



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

RONNE RICHARD FERREIRA SANTOS

**RECEPTORES DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) E SEU
PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA BASOCELULAR (CBC)**

JOÃO PESSOA-PB

2024

RONNE RICHARD FERREIRA SANTOS

**RECEPTORES DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR) E SEU
PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA BASOCELULAR (CBC)**

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.

JOÃO PESSOA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237r Santos, Ronne Richard Ferreira.

Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)
e seu papel no desenvolvimento de Carcinoma Basocelular
(CBC) / Ronne Richard Ferreira Santos. - João Pessoa,
2024.

52 f. : il.

Orientação: Eleonidas Moura Lima.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Carcinoma basocelular. 2. Câncer. 3. Fator de
Crescimento Epidérmico - EGFR. I. Lima, Eleonidas
Moura. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616-006.6(043)

RONNE RICHARD FERREIRA SANTOS

Dissertação de mestrado avaliada em 29/04/2024

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima

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



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares

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



Prof. Dr. Otávio Sérgio Lopes

Examinador Externo

Prof. Dr. Augusto Cezar Vasconcelos de Freitas Junior

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

Prof. Dr. João Ricardo Gonçalves de Oliveira
Suplente Externo

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas e instituições que contribuíram para a realização deste trabalho:

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro concedido, que viabilizou a realização desta pesquisa.

Expresso minha gratidão ao Laboratório LBMEO e ao Laboratório Genetic pela disponibilidade de infraestrutura e recursos necessários para a condução dos experimentos.

Um agradecimento especial a João Ricardo e Sylvinha pelo suporte e colaboração ao longo deste estudo.

À minha esposa Eduarda Manuela, meu pilar de apoio e compreensão, agradeço por estar ao meu lado durante todo o processo.

Ao professor Eleonidas, meu orientador, pela orientação, incentivo e conhecimento compartilhado ao longo deste trabalho.

À minha família, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos, em especial Rodrigo Vilar e Milla Nunes, pelo suporte, amizade e compreensão durante essa jornada acadêmica.

A todos vocês, meu sincero agradecimento por fazerem parte desta conquista.

RESUMO

O Carcinoma Basocelular (CBC) é um dos tipos de tumores de pele mais frequentes, originado de células basais epiteliais que perderam sua capacidade de diferenciação e queratinização normais. Os Receptores do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), por sua vez, são proteínas de membrana que desempenham diversas funções na pele, à exemplo da regulação da proliferação celular, diferenciação celular, e cicatrização de feridas. Nesse tocante, O presente estudo analisou a associação dos SNPs rs121434569 e rs121434568 do gene EGFR em 142 amostras de material parafínico de pacientes com diagnóstico histopatológico de Carcinoma basocelular na Paraíba. As amostras foram submetidas à extração de DNA e PCR estendida para alelos específicos. A frequência alélica foi calculada a partir da frequência genotípica observada, enquanto a frequência genotípica esperada foi obtida através do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Para verificar se a frequência genotípica observada estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o teste *Qui-Quadrado*. Ao analisar a associação da frequência genotípica observada/esperada do SNP rs121434569 apresentou resultado de *Qui-Quadrado* de 76,92, com probabilidade de significância de 0,001, mostrando que a população está em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Da mesma forma, está em condições de desequilíbrio, pois apresentou $X^2 = 11,56$ e valor $P = 0,0054$, mostrando assim que o resultado é estatisticamente significativo para esta hipótese, pois $P < 0,05$. A expressão e atividade do EGFR desempenham um papel crucial na patogênese do CBC, uma vez que a frequência genotípica das amostras está em condições de desequilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Além disso, o método estendido de PCR alelo-específico possibilitou a associação com carcinoma basocelular, uma vez que as temperaturas de fusão dos SNPs apresentaram temperaturas bem estabelecidas para identificar os genótipos.

Palavras-chave: Câncer. Fator de Crescimento Epidérmico. Carcinoma Basocelular.

ABSTRACT

Basal Cell Carcinoma (BCC) is one of the most common types of skin tumors, originating from epithelial basal cells that have lost their capacity for normal differentiation and keratinization. Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR), in turn, are membrane proteins that perform various functions in the skin, such as regulating cell regulation, cell differentiation, and wound healing. In this sense, the present study analyzed the association of the SNPs rs121434569 of the EGFR 790 gene and rs121434568 of the EGFR 858 gene in 142 samples of paraffin material from patients with a histopathological diagnosis of basal cell carcinoma in Paraíba. The samples were subjected to DNA protection and PCR in detail for some specifics. The allele frequency was calculated from the observed genotype frequency, while the expected genotype frequency was obtained through the Hardy-Weinberg equilibrium. To verify whether the observed genotype frequency was in Hardy-Weinberg equilibrium, the Chi-Square test was used. When analyzing the observed/expected genotype frequency association of the SNP rs121434569 found that the Chi-Square was 76.92, with a probability of significance of 0.001, showing that the population is in Hardy-Weinberg imbalance. Likewise, rs121434568 is in unbalanced conditions, as it presented $X^2= 11.56$ and P value=0.0054, thus showing that the result is statistically significant for these cases, as $P<0.05$. EGFR expression and activity play a crucial role in the pathogenesis of BCC, since the genotype frequency of samples is in conditions of Hardy-Weinberg disequilibrium. Furthermore, the extended PCR method also enabled the association with basal cell carcinoma, since the melting temperatures of the SNPs observed very conditional temperatures to identify the genotypes.

Key-words: Cancer. Epidermal Growth Factor. Basal Cell Carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Localização do gene Receptor de Crescimento Epidérmico (EGFR) 09
- Figura 2** – Genótipo C/C do SNP rs121434569. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando uma Tm de 77,26°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo ancestral) Temperatura de Melting observada para o alelo C 17
- Figura 3** – Genótipo T/T do SNP rs121434569. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando uma Tm de 83,24°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo polimórfico) Temperatura de Melting observada para o alelo T 18
- Figura 4** – Genótipo C/T do SNP rs121434569. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando duas Tm diferentes, representando dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos. A figura mostra uma Tm menor 81,9°C (alelo ancestral) e outra maior de 86,96°C (alelo polimórfico) 19
- Figura 5** - Genótipo T/T do SNP rs121434568 no gene EGFR 858 para o alelo T. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando uma Tm de 77,58°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo ancestral) Temperatura de Melting observada para o alelo T 21
- Figura 6** - Genótipo G/G do SNP rs121434568. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando uma Tm de 80,48°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo polimórfico) Temperatura de Melting observada para o alelo G 22
- Figura 7** - Genótipo T/G do SNP rs121434569. Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando duas Tm diferentes, representando dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos. A figura mostra uma Tm menor 77,64°C (alelo ancestral) e outra maior de 85,54°C (alelo polimórfico) 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição genotípica e frequência alélica do SNP rs121434569.....	23
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Desenhos dos Primers: rs121434569 do gene EGFR/ T790M / ancestral C>T
..... 14

Quadro 2 – Desenhos dos Primers: rs121434568 do gene EGFR/ T790M / ancestral T>,G
..... 14

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AREG - anfiregulina

CBC – Carcinoma Basocelular

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*

EREG - Epiregulina

Hh – *hedgehog* (via de sinalização)

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MB – Meduloblastoma

NRG1 - Neuregulina

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

SNPs - Nucleotídeos de Polimorfismo Único

SNBC - Síndrome do Nervo Basocelular

TCF- β - *Transforming growth fator beta*

UV – Ultravioleta

WNT - *Wingless-type*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	6
2.1 CÂNCER.....	6
2.2 CARCINOMA BASOCELULAR (CBC).....	6
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	7
2.4 RECEPTORES DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)	8
2.5 GENE DO RECEPTOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)	9
3 OBJETIVOS.....	11
3.1 OBJETIVO GERAL.....	11
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	12
4.2 AMOSTRA.....	12
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINADO.....	12
4.4 TÉCNICA E DESENHO DOS INDICADORES.....	13
4.5 O MÉTODO PCR ALELO ESPECÍFICO ESTENDIDO.....	13
4.6 CONDIÇÕES DA PCR	14
4.7 ANÁLISE DA CURVA DE <i>Melting</i>	15
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
5 RESULTADOS	16
5.1 TEMPERATURA DE <i>Melting</i> (T_m).....	16
5.2 FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DOS SNPs rs121434569 e rs121434568	23
5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENÓTIPO OBSERVADO E GENÓTIPO ESPERADO POR MEIO DO TESTE QUI-QUADRADO	23

6 DISCUSSÃO	24
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma Basocelular (CBC) é um dos tipos de tumores de pele mais frequente que se origina de células basais epiteliais que perderam sua capacidade de diferenciação e queratinização normais. Os SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) ocorrem com frequência na população e essas variações no genoma podem ser alvo de estudo com predisposição à susceptibilidade a doenças, incluindo o câncer. As alterações podem afetar os mecanismos de expressão gênica possibilitando a ativação ou inativação do gene (TREU, ALMEIDA, OMAR, 2021, p.85).

A via Hh desempenha um papel importante na padronização e organogênese durante o desenvolvimento inicial. Em adultos atua no reparo e manutenção de tecidos. A relação da via HH com o CBC tem sido examinada desde o relato de mutações de perda de função do PTCH em pacientes com Síndrome do Nervo Basocelular (SNBC), doença autossômica dominante, caracterizada pela predisposição a tumores, especificamente o CBC, meduloblastoma (MB), entre outros (OTSUKA *et al.*, 2015).

A mutações em genes que atuam via de sinalização *Hedgehog* é a principal causa do surgimento do CBC, sendo esse tipo de tumor, o mais comum no mundo. Dessa forma, é importante conhecer os mecanismos de mutações que alteram o funcionamento da via e sua associação com o desenvolvimento de CBC.

No entanto, outras mutações e vias de sinalização específicas também desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e progressão do Carcinoma basocelular, como exemplo, o gene EGFR e suas mutações estão associados ao desenvolvimento de diversos tipos de carcinoma.

Na literatura, existe uma ausência na associação entre as mutações no gene EGFR e o Carcinoma basocelular, e isso pode estar relacionado à falta de limitações técnicas, falta de recursos ou foco em outras vias de sinalização, que desempenham um papel mais proeminente nesse tipo de câncer.

Dessa forma, objetivo do trabalho é estimar a associação dos SNPs do gene EGFR em questão à susceptibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma basocelular, e para isso foi realizado a genotipagem das amostras de tecidos parafinados de pacientes diagnosticados com Carcinoma Basocelular, através do método PCR alelo específico estendido.

Foram analisadas 142 amostras de tecidos parafinados, de pacientes do Estado da Paraíba, com diagnóstico histopatológico de CBC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÂNCER

O câncer é uma consequência de falhas de mecanismos que regulam o crescimento celular. Sistemas de controle genéticos realizam o equilíbrio entre nascimento e morte celular, em respostas a sinais de crescimento, de inibição de crescimento e de morte. O câncer ocorre quando esses sinais falham, causando um excesso de divisão celular (LODISH *et al*, 2014).

