



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

MAYARA DOS SANTOS MAIA

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE SNPs DOS GENES DO MECANISMO DE REPARO
POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEO EM CARCINOMA BASOCELULAR NO
ESTADO DA PARAÍBA**

JOÃO PESSOA, PB

2017

MAYARA DOS SANTOS MAIA

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE SNPs DOS GENES DO MECANISMO DE REPARO
POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEO EM CARCINOMA BASOCELULAR NO
ESTADO DA PARAÍBA**

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

Orientador: Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima

JOÃO PESSOA, PB

2017

M217e Maia, Mayara dos Santos.

Estudo da associação de SNPs dos genes do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo em carcinoma basocelular no Estado da Paraíba / Mayara dos Santos Maia.- João Pessoa, 2017.
76 f. : il.-

Orientador: Profº. Drº. Eleonidas Moura Lima.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

1. Carcinoma Basocelular. 2. Família XP. 3. Genotipagem.
4. Reparo por Excisão - Nucleotídeo. 4. Polimorfismo – Nucleotídeo
Único. I. Título.

UFPB/BC

CDU – 616-006.6(043)

MAYARA DOS SANTOS MAIA

Dissertação de Mestrado avaliada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dra. Sylvania Satomi Takeno Herrero
Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB
Examinadora Externa

Prof. Dr. Plínio Dellatorre
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno

Prof. Dr. Ideltônio Feitosa Barbosa
Universidade Estadual da Paraíba
Suplente externo

Prof. Dra. Krystyna Golarch Lira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Suplente interno

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pelo dom da vida e por tão grande amor e misericórdia!

*“Se morremos com Ele, com Ele viveremos, se
com Ele padecermos, com Ele reinaremos”*

(2Tm 2,11-12)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por tão grande amor e misericórdia. Por cuidar e velar cada um dos meus passos. A Virgem Santíssima, minha Mãe e Rainha, que me conforta e guia a cada momento, a cada etapa da minha vida.

Ao meu orientador, prof. Dr. Eleonidas Moura, por primeiramente ter acreditado em mim. Deixo meus agradecimentos especiais, que com competência e profissionalismo me ensinou e me incentivou nesta etapa tão importante da minha vida. Reconheço e aprecio cada conselho, cada apoio e orientações dadas com grande zelo por ele. Que todo conhecimento por mim adquirido através da sua competência rendam muitos frutos pela frente!

A Sylvia Herrero, pessoa maravilhosa, bastante sábia, que soube me ouvir e aconselhar cada momento dessa caminhada.

Ao prof. Dr. Plínio Dellatorre, por todo suporte e apoio para prosseguir com o mestrado.

Ao médico Otávio Sérgio Lopes pelo acordo de cooperação técnico científico.

A minha família, que sempre esteve me apoiando nas decisões por mim tomadas e por todo suporte!

Aos meus amigos de laboratório: Poliane Calixto, João Ricardo, Augusto Monteiro, Agnaldo Luiz e Cynthia Germoglio pela amizade e conselhos.

Aos meus amigos de caminhada: Ysabelle Rocha, Milena Coutinho, Rodrigo, Felipe Sena, Iris Parente, Alexandre Rocha, Tainá Falcão, Renata, Juliana, Júlia, Jéssica Sobral, Frayni, Brunna Grisi, Fidelis, Matheus, Rony, Amanda e Suene pela amizade, incentivo, orações e carinho!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

O Carcinoma Basocelular (CBC) é uma neoplasia frequente em seres humanos e seu principal fator etiológico é a exposição à radiação solar. Embora alterações genéticas e epigenéticas possam ativar proto-oncogenes, inativar genes supressores de tumor e genes do mecanismo de reparo, a célula apresenta vários mecanismos que contribuem para a manutenção da estabilidade genômica. Mutações em genes de reparo podem levar a progressão tumoral e à perda da integridade do genoma levando ao surgimento do câncer. O reparo por excisão de nucleotídeo (NER) é um importante mecanismo utilizado principalmente para reparar lesões causadas por UV. O objetivo deste trabalho foi avaliar polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) dos genes *XPA* e *XPC* e o risco de desenvolver CBC. Foram analisadas 100 amostras de tecido parafinado de pacientes do Estado da Paraíba com diagnóstico histopatológico de CBC para cada polimorfismo. Os resultados foram obtidos por um método de genotipagem recentemente desenvolvido, o Didesoxi Único Alelo Específico – PCR, método que apresenta alta sensibilidade e de baixo custo. O *software* Graphpad Prism 6.01 foi utilizado para as análises estatísticas e aplicação de teste *Qui-quadrado* e Exato de *Fisher*. O SNP rs535425175 do gene *XPC* apresentou associação significativa com o CBC nas amostras analisadas ($X^2=14,51$ e $P<0,005$). Enquanto que os SNP rs745769173 do gene *XPA* e rs761106780 do gene *XPC* estão no equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, não apresentando associação com a neoplasia. Os resultados sugerem que o SNP rs535425175 do gene *XPC* pode ser considerado um fator de risco associado ao desenvolvimento de CBC.

Palavras-chaves: Carcinoma Basocelular, Família XP, Reparo por excisão de nucleotídeo, Polimorfismo de nucleotídeo único, Genotipagem.

ABSTRACT

Basal Cell Carcinoma (BCC) is a frequent neoplasm in humans and its main etiological factor is exposure to solar radiation. Although genetic and epigenetic changes can activate proto-oncogenes, inactivate tumor suppressor genes and repair mechanism genes, the cell has several mechanisms that contribute to the maintenance of genomic stability. Mutations in repair genes can lead to tumor progression and loss of genome integrity leading to the onset of cancer. Nucleotide excision repair (NER) is an important mechanism primarily used to repair injuries caused by UV. The objective of this study was to evaluate single nucleotide polymorphisms (SNP) of *XPA* and *XPC* genes and the risk of developing BCC. One hundred samples of paraffined tissue from patients from the State of Paraíba with histopathological diagnosis of BCC were analyzed for each polymorphism. The results were obtained by a newly developed genotyping method, the Dideoxy Unique Allele Specific - PCR, a method that presents high sensitivity and low cost. Graphpad Prism 6.01 software was used for the statistical analysis and application of Chi-square and Fisher's exact test. The SNP rs535425175 of the *XPC* gene showed a significant association with the BCC in the analyzed samples ($X^2 = 14.51$ and $P < 0.005$). Whereas the SNPs rs745769173 of the *XPA* gene and rs761106780 of the *XPC* gene are in the Hardy-Weinberg equilibrium, not showing any association with the neoplasia. The results suggest that the SNP rs535425175 of the *XPC* gene may be considered a risk factor associated with the development of BCC.

