	Cervical	Esclerodermiforme ulcerado
85	Feminino	83	Orbital	Esclerodermiforme ulcerado
86	Masculino	77	Nasal	Nodular ulcerado
88	Masculino	52	Nasal	Nodular
89	Feminino	*	Clavicular	*
90	Masculino	97	Auricular	Nodular/Superficial
91	Feminino	68	Malar	Nodular
92	Feminino	68	Orbital	Nodular
94	Masculino	70	Mentoniana	Nodular
95	Feminino	90	Malar	*
96	Feminino	75	Malar	Esclerodermiforme ulcerado

Cont. Dados da amostra de pacientes com Carcinoma basocelular utilizados no desenvolvimento da dissertação.

97	Masculino	51	Cervical	Nodular
98	Feminino	20	Frontal	Esclerodermiforme
99	Masculino	83	Malar	Nodular
100	Masculino	33	Temporal	Nodular pigmentado
101	Feminino	40	Orbital	Nodular
102	Feminino	75	Auricular	Nodular/ulcerado
103	Feminino	40	Labial	Nodular
104	Masculino	36	Nasal	Nodular/ulcerado
105	Feminino	38	Torácica	Superficial
106	Masculino	51	Esternal	Nodular
107	Feminino	63	Membro superior	Nodular
108	Feminino	72	Malar	Nodular
109	Feminino	89	Auricular	Nodular
110	Masculino	71	Membro superior	Nodular
111	Feminino	58	Malar	Nodular
112	Masculino	54	Membro superior	Nodular ulcerado
113	Masculino	71	Orbital	Nodular
114	Feminino	77	Auricular	Nodular ulcerado
115	Feminino	75	Nasal	Nodular
116	Feminino	38	Torácica	Nodular
117	Feminino	63	Malar	Nodular
118	Masculino	54	Clavicular	Nodular ulcerado
120	Feminino	57	Nasal	Nodular
122	Feminino	65	Orbital	Nodular
123	Feminino	65	Frontal	Nodular
124	Feminino	48	Nasal	Superficial
125	Masculino	85	Nasal	Nodular
127	Feminino	56	Malar	Esclerodermiforme
128	Feminino	71	Mandibular	Superficial
129	Feminino	58	Labial	Nodular
130	Feminino	78	Torácica	Nodular, ulcerado

Cont. Dados da amostra de pacientes com Carcinoma basocelular utilizados no desenvolvimento da dissertação.

131	Masculino	51	*	Nodular
132	Feminino	68	Mentoniana	Nodular
133	Masculino	63	Cervical	Nodular pigmentado ulcerado
134	Masculino	60	Frontal	Nodular
135	Masculino	88	Nasal	Nodular
136	Masculino	95	Orbital	Nodular
137	Feminino	29	Membro superior	Nodular ulcerado
138	Masculino	69	Cervical	Nodular ulcerado
139	Feminino	66	Nasal	Nodular
140	Masculino	64	Nasal	Pigmentado/superficial
141	Masculino	88	Orbital	Nodular
142	Masculino	88	Torácica	Nodular
143	Feminino	52	Nasal	Nodular
144	Feminino	52	Clavicular	Superficial, multifocal
145	Masculino	88	Nasal	Nodular
146	Feminino	67	Orbital	Nodular ulcerado
147	Feminino	58	Nasal	Nodular
148	Masculino	46	Malar	Nodular
149	Feminino	83	Nasal	Nodular
150	Masculino	43	Esternal	Superficial, multifocal
151	Masculino	43	Frontal	Superficial, multifocal
152	Masculino	43	Cervical	Superficial, multifocal
153	Masculino	43	Clavicular	Superficial, multifocal
154	Feminino	*	Auricular	Nodular
155	Feminino	83	Nasal	Nodular
156	Feminino	63	Orbital	Nodular Esclerodermiforme
157	Feminino	78	Temporal	Nodular/ Superficial, Ulcerado
158	Masculino	58	Clavicular	Nodular ulcerado

Cont. Dados da amostra de pacientes com Carcinoma basocelular utilizados no desenvolvimento da dissertação.