Segundo Meck e Shuys (2017), o tempo exerce um importante papel no câncer. Muitos anos são necessários para acumular mutações, além de uma longa exposição a carcinógenos (compostos químicos) ou radiação. O processo de oncogênese pode ocorrer em qualquer órgão ou tecido do corpo, e são determinados por três classes de genes mutados: os proto-oncogenes (que naturalmente promove a divisão celular, entretanto, com mutações, se transformam em oncogenes, resultando em excessivas promoções de crescimento), os genes supressores tumorais (limitam o crescimento, e quando silenciados, permitem divisões celulares inadequadas) e os genes *caretaker* (denominados genes de manutenção, entretanto, quando perdem sua função aumenta a instabilidade genômica).

2.2 CARCINOMA BASOCELULAR (CBC)

O Carcinoma Basocelular foi descrito pela primeira vez por Arthur Jacob em 1824. Em 1903, Krompecher sugeriu em sua publicação que as lesões que apareciam eram das células basais da epiderme, sendo o tumor, morfológicamente, semelhantes a estruturas foliculares.

Segundo o Inca (Instituto Nacional do Câncer) (2021), o CBC é o câncer mais frequente no Brasil, correspondendo cerca de 30% de todos os casos de tumores malignos registrados no país. Esse tipo de câncer de pele não melanoma é de menor mortalidade, porém, se não tratado, pode deixar mutilações bastante significativas.

Dessa forma, por ter essa característica de menor potencial para metástase, muitos médicos encaram, erroneamente, o CBC como uma lesão benigna, fazendo com que o tratamento seja menosprezado e malconduzido, levando assim, a sucessivas recidivas e um caráter altamente destrutivo (TREU, ALMEIDA, OMAR, 2021, p.85).

Atinge, principalmente, pessoas de pele clara, com histórico de grandes períodos de exposição ao sol. É mais frequente em idosos, mas, os índices em jovens vêm aumentando cada vez mais. Clinicamente, os pacientes se queixam de uma lesão crescente que não cicatriza, e que as vezes pode sangrar, se queixam de prurido, ou não relatam nenhum sintoma (CAMERON, *et al.*, 2019).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

O CBC é a neoplasia cutânea com maior frequência, correspondendo a 70-80% dos tumores. A proporção de ocorrência é de oito a dez para cada melanoma diagnosticado. No Brasil, o Inca registra, a cada ano, 180 mil novos casos, sendo em torno de 60% homens, e 40% mulheres. Especula-se que os homens decorram de maior exposição ao sol, provavelmente, por razões profissionais. Entretanto, essa diferença vem diminuindo ao longo do tempo, pois, o Inca estimou novos casos para 2020 de 83.700 homens e 93.160 mulheres (BRASIL, 2021).

Os índices brasileiros variam de acordo com a região e composição étnica da população, tendo as regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste mais casos que a região Norte e Nordeste, com média de 103,89/100 mil e 47,28/100 mil, respectivamente (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Os fatores de riscos constitucionais mais relevantes para o desenvolvimento de CBC são: fototipos claros (I e II, para a classificação de Fitzpatrick), histórico familiar (30-60%), sarda na infância, e pele, olhos ou cabelos claros. Peles claras tem risco dez a vinte vezes mais de desenvolver CBC do que peles escuras, mesmo quando vivem na mesma região (CHINEM E MIOT, 2011).

Frequentemente, o CBC ocorre em idosos, e em mais da metade dos casos entre pessoas de 50 e 80 anos. Entretanto, tem-se observado crescentes casos de CBC na população com menos de 40 anos, com o aparecimento de leões no tronco, de subtipo superficial, e uma das hipóteses levantadas por Chinem e Miot (2011) é a alta exposição solar recreativa e desprotegida.

Sem dúvidas, a radiação Ultravioleta (UV) é, isoladamente, o fator de risco mais importante para o CBC, especialmente a UVB. A intensa e a intermitente exposição leva ao desenvolvimento da doença, atingindo o pico por volta de 30.000 horas acumuladas. Além disso, a radiação UV altera, por meio de polimorfismos de nucleotídeo único ou

mutações esporádicas, os genes p53 e *Patched Homolog 1* (PTCH1), os quais desempenham função de supressores tumorais (TREU, ALMEIDA, OMAR, 2021, p.87).

A ativação do gene PTCH1 produz uma proteína transmembrana de mesmo nome, que é ativada via sinalização *hedgehog* (Hh). Ela ativa outro componente proteico que está na membrana, o *Smoothened* (SMO), que por sua vez promove a transcrição de genes - TCF- β (*transforming growth factor beta*), WNT (*wingless-type*) - que facilitam o crescimento e diferenciação celular. Dessa forma, a inativação de PTCH1 inibe Smo, bloqueando assim a expressão desses genes alvos (PINO, *et al.*, 2016).

2.4 RECEPTORES DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

Os Receptores do Fator de Crescimento Epidérmico, *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), são proteínas de membrana que desempenham diversas funções importantes no organismo, especialmente na pele, como regulação da proliferação celular, diferenciação celular, e cicatrização de feridas (KAZUKI, 2016);

Os fatores de crescimento epidérmico que se ligam aos receptores de EGFR incluem, o fator de crescimento epidérmico (EGF), a epiregulina (EREG), a anfiregulina (AREG) e a neuregulina 1 (NRG1). Quando esses fatores se ligam aos receptores, várias vias de sinalização são ativadas para promover a proliferação celular. Algumas das principais vias de sinalização envolvidas incluem: Via MAPK (quinase ativada por mitógeno), resultante da fosforilação e ativação de proteínas que regulam a expressão gênica. Via de sinalização PI3K/AKT, que desempenha um papel na regulação da sobrevivência celular, crescimento e proliferação. E a Via JAK/STAT, que está envolvida na regulação da proliferação celular, diferenciação e resposta imune (BORETTO *et al.*, 2024).

Além disso, a sinalização do EGFR não ocorre apenas na membrana plasmática, mas também nos endossomos após a internalização do receptor. A regulação da sinalização da EGFR é essencial para manter a homeostase celular, uma vez que a sinalização excessiva pode levar ao desenvolvimento e progressão de várias formas de câncer (HANAFUSA, *et al.*, 2023).

Um dos cânceres que o EGFR desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão, é o de pele. A ativação anormal do EGFR está associada ao Carcinoma de Células Escamosas e Carcinoma Basocelular. A superexpressão ou mutações nos receptores do EGFR podem levar a um crescimento celular descontrolado e resistência à

apoptose, contribuindo assim para a formação e progressão do câncer de pele (CHANG, R.; *et al.*, 2002).

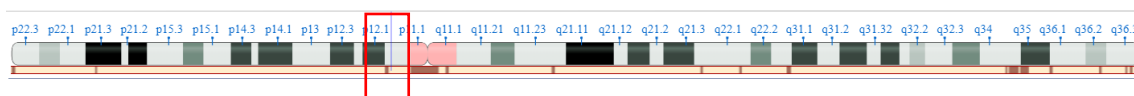
Além disso, a inibição seletiva do EGFR tem sido uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento de certos tipos de câncer de pele. No entanto, a terapia direcionada ao EGFR, estão, também, associadas a efeitos colaterais cutâneos, como erupções cutâneas, devido à sua influência na regulação da pele e na resposta inflamatória (CHANG, R.; *et al.*, 2002).

2.5 GENE DO RECEPTOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGFR)

O gene EGFR está localizado na região 7p55.1 (Figura 1), tendo 32 éxons, com tamanho de 195kb. Codifica uma proteína que tem atividade na membrana plasmática, contendo 1210 aminoácidos, apresentando peso molecular de, aproximadamente, 180 kDa (BORETTO *et al.*, 2024).

A tradução de EGFR ocorre no Retículo Endoplasmático. Essa proteína de membrana, que pertence à família dos receptores tirosina quinase, é sintetizada nos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático. Após a tradução, o EGFR é processado e transportado para a membrana plasmática, onde desempenha suas funções de sinalização celular em resposta a fatores de crescimento (HERRANZ, *et al.* 2015).

Figura 1 - Localização do gene Receptor de Crescimento Epidérmico (EGFR)



Fonte: Página do National Center of Biotechnology Information

2.6 POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP)

Polimorfismo de nucleotídeo único é o tipo mais comum de variação genética humana, gerando sequências alteradas (alelos), onde o alelo menos frequente tem a abundância de cerca de 1% ou mais na população (SOUZA, *et al.*, 2020).

A maior incidência de polimorfismo na população sugere que esse mecanismo ocorra naturalmente, tendo efeito neutro ou benéfico. Entretanto, essas variações no genoma podem ser alvo de estudo à susceptibilidade a doenças, incluindo o câncer (KARKI, 2015).

Segundo Pesz *et al.*, (2014), vários estudos de caso investigaram a influência de SNPs no desenvolvimento do CBC, principalmente, em genes envolvidos na via Hedgehog. Os autores ainda afirmam que, os SNPs determinam a diversidade genética de uma população, podendo ser usados como marcadores, a fim de, contribuir no prognóstico de pacientes susceptíveis a CBC, explicar sua evolução clínica e resposta terapêutica.

O presente estudo analisou a associação dos SNP rs121434569 e rs121434568 do gene EGFR 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.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a associação dos SNPs do gene EGFR em questão à susceptibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma basocelular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer a frequência alélica e genotípica dos SNPs no gene EGFR em amostras de Carcinoma basocelular.

Realizar a genotipagem dos SNPs presentes nos genes EGFR em amostras de tecidos parafinados e frescos de pacientes diagnosticados com Carcinoma Basocelular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa, por envolver seres humanos, obedece estritamente às especificações bioéticas contidas na Resolução 466/2012 (Conselho Nacional de Saúde, 1996), respeitando os princípios da autonomia, da não maleficência e da beneficência.

4.2 AMOSTRA

Foram analisadas 142 amostras de tecidos parafinados de pacientes diagnosticados com Carcinoma basocelular.

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

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINADO

As amostras de tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA seguindo o método de 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, foram adicionados 1,5mL de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizado com inversões suaves por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, a solução homogeneizada será 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 será desidratado em estufa a 60°C. após a secagem o DNA é ressuspenso em 200 µl de água Milli-Q estéril.

4.4 TÉCNICA E DESENHO DOS INDICADORES

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

4.5 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.

Quadro 1 - Desenhos dos Primers: rs121434569 do gene EGFR/ T790M / ancestral C>T

EGFR790/cF	5'-GCCTCACCTCCACCGTGCAVCTCATCAC-3' / Tm: 60°C
EGFR90/tF	5'- TTTTTTTTTT GCCTCACCTCCACCGTGCAVCTCATCAT-3' / Tm: 60°C
EGFR790/R	5'-CAGACCGCATGTGAGGATCCTGGCTCC-3' / Tm: 60°C
Amplicons:	
Alelo C: 191pb; Alelo T: 201pb	

Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

Quadro 2 - Desenhos dos Primers: rs121434568 do gene EGFR/ T790M / ancestral T > A, G

EGFR858/tF	5'-GCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCT-3' / Tm: 60°C
EGFR858/gF	5'- TTTTT GCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCG-3' / Tm: 60°C
EGFR858/aF	5'- TTTTTTTTTT GCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCA-3' / Tm: 60°C
EGFR858/R	5'-GTTCCCAAAGCAGCTCTGGCTCACACTACC-3' / Tm: 60°C
Amplicons:	
Alelo T: 277pb; Alelo G: 282pb; Alelo A: 287pb	

Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

4.6 CONDIÇÕES DA PCR

A PCR foi realizada num volume final de 25µl contendo, 14µl de MasterMix (Promega – Madison - USA), 1µl de *primer* mix, 1µl de *primer* R, 100ng/µl de DNA da amostra, e 7µl de água ultrapura. As condições da PCR foram: um ciclo de pré-desnaturação durante 2 minutos a 50°C, e desnaturação durante 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de anelamento e extensão a 60°C, durante 1 minuto, e desnaturação a 95°C, durante 15 segundos.