Keywords: Basal Cell Carcinoma, XP family, Nucleotide excision repair, Single nucleotide polymorphism, Genotyping.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Ans	Asparagina
BER	Reparo por excisão de base
CBC	Carcinoma Basocelular
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CPD	Dímero de pirimidina ciclobutano
CPNM	Câncer de pele não melanoma
DDB	<i>DNA damage-binding protein-1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSASP	<i>Dideoxy single allele-specific PCR</i>
ddNTP	Didesoxirribonucleosídeos trifosfatados
ERCC1	<i>Excision Repair Cross Complementary Group 1</i>
GGR	Reparo de Genoma Global
hHR23B	<i>RAD23B homolog B protein</i>
Ile	Isoleucina
KDa	Kilodalton
LBMEO	Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MC	Melanoma cutâneo
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos

PCNA	<i>Proliferative nuclear cell antigen</i>
RPA34	<i>Replication protein A 34</i>
RPA70	<i>Replication protein A 70</i>
RSDB	<i>Double-chain rupture repair</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TFIIH	<i>Transcription factor II H</i>
Thr	Treonina
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum complementary group A</i>
XPB	<i>Xeroderma pigmentosum complementary group B</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum complementary group C</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum complementary group D</i>
XPE	<i>Xeroderma pigmentosum complementary group E</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum complementary group F</i>
XPG	<i>Xeroderma pigmentosum complementary group G</i>
XPV	<i>Xeroderma pigmentosum complementary group V</i>
6-4 PP	6-4 fotoprodutos pirimidina-pirimidona

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de Carcinoma Basocelular.....	15
Figura 2 – Lesões no DNA causadas pela UVB e adição de compostos químicos. A – tipos de lesões que são alvos da via NER. B – dímeros de pirimidina causada pela UV. C – aduto volumoso causado pela exposição à radiação.....	22
Figura 3 – Representação esquemática do reparo por excisão de nucleotídeos (NER): 1 a – via de reparo do genoma global (GGR) e 1 b – via de reparo acoplado à transcrição (TCR), onde as proteínas de reconhecimento de danos no DNA reconhecem a lesão causada por UV ou outros agentes. 2 – as proteínas de reconhecimento de dano recrutam outras proteínas para verificação de dano e posicionamento do complexo. 3 – a DNA polimerase é recrutada e o fragmento lesionado é retirado. 4 a, b e c – a DNA polimerase faz a extensão na região onde o fragmento lesionado foi retirado e a DNA ligase liga o fragmento recém sintetizado à fita complementar.....	24
Figura 4 – Regiões de interação do XPA com outras proteínas e localização aproximada do rs745769173.....	27
Figura 5 – Domínio central do XPA.....	28
Figura 6 - Regiões de interação do XPC com outras proteínas e localização aproximada do rs535425175 e rs761106780.....	29
Figura 7 – Sequência de nucleotídeos onde se encontra o polimorfismo rs761106780 destacado com a letra K em vermelho. Ao lado desse polimorfismo, está o rs2228001, muito citado na literatura, destacado com a letra K em amarelo.....	30
Figura 8 – Genótipo G/G do SNP do rs745769173 do gene <i>XPA</i> com Tm de 66°C para o alelo G.....	41
Figura 9 – Genótipo A/G do SNP do rs745769173 do gene <i>XPA</i> com Tm de 80°C para o alelo A.....	42
Figura 10 – Genótipo A/A do SNP do rs535425175 do gene <i>XPC</i> com Tm de 70°C para o alelo A.....	43
Figura 11 – Genótipo A/C do SNP do rs535425175 do gene <i>XPC</i> com Tm de 87°C para o alelo C.....	44
Figura 12 – Genótipo C/C do SNP do rs535425175 do gene <i>XPC</i> com Tm de 87°C para o alelo C.....	45
Figura 13 – Genótipo G/G do SNP do rs761106780 do gene <i>XPC</i> com Tm de 74°C para o alelo G.....	46

Figura 14 – Genótipo G/T do SNP do rs761106780 do gene *XPC* com Tm de 88°C para o alelo T..... .47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária*.....	17
Tabela 2 – Dados histopatológicos das amostras de Carcinoma Basocelular.....	32
Tabela 3 - Primer e sequência complementar para genotipagem do SNP rs745769173 do gene <i>XPA</i> e dos SNP rs535425175 e rs761106780 do gene <i>XPC</i>	38
Tabela 4 – Distribuição genotípica e frequência alélica dos SNP nos genes estudados.....	40
Tabela 5 – Características clinicohistopatológicas associadas com o genótipo do gene <i>XPC</i> do SNP rs5354251745.....	48

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
EPÍGRAFE.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
SUMÁRIO.....	XIV
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Câncer.....	16
1.2 Carcinoma Basocelular	17
1.2.1 Definição	17
1.2.2 Etiologia e fatores de risco	18
1.2.3 Epidemiologia	19
1.3 Mecanismos de reparo.....	20
1.3.1 O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo (NER).....	21
1.3.2 Os Genes da Família XP	22
1.4 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)	25
1.5 Os SNPs de interesse em Carcinoma basocelular.....	26
1.5.1 Gene <i>XPA</i>	26
1.5.2 Gene <i>XPC</i>	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivo Específicos	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Aspectos éticos	32
3.2 Amostras.....	32
3.3 Biologia Molecular.....	36
3.3.1 Extração do DNA.....	36
3.3.2 Validação <i>in silico</i>	37
3.3.2.1 Técnica e desenho dos iniciadores.....	37
3.3.3. Método Didesoxi Único Alelo Específico PCR (<i>Dideoxy single allele-specific PCR-DSASP</i>).....	37
3.4 Análise estatística.....	39

4 RESULTADOS.....	40
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

O câncer se origina através de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em genes específicos como, por exemplo; oncogenes, genes supressores de tumor e genes do mecanismo de reparo em diversos tipos celulares. Alterações nos oncogenes conduzem ao ganho de função, levando à proliferação celular descontrolada e alterações em genes supressores de tumor levam à perda de função, através da inativação de genes responsáveis por controlar a proliferação e manter a integridade da célula. A inativação desses genes culmina no comprometimento da homeostase celular, e essas alterações afetam os genes de reparo causando a instabilidade genômica (KNUDSON, 1971; BAYLIN et al, 1986; VOGELSTEIN; KINZLER, 1993).

De acordo com Weinberg et al (2008), os cânceres são classificados considerando os tecidos e os tipos celulares dos quais eles derivam. Os cânceres derivados de células epiteliais são denominados carcinomas e é o tipo de câncer mais comum em humanos (ALBERTS et al, 2010).