159	Masculino	53	Clavicular	Superficial
160	Masculino	53	Cervical	Superficial
161	Masculino	72	Mandibular	Nodular
169	Masculino	79	Menmbro superior	Nodular ulcerado
171	Masculino	59	Malar	Nodular

* não determinado no prontuário do paciente.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
CAMPUS I - CIDADE UNIVERSITÁRIA CEP 58051-900 - JOÃO PESSOA - PB
Telefone: (83) 3216-7987
E-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a empresa **BIOENSAIOS & DIAGNÓSTICO LABORATÓRIOS CLÍNICOS LTDA (GENETIC)**, inscrita no CNPJ sob o nº **28.850.500/0001-31**, autorizou o uso do método Alelo Específico Expandido – PCR (AEE-PCR) para subsidiar a dissertação "Associação do SNP rs113488022 do gene BRAF à susceptibilidade ao Carcinoma Basocelular pelo método Alelo Específico Expandido – PCR em amostras de pacientes da Paraíba" do discente Alfredo de Araújo Silva sob minha orientação, que será apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM/CCEN/ UFPB em 12/2022 na cidade de João Pessoa do Estado da Paraíba.

João Pessoa, 20 de novembro de 2022.

Dr. Leonardo Ferreira Soares/ Orientador
Professor Permanente do PPGBCM/CCEN/UFPB

“Association of the BRAF gene rs113488022 SNP in the susceptibility of Basocelullar Carcinoma using the extended allele-specific PCR method in samples from the Northeast region of Brazil”

Authors:

Alfredo de Araújo Silva^{1,3} MS, Ronne Richard Ferreira Santos^{1,3} BA, Sylvia Satomi Takeno Herrero¹ PHD, João Ricardo Gonçalves de Oliveira¹ PHD, Otavio Sérgio Lopes² PHD, Eleonidas Moura Lima^{1,3} PHD, Leonardo Ferreira Soares³ PHD.

Affiliations:

- 1) Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética – LBMEO - Universidade Federal da Paraíba – PB – Brasil.
- 2) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; Clínica Dermatológica Santa Catarina – PB – Brasil.
- 3) Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal da Paraíba – PB – Brasil.

Corresponding

Alfredo de Araújo Silva

Address – Departamento de Biologia Molecular - Universidade Federal da Paraíba – PB – Brasil.

E-mail – alfredoas100@gmail.com

ABSTRACT

Background: Basal cell carcinoma (BCC) is the most common type of skin tumor originating from basal epithelial cells with loss of its normal differentiation and keratinization ability. SNPs (Single nucleotide polymorphisms) are frequent in the population and present variations in the genome used as study targets for predisposition and susceptibility to cancer.

The alterations can affect the mechanisms of gene expression and can activate or inactivate genes. Our aim of this study was to perform genotyping of the BRAF gene rs113488022 SNP in BCC samples and determine the association of these SNPs with the susceptibility to the development of skin cancer and investigate the risk of recurrence in the Brazilian population.

The alterations can affect the mechanisms of gene expression and can activate or inactivate genes. Our aim of this study was to perform genotyping of the BRAF gene rs113488022 SNP in BCC samples and determine the association of these SNPs with the susceptibility to the development of skin cancer and investigate the risk of recurrence in the Brazilian population.

Methods: The modified allele-specific PCR method was the technique used for the genotyping of the samples. The BioEstat software version 5.3 was used to analyze the genotypic frequencies. We used the Hardy-Weinberg equilibrium and application of the chi-square test and a p-value<0.05.

Results: In total, 150 samples of paraffin tissue from patients in the Northeast region of Brazil with a histopathological diagnosis of BCC were analyzed. Our results suggest that the SNP rs113488022 is not in Hardy-Weinberg equilibrium, it presented a significant association with the BCC in the analyzed samples ($X^2=16.167$ and $P < 0.003$).