Quadro 3 - Programação no termociclador da reação de PCR para os SNPs rs121434569 e rs121434568 do gene EGFR

Nº de Ciclos	Etapas	Temperaturas	Tempo
1	Desn. Inicial	50°C	2 min
	Desnaturação	95°C	10 min
40	Desnaturação	95°C	15 seg
	Anelamento e extensão	60°C	1 min

Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

4.7 ANÁLISE DA CURVA DE *Melting*

Para a determinação e análise da curva de *melting* (T_m) foi realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA), seguindo, as condições: Pré-aquecimento a partir de 60°C a 95°C durante 15 segundos, reduzindo, posteriormente, a 60°C, onde permaneceu por 1 minuto, seguido de um aquecimento gradual (1°C por minuto) até a temperatura de 95°C durante 30 segundos. A análise da curva foi realizada por meio do SYBR Green 2X e Rox1 presentes no MasterMix (*Promega – Madison - USA*).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A frequência alélica foi calculada a partir da frequência genotípica observada, levando em consideração a quantidade de alelos presentes em cada genótipo. Já a frequência genotípica esperada, foi obtida por meio do equilíbrio, segundo a lei de *Hardy-Weinberg*.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg é um princípio genético fundamental que fornece a base para muitas análises em genética populacional. Em condições ideais, onde não há fatores evolutivos atuando, a frequência genotípica de uma população se manteria constante ao longo do tempo. Contudo, as observações de desequilíbrio podem indicar que forças como seleção natural, deriva genética ou mutação estão ativas, influenciando a frequência de determinados alelos, como observado nos SNPs do gene EGFR estudados (Hartl & Clark, 1997).

Para verificar se a frequência genotípica observada estava ou não em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi utilizado o teste de Qui-Quadrado, sendo considerado 5%, o nível de confiança.

5 RESULTADOS

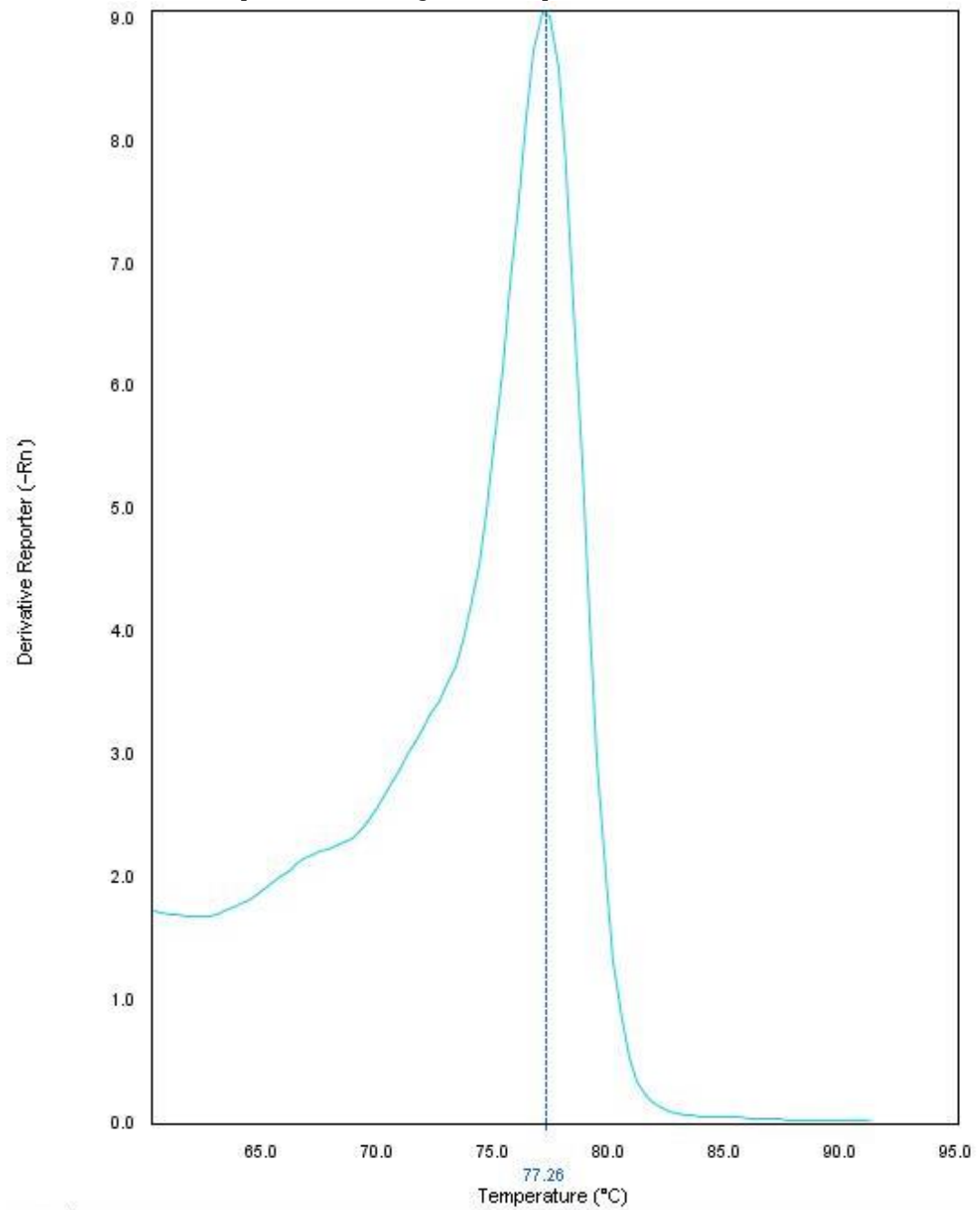
5.1 TEMPERATURA DE *Melting* (T_m)

As temperaturas de *Melting* (T_m) do SNP rs121434569 foram, em média, 76,9°C, para o genótipo C/C (Figura 2), enquanto o genótipo T/T apresentara uma T_m média de 82°C (Figura 3). Já os indivíduos com genótipo C/T, apresentaram duas temperaturas médias, uma de 75,5°C, e outra de 81,1°C (Figura 4).

As temperaturas de *Melting* (T_m) do SNP rs121434568 foram, em média, 76,3°C, para os indivíduos homozigotos do alelo ancestral T (Figura 5), enquanto, indivíduos homozigotos, para o alelo G, apresentaram uma T_m média de 82,8°C (Figura 6). Já os indivíduos heterozigotos para os alelos T/G, apresentaram duas temperaturas médias, uma de 76,7°C, e outra de 84,5°C (Figura 7).

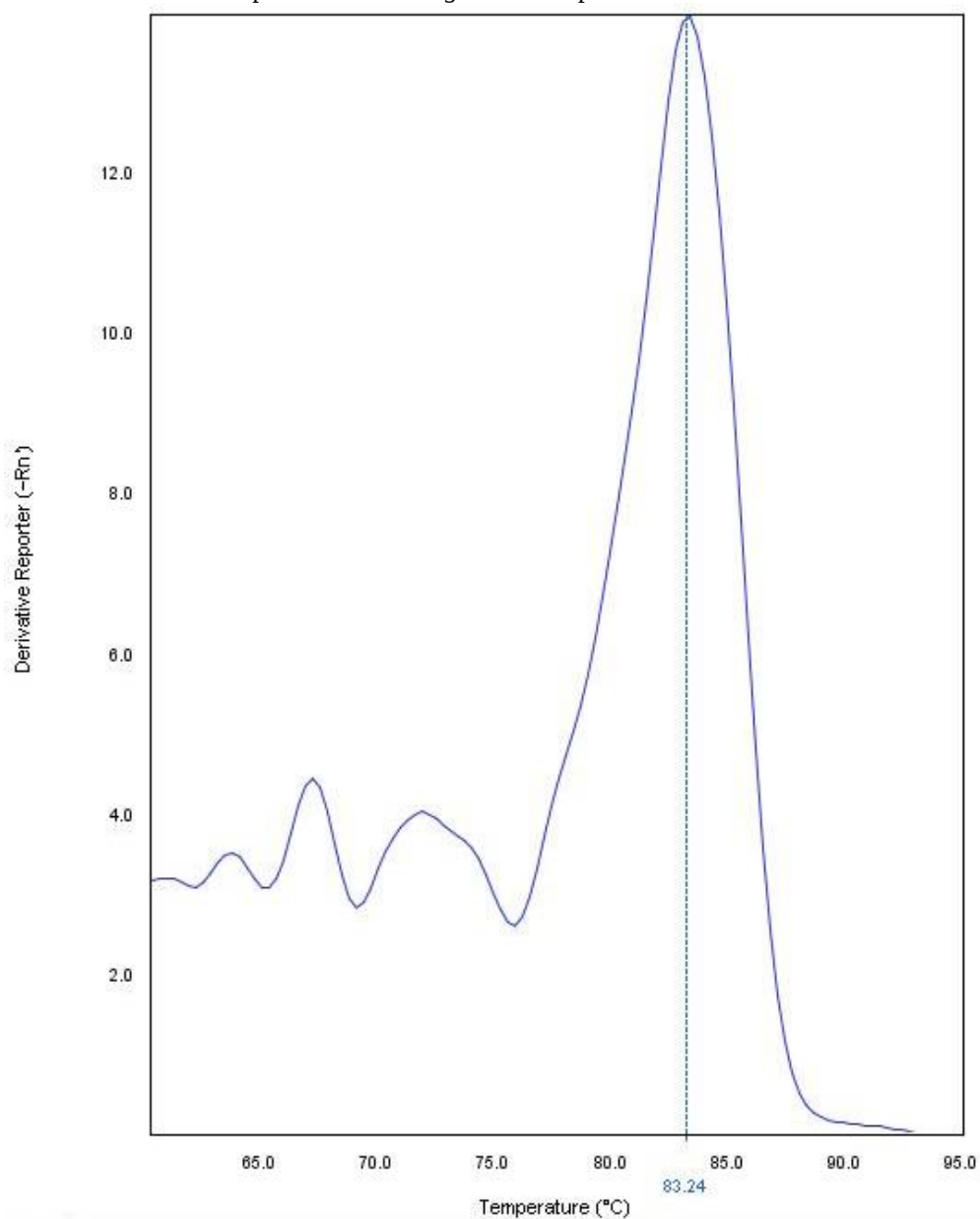
Dessa forma, cada uma dessas temperaturas, representa um alelo específico.