O desenvolvimento de células cancerosas é complexo e envolvem combinações de várias características aberrantes a partir de uma célula normal. Hejmadi (2010) descreve um modelo com as características de uma célula cancerosa:

- 1 - Imortalidade: divisão celular contínua e replicação sem limite
- 2 – Entrada de sinais (fatores de crescimento a partir de oncogenes)
- 3 – Substituição dos sinais de entrada (fatores anti-crescimento a partir de genes supressores de tumor)
- 3 – Resistência à morte celular (apoptose)
- 4 – Angiogênese: indução de crescimento de novos vasos sanguíneos
- 6 – Metástase: invasão para outros sítios

Conforme Hejmadi (2010), a iniciação e a progressão do câncer dependem do envolvimento de fatores externos (tabaco, químicos, radiação e organismos infecciosos) e fatores dentro da célula (mutações herdadas, hormônios, condições imunes e mutações que afetam o metabolismo).

A progressão tumoral é dirigida por uma sequência de mutações que ocorrem aleatoriamente e alterações epigenéticas do DNA que afetam os genes que controlam a proliferação, sobrevivência celular e outras características associadas ao fenótipo celular maligno (BAYLIN et al, 1986; WEINBERG, 2008).

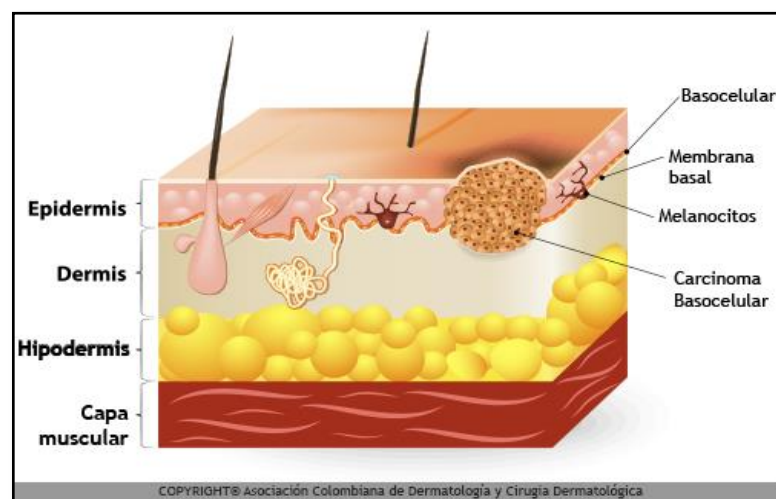
Sendo a progressão tumoral um evento que tem a contribuição sucessiva de mutações que se acumulam na célula, é necessário evitar esse descontrole por mecanismos existentes na célula que se deve aos mecanismos de reparo. No entanto, isso indica que o desenvolvimento do câncer implica também na instabilidade genômica por falhas nesses mecanismos de reparo. As implicações para o câncer são: a quebra da integridade genômica como ingrediente essencial na formação de tumores humanos e pode surgir prontamente do enfraquecimento da maquinaria de reparo (WEINBERG et al, 2008).

1.2. Carcinoma Basocelular

1.2.1. Definição

O Carcinoma Basocelular (CBC) é uma neoplasia cutânea que se origina de células basais epiteliais pluripotentes imaturas, que perderam sua capacidade de diferenciação e queratinização normais e dos anexos cutâneos (ALMEIDA et al, 2009) (**Figura 1**).

Figura 1 – Esquema de Carcinoma Basocelular.



Fonte: http://www.cancerdepielcolombia.org/dt_portfolios/carcinoma-

O tipo mais comum de câncer de pele não melanoma é o Carcinoma Basocelular (CBC), seguido pelo Carcinoma de Células Escamosas (CCE) (KOSINIAK-KAMYSSZ et al, 2012). A incidência de ambos os cânceres de pele melanoma e não melanoma tem aumentado em todo o mundo. Portanto, é de grande importância obter um profundo conhecimento de câncer de pele, especialmente sua etiologia (WUNING et al, 2014).

1.2.2. Etiologia e fatores de risco

O risco de desenvolver câncer de pele depende de uma combinação de fatores ambientais e predisposições genéticas pessoais (KOSINIAK-KAMYSSZ et al, 2012). A incidência de câncer de pele está relacionada à etnia, idade, gênero, exposição à radiação ultravioleta (UV) e a capacidade individual de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA) (CHINEM; MIOT, 2011).

O principal fator etiológico responsável pela CBC é a exposição crônica aos raios UV sendo a maior parte dos raios UVB (DOURMISHEV; RUSINOVA; BOTEV, 2013). A radiação UVB gera fotoprodutos mutagênicos no DNA, como os dímeros de ciclodipirimidina, e mutações em importantes genes reguladores das funções celulares (CHINEM; MIOT, 2011) resultando na ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores de tumor nos queratinócitos (DOURMISHEV; RUSINOVA; BOTEV, 2013). A radiação UVA apresenta efeito indireto, gerando radicais livres citotóxicos e mutagênicos favorecendo os efeitos da radiação UVB. Além disso, a radiação UV tem ação imunossupressora na pele, comprometendo a atividade de vigilância antitumoral local das células dendríticas (CHINEM; MIOT, 2011).

Os vários tipos de danos causados geralmente pela radiação ultravioleta, como acontece com o câncer de pele, pode ativar várias vias de mecanismos de reparo. A falha no reparo dessas alterações genéticas pode levar a uma desregulação nos mecanismos que controlam o crescimento celular, culminando num crescimento desordenado e formação de tumor. Os sistemas de reparo do DNA desempenham um papel importante na manutenção da integridade do genoma e proteção contra mutações que podem levar ao câncer, incluindo câncer de pele (WUNING et al, 2014).

1.2.3. Epidemiologia

O CBC é o tipo de câncer de pele não melanoma mais comum (OTSUKA et al, 2015), que inclui o Carcinoma de células basais (CBC) e o Carcinoma de células escamosas (CCE) (WUNING et al, 2014). Segundo Chinem; Miot (2011), o CBC é a neoplasia cutânea mais frequente no Brasil e corresponde a 70-80% desses tumores.

Estima-se que ocorram 80.850 novos casos de câncer de pele não melanoma nos homens e 94.910 nas mulheres no Brasil, em 2016. Esses valores correspondem a um risco estimado de 81,66 casos novos a cada 100 mil homens e 91,98 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

O câncer de pele não melanoma é o primeiro mais incidente em homens nas Regiões Sul (138,75/100 mil), Centro-Oeste (114,71/100 mil) e Sudeste (92,86/100 mil). Nas Regiões Nordeste (42,48/100 mil) e Norte (28,89/100 mil), encontram-se na segunda posição. Nas mulheres, é o mais frequente em quatro Regiões, com um risco estimado de 134,19/100 mil na Região Sudeste, 102,71/100 mil na Região Centro-Oeste, 93,58/100 mil na Região Sul e 44,12/100 mil na Região Nordeste. Já na Região Norte (23,12/100 mil), ocupa a segunda posição (INCA, 2015).