Conclusion: The results suggest that the SNP is statistically associated with the predisposition to Basal Cell Carcinoma in the samples analyzed from patients in the Northeast region of Brazil, thus being a possible molecular marker that could improve the parameters of prognosis, diagnosis and treatment.

Introdução

O Carcinoma basocelular (CBC) é o mais frequente no mundo, tendo uma incidência de 70%, dentre os cânceres de pele. O seu surgimento se dá a partir das próprias células basais da epiderme humana [1].

A radiação ultravioleta (UV) é um importante fator de risco no desenvolvimento do câncer, causa mutações no gene supressor de tumor [2]. A identificação precoce dessa doença é através de características clínicas e histopatológicas, onde são feitas intervenções que devem ser implantadas no início do prognóstico [3].

No Brasil, cerca de 30% de todos os registros de câncer, são de CBC. O Instituto Nacional do Câncer, em 2021, estimou a incidência de 177 mil novos casos da doença [4].

No genoma humano existem vários tipos de Polimorfismos de base única (SNPs), estando associados à progressão do câncer. Mutações presentes no gene codificador humano Raf quinase do tipo B (BRAF), são frequentes em melanomas. Entretanto, pouco estudadas em Carcinoma basocelular [5].

O presente estudo analisou a associação do SNP rs113488022 do gene BRAF a partir de amostras de material parafinado de pacientes, em uma região do nordeste brasileiro, com diagnóstico de CBC. A associação desse SNP com os tumores poderá fornecer informações importantes sobre a susceptibilidade na carcinogênese.

Material e Métodos

Amostras

No presente estudo foram analisadas 150 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 gênero, localização do tumor e tipo histológico. Foram admitidos no estudo os dados clínico-patológicos das amostras autorizados pelos pacientes, ou seus responsáveis legais quando informados do procedimento e ratificando o Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido (TCLE) que autoriza a utilização das amostras. Todas as amostras foram codificadas com o intuito de resguardar o direito à privacidade dos seus doadores, além de ser aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba – UFPB sob o código CAAE:36522614.2.3001.5883.

Extração

As amostras de DNA de tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA segundo Shang-Rong Shi *et al* (2002) [6], com modificações e extraídas no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO) – UFPB.

Validação *in silico*

O desenho dos primers do SNP (rs113488022) do gene BRAF foram desenhados com base no ncib, GenRunner, Blast, Ensembl (Figura 1).

PCR Alelo Específico Estendido

Este método consistiu em avaliar qualquer polimorfismo em uma única reação de PCR. Cada *primer* foi desenhado com uma sequência de cauda TTT gerando fragmentos de tamanhos e temperaturas de *melting* (T_m) diferentes correspondentes ao seu alelo específico, permitindo a sua discriminação.

Melting Curve Analysis

The melting curve was analysed to determine the temperature (T_M) used in the 7500 Fast Real-Time equipment (Life Technologies – Carlsbad, CA) during the real-time PCR reaction. SYBR® Green Mix reagent (Life Technologies – Carlsbad, CA) was required for curve analysis.

Análise Estatística

Allele frequencies and genotypic distributions were obtained by the Hardy-Weinberg equilibrium model. Statistical verification of the association of SNPs regarding susceptibility to CM development was performed using the q-square and Fisher tests using the R statistical tool (R Core Team, 2016) [7], where $P < 0.05$ was considered significant.