Figura 2 - Genótipo C/C do SNP rs121434569. Representação gráfica obtida por Real Time-PCR mostrando uma T_m de 77,26°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo ancestral)
Temperatura de *Melting* observada para o alelo C



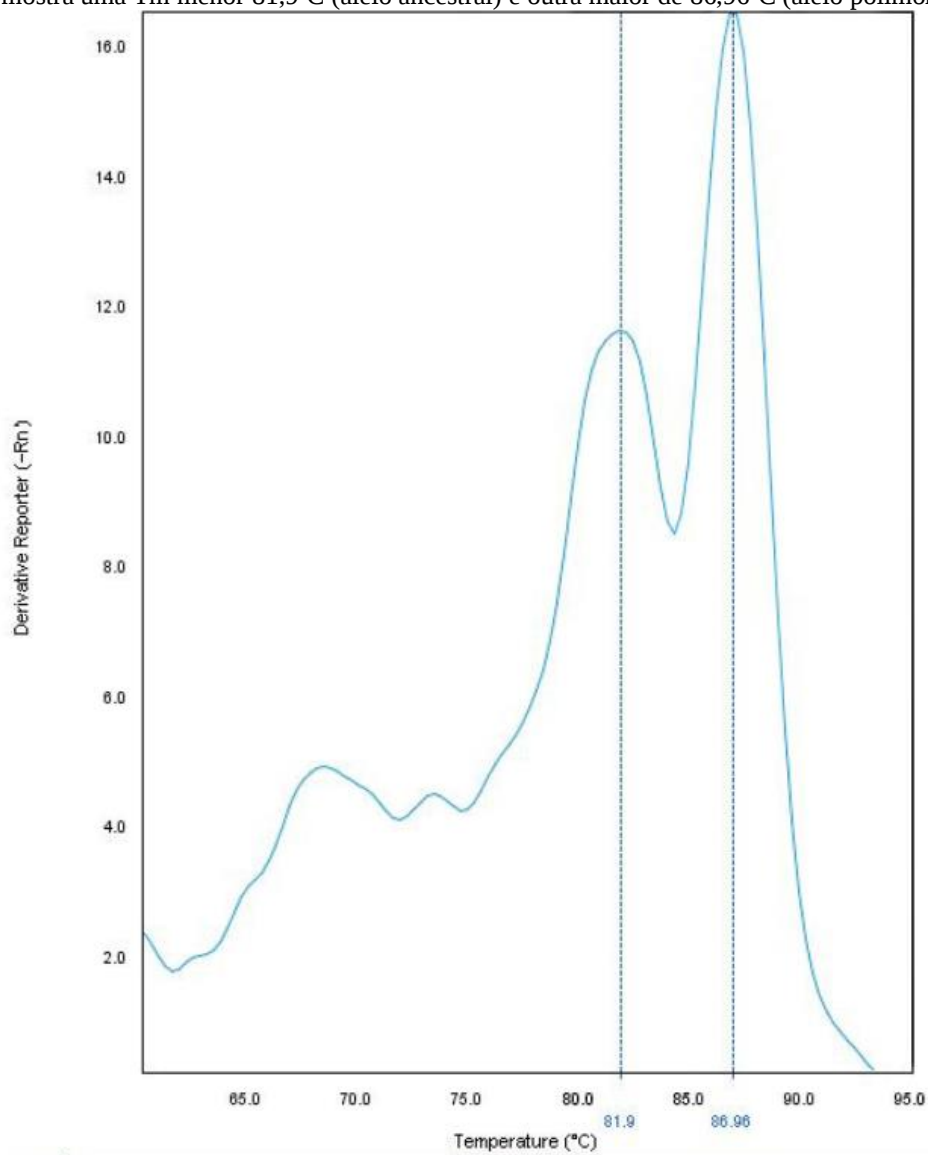
Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

Figura 3. Genótipo T/T do SNP rs121434569. Representação gráfica obtida por Real Time-PCR mostrando uma T_m de 83,24°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo polimórfico)
Temperatura de *Melting* observada para o alelo T



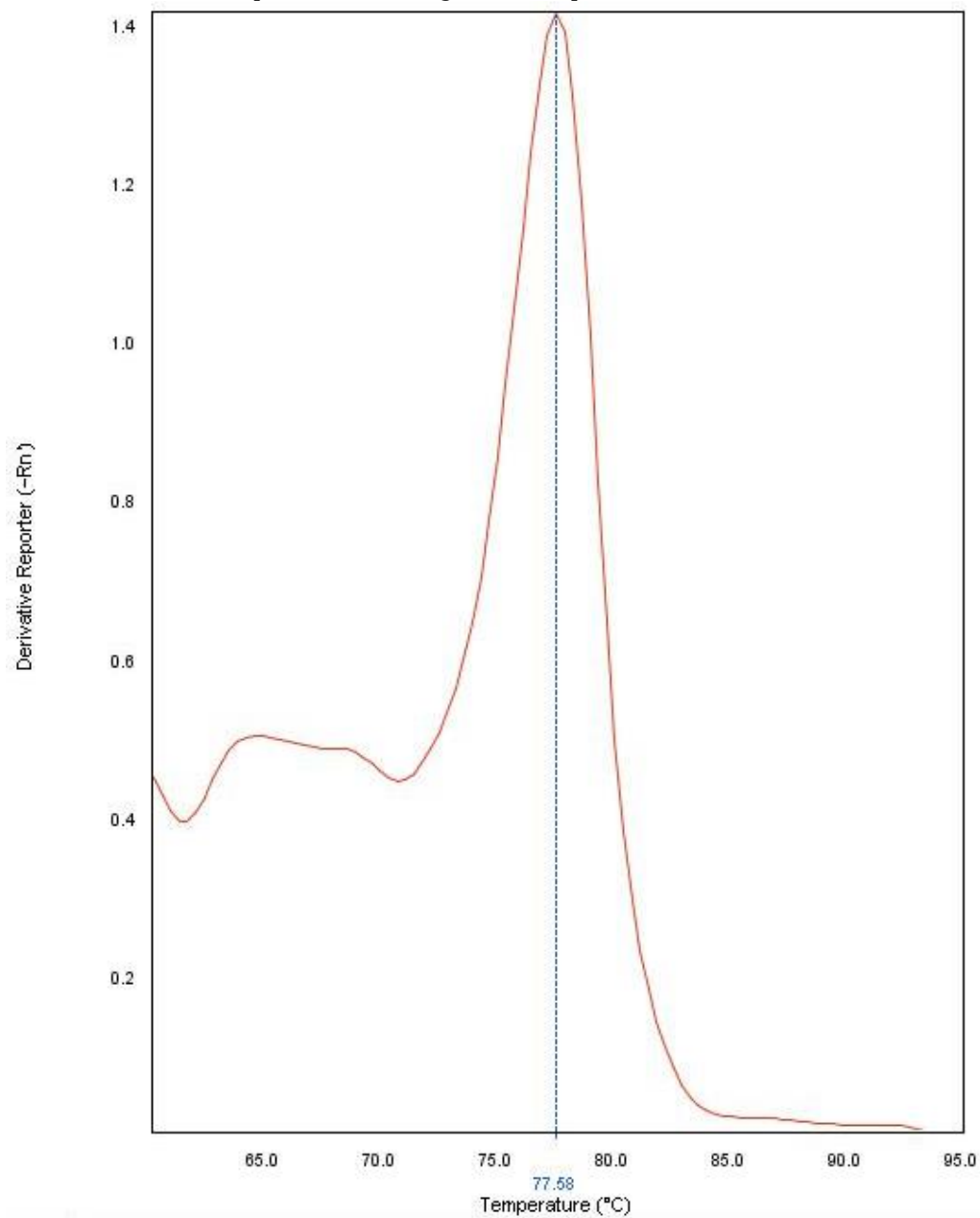
Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

Figura 4. Genótipo C/T do SNP rs121434569. Representação gráfica obtida por Real Time-PCR mostrando duas T_m diferentes, representando dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos. A figura mostra uma T_m menor 81,9°C (alelo ancestral) e outra maior de 86,96°C (alelo polimórfico)



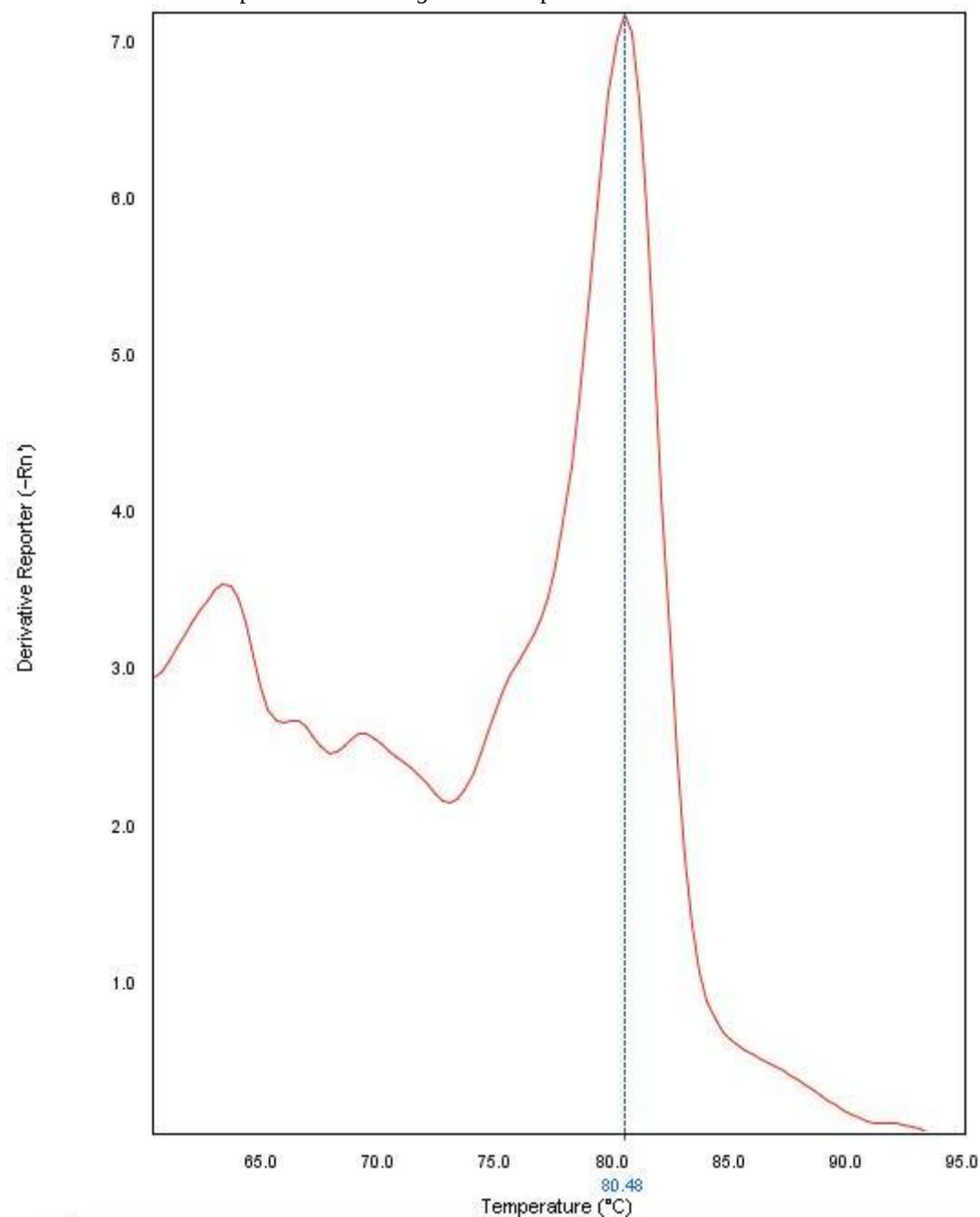
Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