Na Paraíba, o câncer de pele não melanoma ocupa a segunda posição com maior número de casos estimados para o ano de 2016, perdendo apenas para o câncer de próstata nos homens e câncer de mama nas mulheres (INCA, 2015) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Estimativa para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária*

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capital		Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	1.040	54,49	190	53,58	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	800	38,50	250	62,69
Colo do Útero	-	-	-	-	330	16,21	80	19,39
Traqueia, Brônquio e Pulmão	180	9,37	50	14,73	150	7,50	40	10,22
Cólon e Reto	120	6,20	40	10,75	150	7,42	50	12,68
Estômago	230	12,10	50	13,17	180	8,90	30	8,48
Cavidade Oral	150	8,15	30	9,42	110	5,68	20	5,79
Laringe	130	6,65	30	9,80	40	1,92	**	1,89
Bexiga	70	3,62	20	4,42	40	2,04	**	2,74
Esôfago	100	5,54	20	5,40	50	2,30	**	1,28
Ovário	-	-	-	-	90	4,38	30	6,41
Linfoma de Hodgkin	**	0,79	**	1,35	**	0,49	**	0,49
Linfoma não Hodgkin	80	4,24	20	6,77	50	2,64	20	5,71
Glândula Tireoide	80	3,30	**	3,88	170	8,20	50	11,73
Sistema Nervoso Central	90	4,82	20	7,15	80	3,91	20	5,44
Leucemias	90	4,70	20	6,40	90	4,64	20	6,08
Corpo do Útero	-	-	-	-	100	4,94	30	7,29
Pele Melanoma	40	2,09	**	3,23	30	1,34	**	1,34
Outras Localizações	710	37,49	150	42,41	650	32,33	170	41,23
Subtotal	3.100	162,66	870	190,23	3.120	154,07	860	213,82
Pele não Melanoma	1.010	53,05	120	32,98	1.020	50,51	160	39,53
Todas as Neoplasias	4.110	216,06	790	224,30	4.140	204,44	1.020	253,60

*Números arredondados para múltiplos de 10. / **Número de casos menor que 15.

Fonte: INCA, 2015

1.3. Mecanismos de reparo do DNA

Os principais defeitos no reparo de DNA podem causar fenótipos propensos ao câncer (RUCZINSKI et al, 2012) uma vez que é um mecanismo de defesa onipresente que desempenha um papel essencial na sobrevivência da célula e na manutenção da estabilidade do genoma (DECORDIER; LOOCK; KIRSCH-VOLDERS, 2010).

A capacidade de uma célula de reparar algum dano em seu genoma representa um fator importante que contribui para adquirir variabilidade interindividual como resposta à exposição ao agente mutagênico endógeno ou exógeno. Avaliando essa variabilidade interindividual na capacidade de reparo é crucial o fornecimento de biomarcadores não só

para prevenção primária do câncer e diagnóstico precoce, mas também para o tratamento (DECORDIER; LOOCK; KIRSCH-VOLDERS, 2010).

A falha no reparo do DNA pode ser uma causa potente de predisposição genética tanto para o câncer de pele não melanoma (CPNM) como para outras doenças malignas (RUCZINSKI et al, 2012).

A deficiência no reparo do DNA pode estar relacionada a extrema sensibilidade à radiação ultravioleta ou pode estar relacionada a mutações hereditárias nos genes de reparo do DNA. A contribuição de variantes alélicas comuns de genes de reparo representa um risco de câncer para a população.

O reparo do DNA é realizado através de múltiplas interações bioquímicas que implicam diversas vias. Essas vias podem estar associadas à carcinogênese.

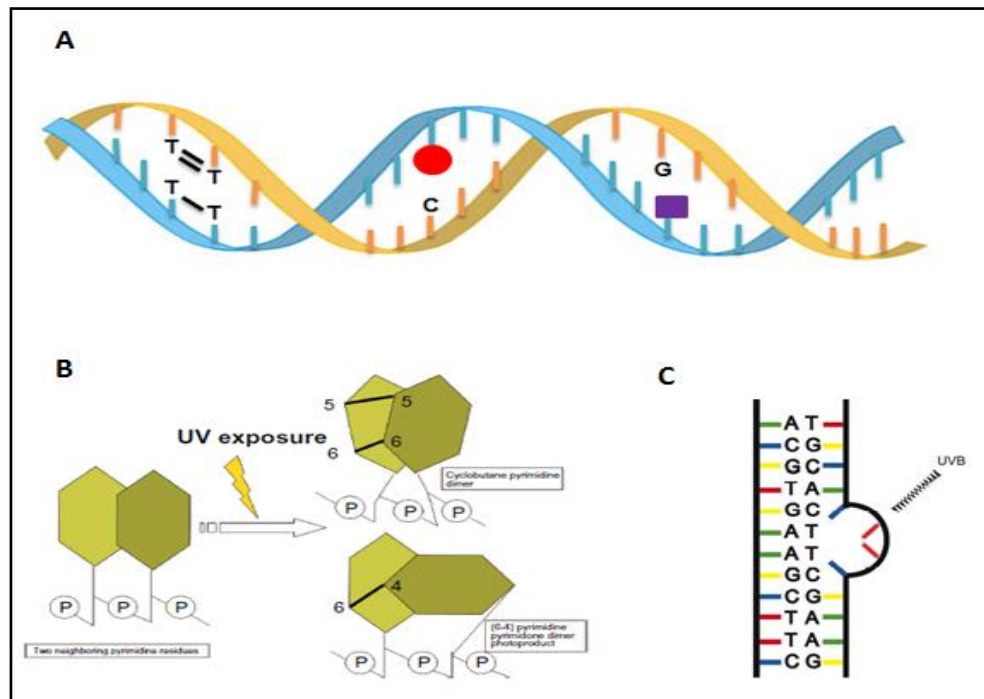
No genoma humano, foram encontrados mais de 130 genes envolvidos em sistemas de reparo de DNA (DECORDIER; LOOCK; KIRSCH-VOLDERS, 2010). Os mesmos autores relatam pelo menos quatro vias principais de reparo: reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por incompatibilidade ou pareamento errôneo (RM) e reparo por ruptura de cadeia dupla (RDSB).

1.3.1. O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo (NER)

A via de reparo por excisão nucleotídica (NER) é enfatizada para CPNM porque remove dímeros de pirimidina e fotoprodutos, devido as lesões de exposição à radiação ultravioleta (RUCZINSKI et al, 2012). Lesões no DNA podem bloquear processos celulares vitais tal como a transcrição ou a replicação conduzindo à interferência na expressão do gene ou a conversão de lesões em mutações, respectivamente (ALEKSEEV; COIN, 2015). Segundo os mesmos autores, defeito na transcrição pode levar a célula a apoptose, enquanto a presença de uma mutação pode conduzir a várias doenças, incluindo o câncer, com consequências na sobrevivência do indivíduo (**Figura 2**).