Resultado

Dos 150 pacientes com CBC, 73 foram do gênero masculino e 77 do gênero feminino apresentando uma predominância de faixa etária acima dos 50 anos de idade. A distribuição quanto a localização do tumor, evidenciando a incidência de tumores na região da cabeça e pescoço em relação as outras regiões como membros superiores, região do tronco e membros inferiores. A predominância do tipo histológico é caracterizada por nodular 115, superficial 22, esclerodermiforme 09, ulcerado 03 e infiltrante 01. O presente trabalho é o primeiro estudo a avaliar a associação desses SNPs com a suscetibilidade ao desenvolvimento do Carcinoma basocelular no estado da Paraíba. O estabelecimento e análise das frequências alélicas e genóticas dos SNPs, segundo o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Table 1) mostrou estar associado ao desenvolvimento de CBC nas amostras analisadas. A frequência alélica do SNP rs113488022 no gene BRAF obtida pelo método PCR alelo específico estendido foi de 70 indivíduos para o alelo ancestral A, 47 indivíduos para o alelo polimórfico T e 33 indivíduos para AT. Com a seguinte distribuição genotípica: 47% A/A (Lys/Lys), 31% TT (Arg/Arg) e 22 AT (Lys/Arg). A temperatura de *Melting* (T_m) observada para o alelo A variou de 72,67°C a 73,4°C (Figura 2), enquanto que o alelo T apresentou T_m em torno de 75,90°C a 76,75°C (Figura 3), já a alelo AT apresentou uma temperatura média dos alelos A e T (Figura 4).

Discussão

Dos 150 pacientes estudados e diagnosticados com carcinoma basocelular na Paraíba, 73 eram homens e 77 mulheres, com predomínio na faixa etária acima de 50 anos. Beiraghi, *et al.* (2017) [8] observaram maior número de pacientes CBC, 63%, para o sexo masculino, com média de idade de 64 anos, já nas mulheres, a idade média foi de 67 anos, sendo o fator preponderante desses casos relacionados, a maior exposição à luz solar do gênero masculino.

De acordo com Saginala *et al.* (2021) [9], o melanoma é mais comum em homens brancos, idosos, com idade média de diagnóstico de 65 anos. A exposição aos raios UV ao ar livre sem proteção é o principal fator de risco, embora câmaras de bronzamento artificial, imunossupressão, histórico familiar e doenças congênitas raras, pintas e obesidade contribuam para a doença e o mesmo ocorre para o aparecimento do CBC. A média no número de gênero desse estudo foi de aproximadamente 50% entre os sexos, somente a idade corroborou com os achados.

Outros estudos relacionados com a mutação do gene BRAF apontam que mulheres diagnosticadas com melanoma possuem uma taxa de sobrevivência quase duas vezes maior que a dos homens. No entanto, recentes descobertas mostram que a chave para a maior sobrevivência da população feminina parece estar ligada aos genes no cromossomo X. Ao avaliar os genes no cromossomo X, os autores observaram a associação de dois genes (KDM6A e ATRX) principalmente na sobrevivência em pacientes diagnosticadas com melanoma. Altos níveis de expressão desses genes podem ajudar o sistema imunológico feminino a combater o câncer [10].

Estudos com agricultores portadores de CBC mostraram que há uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da doença na região do nariz e bochechas em relação as áreas da orelha, lábios, couro cabeludo e olhos [11]. Estes achados em relação a localização do tumor são consistentes com a influência da radiação UV e corroboram com os dados do presente trabalho, que demonstraram áreas da cabeça e pescoço mais suscetíveis em relação as outras localizações anatômicas.

Uma das técnicas para a detecção de SNPs como o método PCR alelo específico estendido foi utilizada nesse estudo por se tratar de associação de SNP na susceptibilidade do Carcinoma basocelular. De acordo com Calixto *et al.* (2017) [12] a substituição da base em uma sequência de DNA em uma região pode alterar a regulação gênica no nível pós-transcricional, surgindo novos locais de processamento e alterando elementos reguladores de *Splicing* podendo causar a formação do câncer.

O reparo do material genético é primordial para a manutenção e estabilidade do genoma, contribuindo para manter a homeostase celular. Os SNPs são a variação genética mais comum, com prevalência de aproximadamente 4,5 milhões, distribuídos por todo o genoma, tanto em regiões codificantes como não codificantes do gene, podendo causar efeitos silenciosos, inofensivos ou nocivos [13].