Figura 5. Genótipo T/T do SNP rs121434568. Representação gráfica obtida por Real Time-PCR mostrando uma T_m de 77,58°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo ancestral)
Temperatura de *Melting* observada para o alelo T



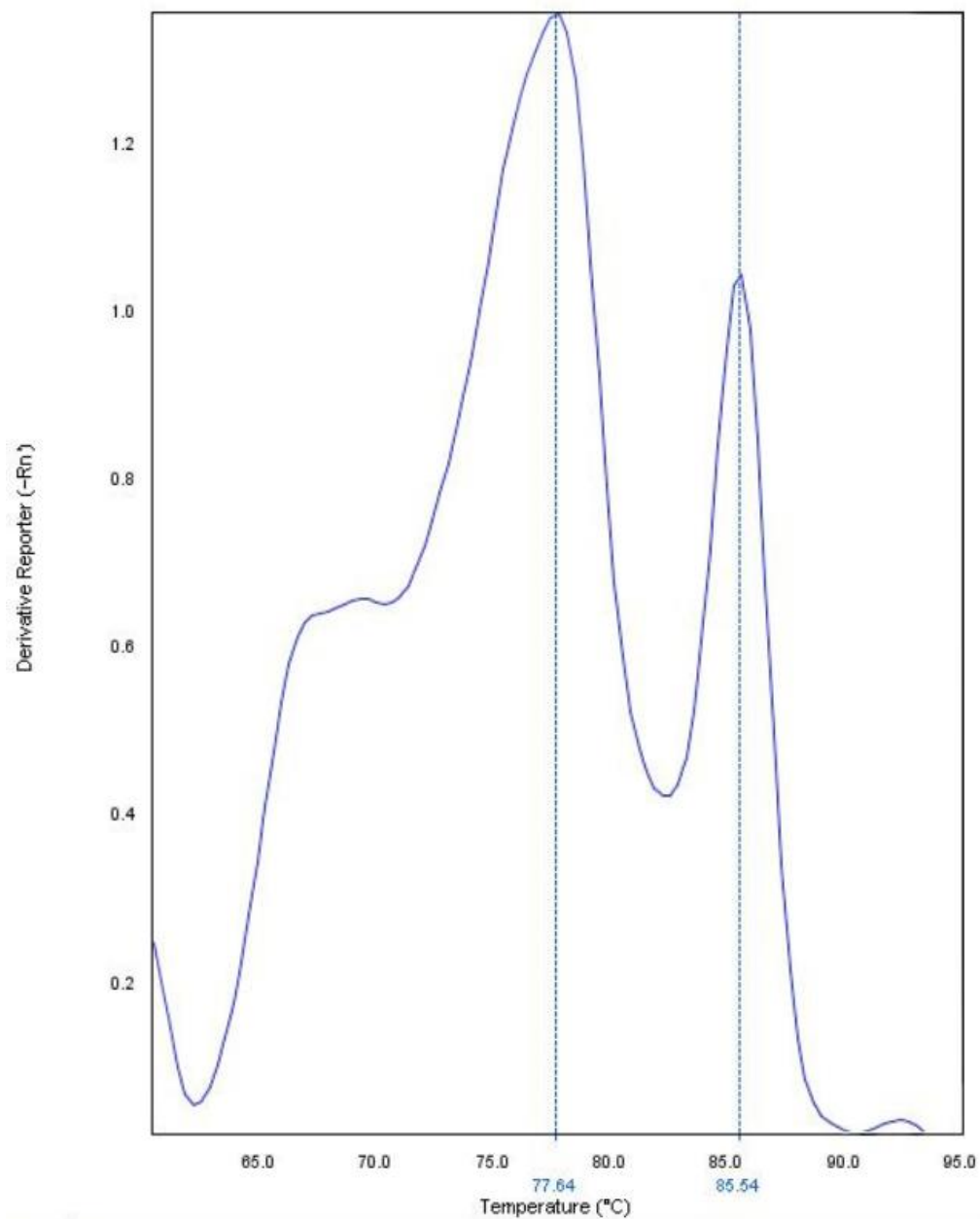
Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

Figura 6. Genótipo G/G do SNP rs121434568. Representação gráfica obtida por Real Time-PCR mostrando uma T_m de 80,48°C, representando o fragmento menor de DNA (alelo polimórfico)
Temperatura de *Melting* observada para o alelo G



Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

Figura 7. Genótipo T/G do SNP rs121434569. Representação gráfica obtida por Real Time-PCR mostrando duas T_m diferentes, representando dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos. A figura mostra uma T_m menor 77,64°C (alelo ancestral) e outra maior de 85,54°C (alelo polimórfico)



Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

5.2 FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DOS SNPs rs121434569 e rs121434568

A frequência alélica do SNP rs121434569 obtida através do método de PCR alelo específico estendido, foi: T=86%, e G=14%. Das 142 amostras analisadas, 15 genótipos homozigotos para o alelo ancestral C, representando uma frequência de 35%, 120 genótipos foram homozigotos para o alelo polimórfico T, representando 60%, e 7 genótipos foram heterozigotos (C/T), sendo apenas 5%.

A frequência alélica do SNP rs121434568 obtida através do método de PCR alelo específico estendido, foi: T=87% e G=13%. Das 142 amostras analisadas, 112 genótipos foram homozigotos para o alelo ancestral T (78,8%); 7 indivíduos foram homozigotos para G (4,9%); e 23 indivíduos foram heterozigotos para T/G (16,1%) (Figura 6).

5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENÓTIPO OBSERVADO E GENÓTIPO ESPERADO POR MEIO DO TESTE QUI-QUADRADO

As frequências genotípicas observada e esperada, para os SNPs do gene EGFR 790, apresentaram o X2 igual a 76,92, tendo o valor de P = 0.001. Enquanto, as frequências genotípicas observada e esperada, para os SNPs do gene EGFR 858, apresentaram X2 igual a 3,85, tendo o valor P = 0.0054 (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência genotípica observada/esperada e frequência alélica dos SNP rs121434569 e rs121434568

SNPs	Nº de Genótipo observado	Nº de Genótipo esperado	Frequência alélica		X2	P-Valor
ECGR 790 rs121434569	C/C 15	C/C 2,8	T 0,86	C 0,14	76,92	0.001
	T/T 120	T/T 105				
	C/T 7	C/T 32,2				
ECGR 858 rs121434568	T/T 112	T/T 107,5	T 0,87	G 0,13	11,56	0.0054
	G/G 7	G/G 2,4				
	T/G 23	T/G 32,1				

Fonte: Dados da Pesquisa, 2024

6 DISCUSSÃO

Ao analisar a associação da frequência genotípica observadas/esperada do SNP rs121434569, verificou-se que o *Qui-Quadrado* foi de 76,92, com a probabilidade de significância de 0.001, mostrando que população está em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Da mesma forma, o rs121434568 encontra-se em condições de desequilíbrio, pois apresentou $X^2 = 11,56$ e valor de $P = 0.0054$, mostrando assim que, o resultado é estatisticamente significativo para essa hipótese, pois o $P < 0.05$.

Nesse tocante, os SNPs do presente estudo, mostram associação no desenvolvimento do Carcinoma basocelular, pois a troca do alelo ancestral pelo polimórfico causa a alteração do aminoácido que, por sua vez, altera a função desempenhada pela proteína. No primeiro SNP, o polimorfismo de nucleotídeo, promove a substituição do resíduo de Treonina por Metionina. Já no segundo, a Leucina é substituída por Aspartato.

A treonina é o resíduo chave na proteína do EGFR, assim denominado, porque a sua localização encontra-se na entrada de uma região hidrofóbica, na parte posterior da fenda de ligação ao ATP, alterando a interação entre a proteína e os inibidores de tirosina quinase (TKIs), como gefitinibe e erlotinibe, ao bloquear a ligação desses inibidores (ECK *et al.*, 2008).

Estudos com imuno-histoquímica em Carcinomas de mama metaplásicos, apresentaram superexpressão de EGFR em 76% dos casos. Além disso, 37% desses casos exibiram amplificação do gene EGFR. Essa amplificação foi observada em grandes agrupamentos de genes ou mais de cinco sinais de amplificação por núcleo em mais da metade das células neoplásicas analisadas. Esses critérios foram utilizados para definir a amplificação do gene EGFR nos casos estudados, indicando uma alteração genética específica nessas células (Reis-Filho *et al.* 2004).

Embora muitos trabalhos associem a superexpressão de EGFR, com determinados tipos de Carcinomas, por meio da imuno-histoquímica. Ainda existe ausência de estudos que comprovem a associação do Carcinoma basocelular com as mutações no gene EGFR, e isso pode ser atribuída a vários fatores, incluindo a natureza genética e molecular específica desse tipo de câncer de pele.

O Carcinoma basocelular é geralmente associado a mutações no gene PTCH1, bem como a ativação da via de sinalização de *Hedgehog*. Essas mutações e vias de sinalização

específicas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e progressão do Carcinoma basocelular, enquanto o gene EGFR e suas mutações estão mais associados a outros tipos de câncer, como o carcinoma de pulmão de células não pequenas.

No entanto, a ausência de associação entre o gene EGFR e o Carcinoma basocelular, na literatura, pode ser devido à falta de limitações técnicas, falta de recursos ou foco em outras vias de sinalização conhecidas por desempenhar um papel mais proeminente nesse tipo de câncer.

Vale salientar, que o CBC é o tipo mais frequente de carcinoma entre os tumores de pele não melanoma, com cerca de 80% dos casos, porém, de menor mortalidade. Suas apresentações clínicas se associam, principalmente, ao subtipo histológico do tumor, e os nodulares e superficiais são os subtipos mais prevalentes, os quais apresentam, geralmente, ulcerações crônicas com bordas distintas; além disso, a exposição à radiação UV através de raios solares é considerada como a principal causa das mutações que levam a doença (Avci *et al.*, 2019).

Assim como apontam Dika et al. (2020), principalmente, a exposição aguda, aos raios UV, especialmente, durante a infância, associa-se a um maior risco de desenvolver CBC durante a vida. Tal risco também depende, por vezes, de um efeito de exposição cumulativa, como a capacidade da pele de se bronzear. Nesse aspecto, o bronzeamento artificial, por exemplo, foi considerado um fator de risco adicional, assim como, um elevado número de tratamentos com psoraleno e UVA e UVB.

Em relação ao Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), Normanno *et al.* (2006) apontam que este faz parte da família ErbB de receptores tirosina quinases (RTK). Estas proteínas de membrana ativam-se posteriormente à ligação com fatores de crescimento peptídicos da família de proteínas EGFR. Na pele, o EGFR desempenha uma importante função no desenvolvimento e fisiologia da epiderme.