Os danos no DNA inclui dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e 6-4 fotoprodutos pirimidina-pirimidona (6-4PPs) produzidos por irradiação ultravioleta (ALEKSEEV; COIN, 2015), dentre outros adutos que lesionam o DNA.

Figura 2 – Lesões no DNA causadas pela UVB e adição de compostos químicos. A – tipos de lesões que são alvos da via NER. B – dímeros de pirimidina causada pela UV. C – aduto volumoso causado pela exposição à radiação.



Fonte: BUDDEN; BOUDEN, 2013; adaptado por MAIA (2017).

Essa via de reparo consiste em duas vias: o reparo genômico global (GGR), que investiga o genoma para vertentes distorções, e o reparo acoplado a transcrição (TCR), que remove lesões distorcidas que bloqueiam as RNA polimerases de alongamento (DECORDIER; LOOCK; KIRSCH-VOLDERS, 2010).

Dessa forma, os polimorfismos genéticos nos genes de reparo do DNA são alvos para estudo do papel de genes específicos em câncer humano e na identificação de indivíduos suscetíveis.

1.3.2. Os Genes da Família XP

O reparo do DNA danificado é essencial para a manutenção da estabilidade genômica e a sobrevivência das células. Porém, as células estão sujeitas a danos provocados principalmente pela radiação ultravioleta.

A radiação UV geralmente resulta em morte celular, mas se não for controlada, ela pode afetar a integridade do DNA das células e tecidos em homeostase e causar mutações

em oncogenes e genes supressores de tumores (BUDDEN; BOWDEN, 2013). Estas mutações, se não reparadas, descontrola a proliferação celular, aumentando o risco de desenvolvimento de câncer.

A via NER é composta por 28 genes, oito deles são da família XP. Defeitos em alguns desses genes podem levar ao surgimento de várias síndromes, dentre elas, o Xeroderma Pigmentoso (XP), que está associado ao déficit do reparo do DNA provocado por lesões através da radiação UV (WEINBERG, 2008).

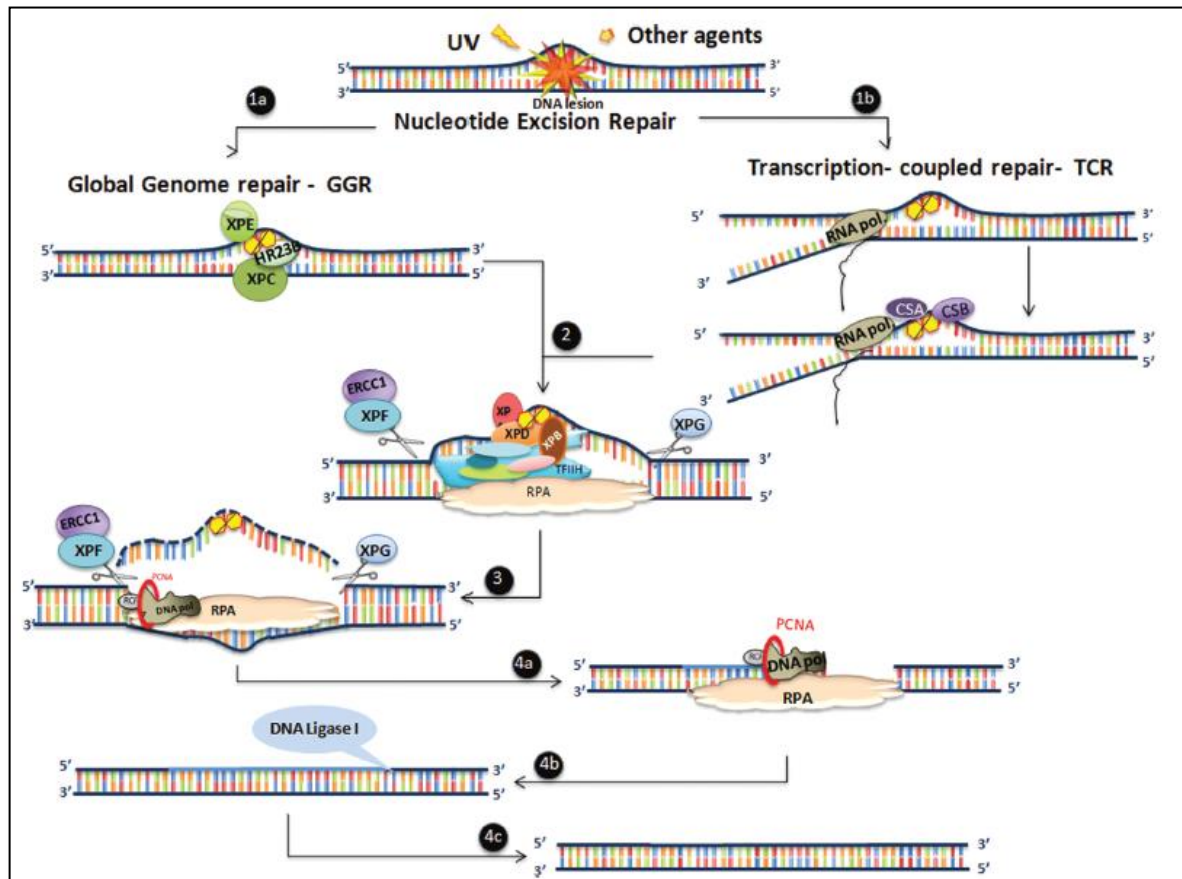
O XP é uma doença autossômica recessiva (LEHMANN; MCGIBBON; STEFANINI, 2011) e possui 10.000 vezes maior risco de desenvolver câncer de pele não melanoma antes de 10 anos e um aumento de 2.000 vezes na incidência de melanoma maligno antes de 20 anos de idade (SANTIAGO et al, 2015).

As células de todos os pacientes XP apresentam um aumento da frequência de mutagênese após exposição à luz UV que é correlacionada com defeitos moleculares em processamento de danos no DNA, que conduz a consequências mutagênicas nas células e aumento na tumorigênese em pacientes (KRAEMER; DIGIOVANNA, 2014).

Sete de oito genes associados à XP, chamados *XPA* até *XPG*, codificam proteínas que atuam como componentes no grande complexo multiprotéico de reparo por excisão de nucleotídeos. O oitavo gene, *XPV*, especifica a DNA polimerase predisposta a erro pol- η , das quais muitas células parecem fazer uso quando suas DNAs polimerases usuais e são incapazes de copiar sobre lesões não-reparadas no DNA, tais como dímeros de pirimidina (WEINBERG, 2008). Os defeitos no oitavo gene XP não afetam a NER (LEHMANN; MCGIBBON; STEFANINI, 2011).