O perfil genômico mostra que muitos tumores sólidos são caracterizados por aberrações específicas podendo ser utilizadas para opções terapêuticas para muitos pacientes. A via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) é uma via chave de sinalização celular envolvida na regulação do crescimento, proliferação e sobrevivência celular [14].

Segundo os mesmos autores, mutações no gene BRAF na via MAPK, são descritas em vários tipos de tumores, incluindo subconjuntos de melanoma, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e câncer de tireoide anaplásico (ATC), tornando o BRAF um alvo desejável para inibição. O presente trabalho é o primeiro estudo a utilizar essa técnica para avaliar a associação do SNP rs113488022 do gene BRAF com a suscetibilidade ao desenvolvimento do Carcinoma basocelular no Estado da Paraíba.

Os resultados obtidos mostraram uma associação significativa dos SNPs rs113488022 no gene BRAF apresentando uma frequência do alelo polimórfico indicando que este SNP está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* $X^2=16,167$ com o P-valor $<0,0003$, sugerindo suscetibilidade no desenvolvimento de CBC.

A pesquisa forneceu a prevalência da mutação *BRAF* em casos de CBC de pacientes da Paraíba. Embora vários tumores sejam detectados por estudos de PCR, significa que os tumores identificados terão melhor resposta ao tratamento. Assim, o uso de métodos de PCR para detecção de mutações pode ser mais viável e econômico para o prognóstico e a tomada de decisão terapêutica.

Conclusão

Os resultados sugerem que, em relação a frequência alélica do SNP rs113488022 do gene *BRAF* está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, podendo ser associado ao desenvolvimento de CBC nas amostras analisadas. Dessa forma, o SNP estudado está estatisticamente associado a predisposição ao Carcinoma basocelular nas amostras analisadas dos pacientes, podendo ser utilizados como um possível marcador molecular nos parâmetros de prognóstico, diagnóstico e tratamento.

REFERÊNCIAS

1. LEWIN, M.; CARUCCI, A. Advances in the management of basal cell carcinoma. **F1000prime Reports**, v. 7, P.1-8, 2015.
2. DEPRY, Jennifer L. et al. Iatrogenic immunosuppression and cutaneous malignancy. **Clinics in Dermatology**, v. 29, n. 6, p. 602-613, 2011.
3. NAGARAJAN, Priyadharsini et al. Keratinocyte carcinomas: current concepts and future research priorities. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 8, p. 2379-2391, 2019.
4. Instituto Nacional do Câncer. INCA, 2020. **O que é câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 02 out. 2021.
5. HASSAN, Mohamed M. et al. Bioinformatics approach for prediction of functional coding/noncoding simple polymorphisms (SNPs/Indels) in human BRAF gene. **Advances in bioinformatics**, v. 2016, 2016.
6. SHANG-RONG S, COTEL R J, WU L, et al (2002). DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. **The Journal of Histochemistry e Cytochemistry**. Thousand Oaks, CA. 50(8): 1005-1011.
7. R Core Team (2016) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
8. 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.
9. SAGINALA, K.; ALURU, J.; RAWLA, P. Epidemiology of Melanoma. *Med Sci (Basileia)* 2021.
10. *EMRAN, A.; et al. Study of the female sex survival advantage in melanoma focus on X-linked epigenetic regulators and immune responses in two cohorts. **Cancers**. P108-118. (2020).*
11. 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.
12. CALIXTO T.; Eugene. S. et al. Basal cell carcinoma in Singapore: A prospective study on epidemiology and clinicopathological characteristics with a secondary comparative

- analysis between Singaporean Chinese and Caucasian patients. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 175–179, 2015.
13. MAHDI, K. M. et al. Hereditary Genes and SNPs Associated with Breast Cancer. **Asian Pacific J Cancer Prev**, v. 14, n. 6, p. 3403-3409, 2013.
 14. DANKNER, M.; SHIVSHANKARI, R.; RAJKUMAR M. Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. **Oncogene**, 2018.