Esta, por sua vez, se desenvolve principalmente a partir de queratinócitos, e a diferenciação e migração desses queratinócitos para a superfície da pele são reguladas pela sinalização de EGFR. A ativação do receptor ocorre mediante seus ligantes, à exemplo do EGF, fator de crescimento transformador- α , anfi-regulina e EGF de ligação à heparina (HBEGF), com isso, a ativação de ligação ao ligante regula a proliferação de queratinócitos através da introdução da ativação do sinal negativo, da fosfoinositídeo 3-quinase-AKT e das vias da proteína quinase ativada por mitógeno (Kozuki, 2016).

Alterações no EGFR, também, estão envolvida nas vias de sinalização que são responsáveis por realizar a proliferação celular, metástase, invasão, angiogênese e sobrevivência de tumores (Hilbe *et al.*, 2003; Avci *et al.*, 2019).

É importante destacar que essas alterações na sinalização mediada pelo EGFR não apenas afetam diretamente as células cancerígenas, mas também podem influenciar o microambiente tumoral. As vias de sinalização aberrantemente ativadas podem estimular a angiogênese, invasão tecidual e resistência a mecanismos normais de apoptose, características comuns e problemáticas em carcinomas basocelulares avançados (Ciardiello *et al.*, 2000).

Outra consequência contraintuitiva das alterações nos SNPs pode ser uma alteração na resposta a tratamentos terapêuticos que visam a inibição do EGFR. A presença de certas variantes pode modificar a sensibilidade dos tumores a terapias-alvo, requerendo estratégias de tratamento personalizadas que considerem o perfil genético específico do paciente. Isso reflete a crescente importância da medicina de precisão, que busca ajustar intervenções terapêuticas com base em biomarcadores genéticos individuais (Perera *et al.*, 2019).

Os achados também sugerem que o CBC, enquanto comumente menos agressivo que outros tipos de câncer de pele, pode, no entanto, apresentar um risco considerável de complicações em populações que carregam as variantes prejudiciais no EGFR. Portanto, o rastreamento genético desses SNPs, em populações propensas, poderia oferecer um método de prevenção profilática, permitindo a intervenção precoce antes do surgimento do câncer.

Sendo assim, os SNPs detectados no gene EGFR, por meio do método PCR alelo específico estendido, possibilitou a associação com o Carcinoma basocelular, já que, as temperaturas de *Melting*, do SNP rs121434569 apresentou temperaturas bem estabelecidas para identificar os genótipos C/C, C/T e T/T, assim como, para o SNP rs121434568, onde foi identificado os genótipos T/T, G/T e T/T. Isso se deve aos desenhos dos primers, que apresentaram uma sequência de cauda TTT gerando fragmentos de tamanhos e temperaturas de *Melting* (T_m) diferentes correspondentes ao seu alelo específico, permitindo assim, a sua discriminação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos na pesquisa sobre os receptores de fator de crescimento epidérmico (EGF) e seu papel no desenvolvimento de Carcinoma Basocelular (CBC), conclui-se que a expressão e atividade do EGFR desempenha um papel crucial na patogênese do CBC, pois a frequência genotípica das amostras encontra-se em condições de desequilíbrio de *Hardy-Weinberg*, sendo o valor de $P < 0.05$. Esse desequilíbrio fornece uma forte pista de que as variações nos SNPs exercem efeitos significativos na predisposição ao CBC, possivelmente modulando a expressão e funcionalidade do EGFR, receptor essencial na regulação do ciclo celular e que, quando desregulado, tem papel central na oncogênese. Além disso, o método PCR alelo específico estendido, possibilitou a associação com o Carcinoma basocelular, já que, as temperaturas de *Melting*, dos SNPs apresentaram temperaturas bem estabelecidas para identificar os genótipos, contribuindo, significativamente para o entendimento da Biologia Molecular do CBC, abrindo possibilidades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais direcionadas e eficazes.

REFERÊNCIAS

ACVI, C. B. *et al.* The role of EGFR overexpression on the recurrence of basal cell carcinomas with positive surgical margins. **Gene**, v. 687, [s.n], p. 35-38, 2019.

BORETTO, M., et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a target of the tumor-suppressor E3 ligase FBXW7. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 121, n. 12, 2024.

BRASIL. **Instituto Nacional do Câncer**. BRASIL, 2021.

CAMERON, M *et al.* Basal cell carcinoma: Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations. **J Am Acad Dermatol**. 2019.

CIARDIELLO, F.; TROIANO, R.; BIANCHELLI, A.; De Vita, F.; Normanno, N. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as a Target for the Treatment of Lung Cancer. *Lung Cancer Biology*. Review Series: Lung Cancer Targeted Therapies, v.1, p. 82-95, 2000.

CHAI, J. *et al.* **The Role of Smoothened-Dependent and -Independent Hedgehog Signaling Pathway in Tumorigenesis**. Biomedicines, 2021.

CHERRY, A.; KARLSTROM, J.; JIN, Q. **Structural basis of SUFU–GLI interaction in human Hedgehog signalling regulation**. Acta Cryst, 2013.

CHINEM, V; MIOT, H. **Epidemiologia do carcinoma basocelular**. An Bras Dermatol. 2011.

ECK, M. J. et al. **Mutations in the gatekeeper residue of EGFR confer resistance to kinase inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Boston, v. 105, n. 6, p. 2070-2075, fev. 2008.

EPSTEIN, E. H. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 10, p. 743-754, 2008.

EVANGELISTA, M.; TIAN, H.; SAUVAGE, F. **The Hedgehog Signaling Pathway in Cancer**. Molecular Pathways, 2006.

GRACHTCHOUK, M.; LIU, J.; HUTCHIN, M. *et al.* **Constitutive Hedgehog/GLI2 signaling drives extracutaneous basaloid squamous cell carcinoma development and bone remodeling**. Carcinogenesis, 2021.

HANAFUSA, H. *et al.* **LRRK1 functions as a scaffold for PTP1B-mediated EGFR sorting into ILVs at the ER–endosome contact site**. The Company of Biologists Ltd, 2023.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. *Principles of Population Genetics*. 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1997.

HERRANZ B., *et al.* **LOX Is a Prognostic Marker in Prostate Cancer**. PLOS ONE, San Francisco, 2015.

HILBE, W. *et al.* Characterisation and predictive value of epidermal growth factor receptor status using quantitative real-time PCR combined with immunohistochemistry on non-small cell lung cancer specimens. **Int J Oncol**, v. 23, n. 4, p. 893-899, 2003.

HUQ, A.; RAJAGOPALAN, B.; FINLAY, M. **Mutations in SUFU and PTCH1 genes may cause different cutaneous cancer predisposition syndromes: similar, but not the same**. Familial Cancer, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Estimativa 2020: incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.
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: 5 mar. 2022.

JACOB, A. **Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face**. Dublin Hospital Rep, 1824.

Jl, H. *et al.* **O impacto das mutações do domínio da quinase do EGFR humano na tumorigênese pulmonar e na sensibilidade in vivo às terapias direcionadas ao EGFR.** *Célula Câncer*, 12, 81-93, julho de 2007. Elsevier Inc.

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

KIM, J.; AFTAB, B.; TANG, J. *et al.* **Itraconazole and Arsenic Trioxide Inhibit Hedgehog Pathway Activation and Tumor Growth Associated with Acquired Resistance to Smoothed Antagonists.** *Cancer Cell*, 2013.

Kozuki, T. **Management of EGFR-TKI-associated skin rash.** *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 46(4), 291-298, 2016.

KROMPECHER, E. **der Basalzellenkrebs.** Jana: Fischer, 1903.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; BRETSCHEER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A. **Biologia celular e molecular.** Artmed Editora, 2014.

MARIJA, D.; NIKOLA, L.; BOBAN, D. *et al.* **GLI-1 polymorphisms of Hedgehog pathway as novel risk and prognostic biomarkers in melanoma patients.** Original article, 2022.

MECK, C; SHUYS, M. **Genética molecular básica: dos genes aos genomas.** Rio de Janeiro: Guanabara, 2017.

MIMEAULT, M.; RACHAGANI, S.; MUNIYAN, S.; SESHACHARYULU, P.; JOHANSSON, S.; DATTA, K., *et al.* **Inhibition of hedgehog signaling improves the anti-carcinogenic effects of docetaxel in prostate cancer.** *Oncotarget*, 2015.

NORMANNO, N. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, v. 366, n. 1, p. 2-16, 2006.

OTSUKA, A.; LEVESQUE, L.; DUMMER, R.; KABASHIMA, K. **Hedgehog sinaling in basal cell carcinoma.** Jornal of Dermatological Science. Kyoto, 2015.

PERERA, E.; LOWN, I.; MERMINGAS, R.; SINCLAIR, R. **Proactive Monitoring of Nonmelanoma Skin Cancer.** Australian Journal of General Practice, v. 48, n. 7, p. 449-453, 2019.

PESZ, K.; BIENIEK, A.; GIL, J.; *et al.* **Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and basal cell carcinoma of the skin.** Int J Dermatol; 2014.

PINO, L.; BALASSIANO, L.; SESSIM, M.; ALMEIDA, A.; EMPINOTTI, V.; SEMENOVITCH, I.; *et al.* **Basal cell nevus syndrome: clinical and molecular review and case report.** Int J Dermatol. 2016.

REIS-FILHO, JS *et al.* **Superexpressão de EGFR e amplificação genética em carcinomas de mama metaplásicos.** Pesquisa sobre câncer de mama, Porto, Vol. 7, No. 6, p. 1-8, junho 2004.

RUBIN L.; *et al.* **Targeting the hedgehog pathway in cancer.** Nat Rev Drug Discov, 2006.

SCZAKIEL, H.; HULSEMAN, W.; HOLTGREWE, M. **GLI3variants causing isolated polysyndactyly are not restricted to the protein's C-terminal third.** Received, 2021.

SKODA, A.; SIMOVIC, D.; KARIN, V.; *et al.* **The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review.** Bosnian Journal of basic medical sciences, 2017.

SOUZA, A.; *et al.* **Association between SNPs and Loss of Methylation Site on the CpG island of the Promoter Region of the Smoothed Gene, Potential Molecular Markers for Susceptibility to the Development of Basal Cell Carcinoma in the Brazilian Population.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2020.

TAN, A. R. *et al.* Evaluation of Biologic End Points and Pharmacokinetics in Patients With Metastatic Breast Cancer After Treatment With Erlotinib, an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 15, p. 3080-3090, 2004.

TANIMURA, A.; DAN, S.; YOSHIDA, M. **Cloning of novel isoforms of the human gli2 oncogene and their activities to enhance tax-dependent transcription of the human T-cell leukemia virus Type 1 genome.** J Virol, 1998.

TAYLOR, M.; LIU, L.; RAFFEL, C; *et al.* **Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma.** Nat Genet, 2002.

TEGLUNG, S.; TOFGARD, R. **Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma.** Biochimica and Biophysica Acta, 2010.

TREU, C; ALMEIDA, J; OMAR, L. **Câncer de pele: manual teórico-prático.** Baureri: Manole, 2021.

APÊNDICE A - Temperaturas de *Melting* das amostras de pacientes com Carcinoma basocelular utilizados no desenvolvimento da dissertação.