O XPC e XPE são proteínas necessárias para reconhecer os fotoprodutos no DNA (LEHMANN; MCGIBBON; STEFANINI, 2011). XPC também desestabiliza o DNA duplex independente de lesão (SCHARER, 2013). XPB e XPD fazem parte de um complexo de proteínas TFIIH, que abre a estrutura do DNA em torno do local dos fotoprodutos. A proteína XPA verifica se as proteínas estão na posição correta e em seguida as nucleases XPG e XPF cortam o DNA de cada lado dos danos, de modo que a secção danificada pode ser removida e substituída com o DNA intacto (LEHMANN; MCGIBBON; STEFANINI, 2011) (**Figura 3**).

Figura 3 – Representação esquemática do reparo por de excisão de nucleótidos (NER): 1a – via de reparo do genoma global (GGR) e 1b – via de reparo acoplado à transcrição (TCR), onde as proteínas de reconhecimento de danos no DNA reconhecem a lesão causada por UV ou outros agentes. 2 – as proteínas de reconhecimento de dano recrutam outras proteínas para verificação de dano e posicionamento do complexo. 3 – a DNA polimerase é recrutada e o fragmento lesionado é retirado. 4a, 4b e 4c – a DNA polimerase faz a extensão na região onde o fragmento lesionado foi retirado e a DNA ligase liga o fragmento recém-sintetizado à fita complementar.



Fonte: MENCK; MUNFORD (2014).

Segundo estudos realizados por Nikolaou; Stratigos; Tsao (2012), Carcinoma Basocelular e outros tipos de CPNM podem ocorrer tanto esporadicamente ou através da predisposição hereditária por meio da síndrome de Xeroderma Pigmentoso, por exemplo.

A importância de NER na etiologia da CPNM é claramente ilustrado pelo Xeroderma Pigmentoso, uma doença rara, altamente penetrante de mutações com capacidade de modificar a NER para remover fotoprodutos do DNA, levando a mil vezes maior o risco de CPNM (WHELESS, 2012). Assim, diferentes genes XP desempenham um papel importante

no crescimento de tumores de Carcinomas Basocelulares, uma vez que apresentam um déficit no reparo do DNA danificado.

1.4. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)

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

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

A maior incidência na população sugere que um polimorfismo ocorre naturalmente, ou com um efeito neutro ou benéfico. O SNP exemplifica o polimorfismo mais comum, podendo surgir a cada 1000 pares de bases do genoma humano, e é normalmente encontrado em áreas que rodeiam genes codificadores de proteínas – regiões reconhecidas como críticas para a ligação e regulação de microRNA e expressão do gene/proteína (KARKI et al, 2015). Os SNP também podem estar presentes em sequências não codificantes, íntrons, ou em regiões intergênicas.

Essas variações no genoma podem ser alvo de estudo como propensas à susceptibilidade a doenças, incluindo o câncer.

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

A descoberta de milhões de polimorfismos genéticos do genoma no ser humano desencadeou a esperança de que essas variações nas sequências do DNA são à base das variações interindividuais e será útil para a avaliação de risco e tratamento de doenças, incluindo câncer. Pode-se considerar que todos os genótipos de um indivíduo pode

tecnicamente ser descrito e, a partir deste conhecimento, extrapolar a atividade funcional potencial, também conhecido como fenótipo (DECORDIER; LOOCK; KIRSCH-VOLDERS, 2010).

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

1.5. Os SNPs de interesse em Carcinoma basocelular

1.5.1 Gene XPA

O gene *XPA* está localizado na região cromossômica 9q22.33 e contém seis éxons e cinco íntrons. A proteína codificada por este gene possui 273 aminoácidos com massa molecular de 31 KDa (TAKANA et al, 1990). Os resíduos de cisteína que formam uma estrutura de dedo de zinco e o grupo de ácido glutâmico na região codificada foram considerados importantes para a função de reparo (MYAMMOTO et al, 1992).

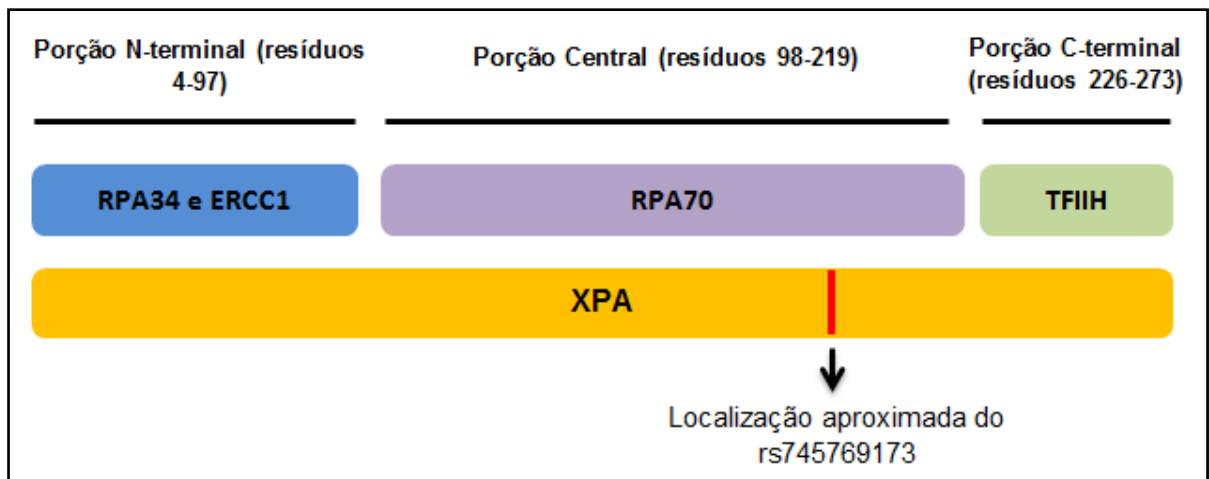
XPA é uma proteína que está envolvida em ambas as vias de reparo de genoma global e transcricional (DING, 2012). XPA verifica a presença de danos no DNA, recruta fatores NER, estabiliza intermediários de reparo, posiciona a maquinaria de reparo no DNA e interage com várias proteínas, tais como TFIIH e ERCC1-XPF, RPA, hHRD23B, DDB, PCNA (SCHARER, 2015; NISHI et al, 2005).

Originalmente considerado o primeiro fator de reconhecimento de dano, o XPA consiste em diversos domínios funcionais distintos. Sua porção N-terminal (resíduos 4-97) contém regiões de ligação a RPA34 e a ERCC1 e a porção C-terminal (resíduos 226-273) se liga a TFIIH. O domínio central (resíduos 98-219) foi identificado como o polipeptídeo mínimo essencial para a ligação ao DNA danificado e para a ligação a RPA70, a maior subunidade de cadeia simples, que é indispensável para a etapa inicial do reparo por excisão de nucleotídeos (SCHARER, 2013; IKEGAMI et al, 1998) (**Figura 4**).

a) O SNP rs745769173

Polimorfismo de substituição de isoleucina para treonina no códon 186 (Ile186Thr) (**Figura 4**). O códon 186 está localizado no domínio central de XPA, que consiste em um subdomínio dedo de zinco, uma região hélice-volta-hélice de ligação ao DNA. Esta região é estabilizada por um núcleo hidrofóbico dado pelos resíduos Ala 144, Leu 150, Leu 150, Leu 155, Leu 162 e Ile 186 (IKEGAMI, 1998) (**Figura 5**).

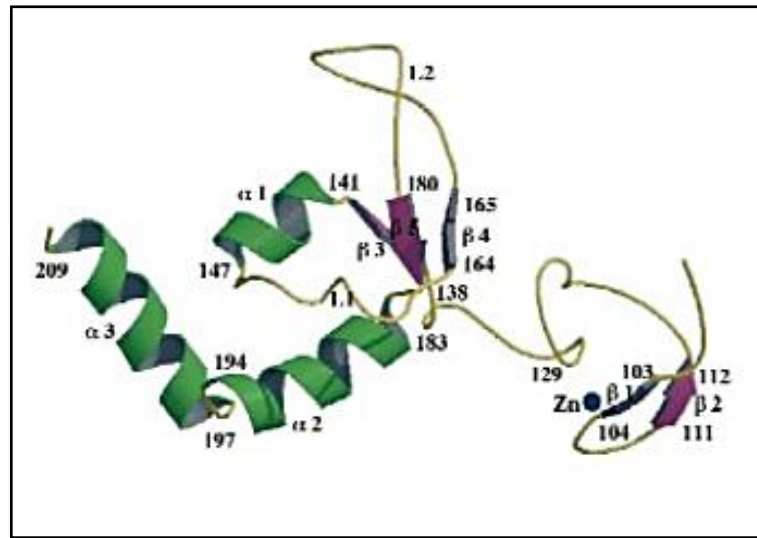
Figura 4 – Regiões de interação do XPA com outras proteínas e localização aproximada do rs745769173.



Fonte: MAIA (2017).

A substituição de isoleucina para treonina pode desestabilizar a região hélice-volta-hélice, uma vez que a treonina é hidrofílica e essa substituição também poderia afetar a interação com a proteína RPA nessa região central. O XPA interage com maior afinidade no DNA quando está ligada ao RPA (IKEGAMI, 1998).

Figura 5 - Domínio central do XPA.



Fonte: IKEGAMI, 1998.

1.5.2 Gene *XPC*

O gene *XPC* está localizado na região cromossômica 3p25.1 e consiste em 16 éxons e 15 íntrons. A proteína codificada por este gene contém 940 aminoácidos. A estrutura da proteína ainda não foi determinada (KAMIONKA; FEIGON, 2004).

Quanto à função, é um dos oito genes fundamentais na via NER e desempenha um papel importante nos primeiros passos do NER genoma global, especialmente no reconhecimento de danos, formação do complexo aberto e reparo (HE et al, 2013). O XPC reconhece e se liga ao DNA danificado e sua interação com hHR23 protege a proteína XPC da degradação proteolítica e estimula a sua função. Enquanto que a Centrin 2 (CENTN2), uma pequena proteína de ligação ao cálcio que pertence à superfamília calmodulina, aumenta a afinidade de ligação do XPC ao DNA (KAMIONKA; FEIGON, 2004; SUGASAWA, 2016).

Após o reconhecimento, o complexo XPC interage com XPA, que constitui o complexo de pré-incisão, com RPA. XPC também interage com TFIIH, recrutando-o para o local da lesão, onde atua como um helicase abrindo a dupla hélice (FRANCISCO; MENEZES; CHAMMAS, 2008).

a) O SNP rs535425175

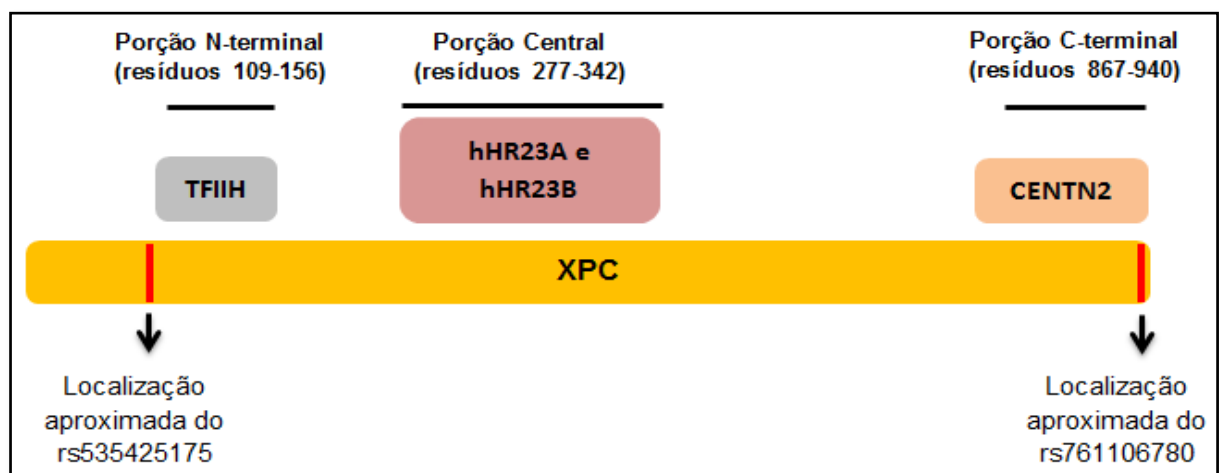
Polimorfismo de substituição de lisina por asparagina no códon 108 (Lys108Asn). O XPC interage com diversas proteínas, mas a região onde o códon está localizado ainda não foi determinada. Embora ainda não determinada, o códon 108 do XPC está próximo à região de interação com o TFIIH, que corresponde aos resíduos 109-156 no XPC (OKUDA et al, 2015) (**Figura 6**).