Nº	Tm <i>SNP rs121434569</i>	Genótipo	Tm <i>rs121434568</i>	Genótipo
1	80,89°C	T/T	75.41°C	T/T
2	76,53°C	C/C	75.92°C	T/T
3	82,16°C	T/T	77.27°C	T/T
4	82,16°C	T/T	76.93°C	T/T
7	82,52°C	T/T	77.43°C	T/T
8	82,7°C	T/T	76.08°C	T/T
9	81,79°C	T/T	76.25°C	T/T
11	82,79°C	T/T	74.9°C	T/T
12	75,45°C	C/C	75.41°C	T/T
13	75,09°C	C/C	76.08°C	T/T
14	78,13°C	C/C	76.86°C	T/T
15	78,49°C	C/C	76.14°C	T/T
16	82,07°C	T/T	77.04°C	T/T
17	76,7°C	C/C	77.04°C	T/T
18	82,52°C	T/T	77.22°C	T/T
19	81,43°C	C/C	77.58°C	T/T
20	81,61°C	C/C	76.86°C	T/T
21	82,88°C	T/T	77.4°C	T/T
22	81,07°C	T/T	77.4°C	T/T
23	81,61°C	T/T	77.4°C	T/T
24	82,52°C	T/T	77.22°C	T/T
25	82,34°C	T/T	76.68°C	T/T
26	81,79°C	T/T	77.22°C	T/T
27	82,88°C	T/T	77.22°C	T/T
28	83,07°C	T/T	77.76°C	T/T
29	82,7°C	T/T	75.96°C	T/T
30	82,34°C	T/T	76.86°C	T/T

31	81,79°C	T/T	76.86°C/84.52°C	T/G
32	85,06°C	T/T	77.29 °C	T/T
33	83,07°C	T/T	77.29 °C	T/T
34	82,88°C	T/T	77.11 °C	T/T
37	83,25°C	T/T	76.60 °C	T/T
38	83,07°C	T/T	76.60 °C	T/T
39	80,34°C	T/T	77.29 °C	T/T
41	81,48°C	T/T	76.25 °C	T/T
42	84,21°C	T/T	76.60 °C	T/T
44	80,96°C/84,16°C	C/T	77.63 °C	T/T
45	81,65°C	T/T	76.77 °C/85.09°C	T/G
46	80,46°C/84,34°C	C/T	77.29 °C	T/T
47	80,79°C	T/T	76.77 °C	T/T
48	81,13°C	T/T	77.11 °C	T/T
49	83,7°C	T/T	77.11 °C	T/T
50	81,3°C	T/T	76.77 °C	T/T
51	81,82°C	T/T	77.29 °C	T/T
52	81,82°C	T/T	77.29 °C	T/T
53	81,48°C	T/T	77.46 °C	T/T
54	75,32°C	C/C	77.98 °C	T/T
55	78,69°C	C/C	77.63 °C	T/T
56	80,29°C	T/T	77.46 °C	T/T
57	78,78°C	C/C	77.11 °C	T/T
58	83,04°C	T/T	77.63 °C	T/T
59	84,54°C	T/T	76.94 °C	T/T
60	83,4°C	T/T	76.94 °C	T/T
61	82,47°C	T/T	77.11 °C	T/T
62	83,24°C	T/T	77.29 °C	T/T
63	84,02°C	T/T	77.80 °C	T/T
64	84,64°C	T/T	77.63 °C	T/T
66	86,97°C/81,75°C	C/T	77.46 °C	T/T
67	84,18°C	T/T	77.63 °C	T/T
68	83,24°C	T/T	77.63°C/ 85.36°C	T/G

69	82,62°C	T/T	77.63°C/85.36 °C	T/G
70	83,31°C	T/T	76.94°C	T/T
71	82,31°C	T/T	77.48°C/84.76 °C	T/G
72	81,83°C	T/T	77.3°C	T/T
73	83,24°C	T/T	77.81°C	T/T
74	82,92°C	T/T	77.64°C	T/T
75	83,09°C	T/T	76.29°C	T/T
76	83,09°C	T/T	77.64°C/85.57 °C	T/G
78	82,58°C	T/T	77.13°C/84.94 °C	T/G
79	80°C	T/T	81.02°C	G/G
81	81,13/84°C,04	C/T	76.91°C/84.81 °C	T/G
82	84,38°C	T/T	81.02°C	G/G
83	83,23°C	T/T	76.72°C	T/T
85	81,84°C	T/T	77.3°C/84.31°C	T/G
86	84,21°C	T/T	77.77°C	T/T
88	82,18°C	T/T	76.06°C	T/T
89	82,35°C	T/T	79.14°C	T/T
90	82,01°C	T/T	77.76°C/84.87 °C	T/G
91	82°C	T/T	77.94°C	T/T
92	82,52°C	T/T	77.26°C/84.4°C	T/G
94	81,7°C	T/T	77.26°C/84.31°C	T/G
95	82,52°C	T/T	77.26°C/83.77°C	T/G
96	80,87°C	T/T	75.02°C	T/T
97	74,89°C	C/C	76.4°C	T/T
98	82,35°C	T/T	80.85°C	G/G
99	82,35°C	T/T	80.71°C/84.58°C	T/G
100	82,18°C	T/T	78.11°C	T/T
101	81,67°C	T/T	78.11°C /84.85°C	T/G
102	82,01/73,38°C	C/T	78.11°C	T/T
103	82,7°C	T/T	78.8°C/84.31°C	T/G
104	82,7°C	T/T	79.19°C/84.58°C	T/G
105	82,87°C	T/T	77.94°C/84.49 °C	T/G
106	81,35 °C/73,56°C	C/T	77.39°C/84.49 °C	T/G

107	82,72°C	T/T	77.26°C	T/T
108	83,21°C	T/T	84.76°C	G/G
109	82,87°C	T/T	78.28°C	T/T
111	82,7°C	T/T	78.28°C/85.12 °C	T/G
112	84,92°C	T/T	77.94°C/84.21 °C	T/G
113	84,58°C	T/T	77.94°C	T/T
114	84,24°C	T/T	78.11°C	T/T
115	84,07°C	T/T	78.2 °C/85.02 °C	T/G
116	84,41°C	T/T	77.77°C	T/T
117	84,24°C	T/T	77.6°C	T/T
118	84,41°C	T/T	77.43°C	T/T
120	84,58°C	T/T	78.11°C	T/T
122	84,24°C	T/T	78.11°C	T/T
123	82,52°C	T/T	77.77°C	T/T
124	80,68°C	T/T	78.02°C	T/T
125	81,37°C	T/T	85.12°C	G/G
127	80,34°C	T/T	78.45°C	T/T
128	77,26°C	C/C	77.94°C	T/T
130	76,4°C	C/C	78.28°C	T/T
131	76,06°C	C/C	78.28°C/84.75 °C	T/G
132	81,54°C	T/T	84.95°C	G/G
133	82,4°C	T/T	77.43°C	T/T
134	81,37°C/85,87 °C	C/T	76.74°C	T/T
137	82,22°C	T/T	77.6°C	T/T
138	81,88°C	T/T	78.11°C	T/T
139	81,88°C	T/T	84.95°C	G/G
140	82,57°C	T/T	79.85°C	T/T
141	82,4°C	T/T	77.77°C	T/T
142	82,57°C	T/T	77.25°C	T/T

Fonte: Autoria própria

APÊNDICE B – Artigo submetido a revista**“Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR) and their role in the development of Basal Cell Carcinoma (BCC)”**

Authors:

Ronne Richard Ferreira Santos^{1 3}, Milla Nunes de Sousa Freitas^{1 3}, Rodrigo Vilar Marques³, Otavio Sérgio Lopes², Eleonidas Moura Lima^{1 3}, Leonardo Ferreira Soares³.

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

Ronne Richard Ferreira Santos

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

E-mail – ronne_richard@hotmail.com

ABSTRACT

Background: 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 keratinize normal. Among the most relevant risk factors for the development of BCC are light skin color, family history, childhood freckles, and light skin, eyes or hair. In the human genome there are several types of Single Base Polymorphisms (SNPs), which determine the genetic diversity of a population and can be used as markers, in order to contribute to the prognosis of patients susceptible to BCC, explain their clinical evolution and therapeutic response. The present study analyzed the association of SNPs rs121434569 and rs121434568 of the EGFR gene from samples of paraffin material from patients in Paraíba, with histopathological diagnosis of basal cell carcinoma.

Methods: 142 paraffin tissue samples from patients diagnosed with Basal Cell Carcinoma in Paraíba were analyzed, which were subjected to DNA extraction and Extended Allele Specific PCR. The determination and analysis of the melting curve was carried out using the 7500 Fast Real-Time PCR System equipment, while the curve analysis was carried out using the SYBR Green 2X and Rox1 present in the MasterMix (Promega – Madison - USA). The allele frequency was calculated from the observed genotypic frequency, while the expected genotypic frequency was obtained through equilibrium according to the Hardy-Weinberg law. To check whether the observed genotype frequency was in Hardy-Weinberg equilibrium, the Chi-Square test was used..

Results: When analyzing the association of the observed/expected genotype frequency of the SNP rs121434569 it was found that the Chi-Square was 76.92, with a probability of significance of 0.001, showing that the population is in Hardy-Weinberg. Likewise, rs121434568 is in unbalanced conditions, as it presented $X^2 = 11.56$ and P value=0.0054, thus showing that the result is statistically significant for this hypothesis, as $P < 0.05$.

Conclusion: The expression and activity of EGFR plays a crucial role in the pathogenesis of BCC, as the genotype frequency of the samples is in conditions of Hardy-Weinberg disequilibrium, with a P value < 0.05 . Furthermore, the extended allele-specific PCR method enabled the association with basal cell carcinoma since the Melting temperatures of the SNPs presented well-established temperatures to identify the genotypes.

Introdução

O Carcinoma Basocelular (CBC) é um dos tipos de tumores de pele mais frequente que se origina de células basais epiteliais que perderam sua capacidade de diferenciação e queratinização normais [1].

A proporção de ocorrência do CBC é de oito a dez para cada melanoma diagnosticado. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer registra, a cada ano, 180 mil novos casos, sendo em torno de 60% homens, e 40% mulheres. Especula-se que os homens decorram de maior exposição ao sol, provavelmente, por razões profissionais [2].

Os fatores de riscos constitucionais mais relevantes para o desenvolvimento de CBC são fototipos claros, histórico familiar (30-60%), sarda na infância, e pele, olhos ou cabelos claros. Peles claras tem risco dez a vinte vezes mais de desenvolver CBC do que peles escuras, mesmo quando vivem na mesma região [3].

No genoma humano existem vários tipos de Polimorfismos de base única (SNPs). Os SNPs determinam a diversidade genética de uma população, podendo ser usados como marcadores, a fim de contribuir no prognóstico de pacientes susceptíveis a CBC, explicar sua evolução clínica e resposta terapêutica [4].

O presente estudo analisou a associação dos SNP rs121434569 e rs121434568 do gene EGFR a partir de amostras de material parafinado de pacientes da Paraíba, com diagnóstico histopatológico de Carcinoma basocelular. A associação desses SNPs com os tumores poderá fornecer informações sobre a susceptibilidade na carcinogênese.

Material e Métodos

Amostras

No presente estudo, foram analisadas 142 amostras de tecidos parafinados de pacientes diagnosticados com Carcinoma Basocelular na Paraíba. Por envolver seres humanos, a pesquisa obedece estritamente às especificações bioéticas contidas na Resolução 466/2012 (Conselho Nacional de Saúde, 1996), respeitando os princípios da autonomia, da não maleficência e da beneficência.

Extração

As amostras do tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA segundo Shang-Rong *et al* (2002) [5], com modificações feitas no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO) – UFPB.

Técnica e desenho dos indicadores

O método de genotipagem utilizado nesse trabalho foi o método de PCR (*polymerase chain reaction*). Os iniciadores foram desenhados por validação *in silico* com auxílio de bancos de dados e *software* de análise de alinhamento de sequência.

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.

Análise da Curva de Melting

A determinação e análise da curva de *melting* (T_m) foi realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA), seguindo, as condições: Pré-aquecimento a partir de 60°C a 95°C durante 15 segundos, reduzindo, posteriormente, a 60°C, onde permaneceu por 1 minuto, seguido de um aquecimento gradual (1°C por minuto) até a temperatura de 95°C durante 30 segundos. A análise da curva foi realizada por meio do SYBR Green 2X e Rox1 presentes no MasterMix (*Promega – Madison - USA*).

Análise Estatística

A frequência alélica foi calculada a partir da frequência genotípica observada, levando em consideração a quantidade de alelos presentes em cada genótipo. Já a frequência genotípica esperada, foi obtida por meio do equilíbrio, segundo a lei de Hardy-Weinberg. Para verificar se a frequência genotípica observada estava ou não em

equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o teste de Qui-Quadrado, sendo considerado 5%, o nível de confiança.

Resultado

As T_m do SNP rs121434569 no gene EGFR 790 foram, em média, 76,9°C para o genótipo C/C, 82°C para os do genótipo T/T, e os indivíduos com genótipo C/T apresentaram duas temperaturas médias, uma de 75,5°C e outra de 81,1°C. Para o SNP rs121434568 no gene EGFR 858, as T_m foram em média 76,3°C para os indivíduos homozigotos do alelo ancestral T, já para o alelo G apresentaram uma T_m média de 82,8°C. Os indivíduos heterozigotos para os alelos T/G, por sua vez, apresentaram duas temperaturas médias, uma de 76,7°C, e outra de 84,5°C. Dessa forma, cada uma dessas temperaturas, representa um alelo específico.

A frequência alélica dos SNP rs121434569, do gene EGFR 790, obtida através do método de PCR alelo específico estendido, foi de T=86%, e G=14%. Das 142 amostras analisadas, houve 15 genótipos homozigotos para o alelo ancestral C, representando uma frequência de 35%, 120 genótipos homozigotos para o alelo polimórfico T, representando 60%, e 7 genótipos heterozigotos (C/T), sendo apenas 5%. A frequência alélica do SNP rs121434568, do gene EGFR 858, por sua vez, obteve: T=87% e G=13%. Das 142 amostras analisadas, 112 genótipos foram homozigotos para o alelo ancestral T (78,8%); 7 indivíduos homozigotos para G (4,9%); e 23 indivíduos heterozigotos para T/G (16,1%).

As frequências genotípicas observada e esperada para os SNPs do gene EGFR 790, apresentaram o $X^2 = 76,92$, tendo o valor de $P = 0.001$. As frequências genotípicas observada e esperada, para os SNPs do gene EGFR 858, apresentaram $X^2 = 3,85$, tendo o valor $P = 0.0054$.

Discussão

Ao analisar a associação da frequência genotípica observadas/esperada do SNP rs121434569, do gene EGFR 790, verificou-se que o Qui-Quadrado foi de 76,92, com a probabilidade de significância de 0.001, mostrando que população está em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Da mesma forma, o rs121434568 do gene EGFR 858 encontra-se

em condições de desequilíbrio, pois apresentou $X^2 = 11,56$ e valor de $P = 0.0054$, mostrando assim que, o resultado é estatisticamente significativo para essa hipótese, pois o $P < 0.05$.

Nesse tocante, os SNPs do presente estudo, mostram associação no desenvolvimento do Carcinoma basocelular, pois a troca do alelo ancestral pelo polimórfico causa a alteração do aminoácido que, por sua vez, altera a função desempenhada pela proteína. No caso da ECGR 790, o polimorfismo de nucleotídeo, promove a substituição do resíduo de Treonina por Metionina. Na expressão do ECGR 858, a Leucina é substituída por Aspartato.

A treonina é o resíduo chave na proteína do EGFR, assim denominado, porque a sua localização encontra-se na entrada de uma região hidrofóbica, na parte posterior da fenda de ligação ao ATP, alterando a interação entre a proteína e os inibidores de tirosina quinase (TKIs), como gefitinibe e erlotinibe, ao bloquear a ligação desses inibidores [6].

Alterações no EGFR, também, estão envolvida nas vias de sinalização que são responsáveis por realizar a proliferação celular, metástase, invasão, angiogênese e sobrevivência de tumores [7].

É importante destacar que essas alterações na sinalização mediada pelo EGFR não apenas afetam diretamente as células cancerígenas, mas também podem influenciar o microambiente tumoral. As vias de sinalização aberrantemente ativadas podem estimular a angiogênese, invasão tecidual e resistência a mecanismos normais de apoptose, características comuns e problemáticas em carcinomas basocelulares avançados [8].

Outra consequência contraintuitiva das alterações nos SNPs pode ser uma alteração na resposta a tratamentos terapêuticos que visam a inibição do EGFR. A presença de certas variantes pode modificar a sensibilidade dos tumores a terapias-alvo, requerendo estratégias de tratamento personalizadas que considerem o perfil genético específico do paciente. Isso reflete a crescente importância da medicina de precisão, que busca ajustar intervenções terapêuticas com base em biomarcadores genéticos individuais [9].

Embora muitos trabalhos associem a superexpressão de EGFR, com determinados tipos de Carcinomas, por meio da imuno-histoquímica. Ainda existe ausência de estudos que comprovem a associação do Carcinoma basocelular com as mutações no gene EGFR, e isso pode ser atribuída a vários fatores, incluindo a natureza genética e molecular específica desse tipo de câncer de pele.

O Carcinoma basocelular é geralmente associado a mutações no gene PTCH1, bem como a ativação da via de sinalização de Hedgehog. Essas mutações e vias de sinalização específicas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e progressão do Carcinoma basocelular, enquanto o gene EGFR e suas mutações estão mais associados a outros tipos de câncer, como o carcinoma de pulmão de células não pequenas.

No entanto, a ausência de associação entre o gene EGFR e o Carcinoma basocelular, na literatura, pode ser devido à falta de limitações técnicas, falta de recursos ou foco em outras vias de sinalização conhecidas por desempenhar um papel mais proeminente nesse tipo de câncer.

Vale salientar, que o CBC é o tipo mais frequente de carcinoma entre os tumores de pele não melanoma, com cerca de 80% dos casos, porém, de menor mortalidade. Suas apresentações clínicas se associam, principalmente, ao subtipo histológico do tumor, e os nodulares e superficiais são os subtipos mais prevalentes, os quais apresentam, geralmente, ulcerações crônicas com bordas distintas; além disso, a exposição à radiação UV através de raios solares é considerada como a principal causa das mutações que levam a doença [10].

Em relação ao Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), este faz parte da família ErbB de receptores tirosina quinases (RTK). Estas proteínas de transmembrana ativam-se posteriormente à ligação com fatores de crescimento peptídicos da família de proteínas EGFR. Na pele, o EGFR desempenha uma importante função no desenvolvimento e fisiologia da epiderme [11].

Esta, por sua vez, se desenvolve principalmente a partir de queratinócitos, e a diferenciação e migração desses queratinócitos para a superfície da pele são reguladas pela sinalização de EGFR. A ativação do receptor ocorre mediante seus ligantes, à exemplo do EGF, fator de crescimento transformador- α , anfiregulina e EGF de ligação à heparina (HBEGF), com isso, a ativação de ligação ao ligante regula a proliferação de queratinócitos através da introdução da ativação do sinal negativo, da fosfoinositídeo 3-quinase-AKT e das vias da proteína quinase ativada por mitógeno [12]. Alterações no EGFR, também, estão envolvida nas vias de sinalização que são responsáveis por realizar a proliferação celular, metástase, invasão, angiogênese e sobrevivência de tumores [11].

Sendo assim, os SNPs detectados no gene EGFR, por meio do método PCR alelo específico estendido, possibilitou a associação com o Carcinoma basocelular, já que, as temperaturas de *Melting*, do SNP rs121434569 apresentou temperaturas bem

estabelecidas para identificar os genótipos C/C, C/T e T/T, assim como, para o SNP rs121434568, onde foi identificado os genótipos T/T, G/T e T/T. Isso se deve aos desenhos dos primers, que apresentaram uma sequência de cauda TTT gerando fragmentos de tamanhos e temperaturas de *melting* (T_m) diferentes correspondentes ao seu alelo específico, permitindo assim, a sua discriminação.

Conclusão

A expressão e atividade do EGFR desempenha um papel crucial na patogênese do CBC, pois a frequência genotípica das amostras encontra-se em condições de desequilíbrio de *Hardy-Weinberg*, sendo o valor de $P < 0.05$. Além disso, o método PCR alelo específico estendido, possibilitou a associação com o Carcinoma basocelular, já que, as temperaturas de *Melting*, dos SNPs apresentaram temperaturas bem estabelecidas para identificar os genótipos, contribuindo, significativamente para o entendimento da Biologia Molecular do CBC, abrindo possibilidades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais direcionadas e eficazes.

REFERÊNCIAS

1. TREU, C; ALMEIDA, J.; OMAR, L. **Câncer de pele: manual teórico-prático**. Baureri: Manole, 2021.
2. BRASIL. **Instituto Nacional do Câncer**. BRASIL, 2021.
3. CHINEM, V; MIOT, H. **Epidemiologia do carcinoma basocelular**. An Bras Dermatol. 2011.
4. PESZ, K. *et al*. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and basal cell carcinoma of the skin. **Int J Dermatol**; 2014.
5. SHANG-RONG, S. *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.
6. ECK, M. J. *et al*. **Mutations in the gatekeeper residue of EGFR confer resistance to kinase inhibitors**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Boston, v. 105, n. 6, p. 2070-2075, fev. 2008

7. ACVI, C. B. *et al.* The role of EGFR overexpression on the recurrence of basal cell carcinomas with positive surgical margins. **Gene**, v. 687, [s.n], p. 35-38, 2019.
8. CIARDIELLO, F.; TROIANO, R.; BIANCHELLI, A.; De Vita, F.; Normanno, N. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as a Target for the Treatment of Lung Cancer. *Lung Cancer Biology*. Review Series: Lung Cancer Targeted Therapies, v.1, p. 82-95, 2000.
9. PERERA, E.; LOWN, I.; MERMINGAS, R.; SINCLAIR, R. **Proactive Monitoring of Nonmelanoma Skin Cancer**. Australian Journal of General Practice, v. 48, n. 7, p. 449-453, 2019.
10. NORMANNO, N. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, n. 1, p. 2-16, 2006.
11. KOZUKI, T. Management of EGFR-TKI-associated skin rash. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, 46(4), 291-298, 2016.