O TFIIH atua como uma helicase e o XPC recruta essa proteína através de interações envolvendo a subunidade p62 de TFIIH (OKUDA et al, 2015).

a) O SNP rs761106780

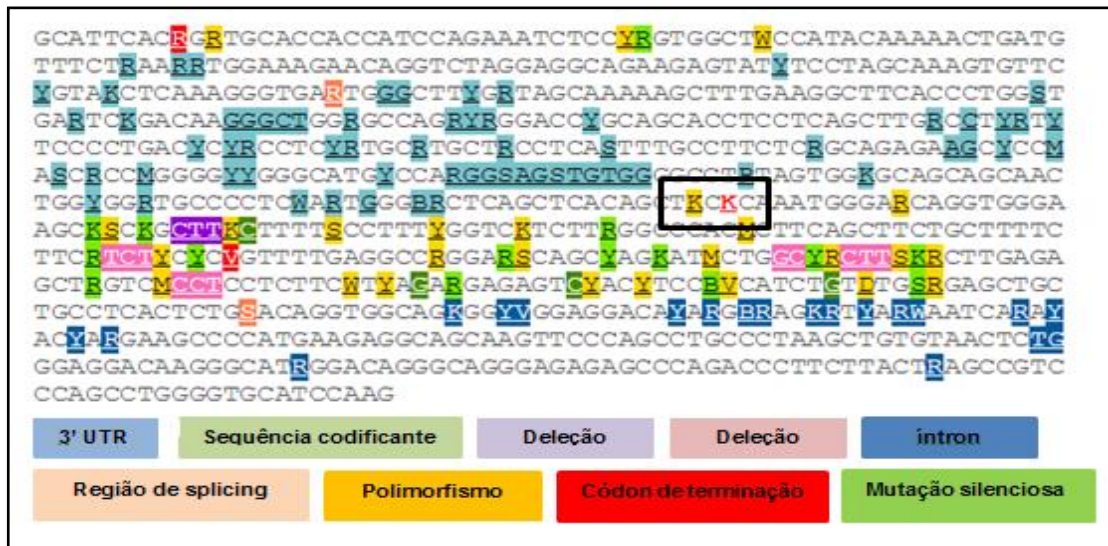
Polimorfismo de substituição de glutamato por alanina no códon 940 (Glu938Ala). O centro de ligação do XPC proposto para ser crítico para a interação com CENTN2 está localizado dentro do segmento C-terminal (resíduo 867-940) (**Figura 6**). Segundo análises da estrutura molecular dessa região, autores sugerem que este segmento seja altamente desestruturado e flexível e que a ligação da proteína Centrin pode estabilizar esta região. Essa estabilidade permite controlar o recrutamento de TFIIH (CHARBONNIER et al, 2007).

Figura 6 – Regiões de interação do XPC com outras proteínas e localização aproximada dos rs535425175 e rs761106780.



Fonte: MAIA (2017)

O SNP rs761106780 também está localizado próximo ao polimorfismo rs2228001, SNP muito relatado na literatura envolvido na susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias (JIN et al, 2014; ZHOU et al, 2016; HUA et al 2016) (**Figura 7**).



Fonte: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Sequence?db=core;r=3:14145451-14146451;v=rs761106780;vdb=variation;vf=126627993> Adaptado por MAIA (2017)

Figura 7 – Sequência de nucleotídeos onde se encontra o polimorfismo rs761106780 destacado com a letra K em vermelho e ao lado desse polimorfismo está o rs2228001 destacado com a letra K em amarelo, citado na literatura.

O presente estudo analisou polimorfismos (SNPs) de *XPA* (rs745769173) e *XPC* (rs535425175 e rs761106780) localizados em regiões de interação com diversas proteínas em amostras de tecido parafinado de pacientes com diagnóstico histopatológico de CBC. A influência de SNPs no desenvolvimento dessa neoplasia pode fornecer um possível prognóstico da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a genotipagem dos SNPs rs745769173 do gene *XPA* e rs535425175 e rs761106780 do gene *XPC* em amostras de Carcinoma Basocelular.

2.2 Objetivos Específicos

1 - Estabelecer a frequência alélica dos SNPs rs745769173, rs535425175 e rs761106780 em amostras de Carcinoma Basocelular;

2 – Estimar a associação dos SNPs dos genes 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 100 amostras de tecido parafinado com tempo superior a cinco anos do banco de laudos expedidos pelo Laboratório UNILAB/ João Pessoa - PB, com diagnóstico histopatológico de Carcinoma Basocelular e informações sobre idade, gênero, localização do tumor e tipo histológico (**Tabela 2**). Nesse estudo foram analisadas 100 amostras para cada polimorfismo.

Tabela 2 – Dados histopatológicos das amostras de Carcinoma Basocelular.

Amostra	Sexo	Idade	Localização da neoplasia	Tipo Histológico
01	Feminino	78	Orelha esquerda	Nodular
02	Feminino	78	Sulco nasolabial direito	Nodular ulcerado
03	Masculino	78	Orelha direita	Nodular ulcerado
04	Feminino	57	Partes moles de nariz à esquerda	Esclerodermiforme
05	Masculino	83	Canto interno do olho esquerdo	Nodular pigmentado
06	Feminino	74	Orelha direita	Nodular
07	Feminino	78	Partes moles de nariz à esquerda	Nodular pigmentado
08	Masculino	70	Partes moles de orelha direita	Nodular
09	Feminino	53	Partes moles de nariz	Basoescamoso nodular
10	Masculino	85	Partes moles de nariz	Superficial

esquedo				
11	Feminino	74	Região Molar esquerda	Nodular pigmentado
12	Feminino	57	Região maxilar esquerda	Infiltrado tecido fibroso
13	Masculino	78	Joelho direito	Nodular
14	Feminino	Não informado	Região clavicular esquerda	Nodular
15	Masculino	78	Ponta Nasal	Nodular
16	Feminino	65	Órbita esquerda, canto lateral	Nodular
17	Feminino	82	Partes moles Nariz à direita	Nodular pigmentado
18	Feminino	68	Partes moles nariz	Nodular
19	Masculino	45	Região temporal esquerda	Nodular
20	Masculino	45	Ombro direito	Superficial multifocal
21	Masculino	86	Região pre-auricular direita	Nodular
22	Feminino	58	Nariz	Nodular
23	Masculino	47	Nariz esquerdo	Nodular
24	Masculino	81	Abdômen	Nodular
25	Masculino	70	Nariz à direita	Nodular
26	Masculino	77	Nariz à direita	Ulcerado
27	Masculino	89	Região Temporal direita	Nodular
28	Feminino	80	Pescoço	Nodular
29	Feminino	80	Região molar esquerda	Nodular
30	Masculino	94	Orelha direita	Superficial
31	Feminino	71	Canto interno do olho esquerdo	Nodular
32	Masculino	62	Face esquerda	Nodular
33	Masculino	73	Não informado	Nodular ulcerado
34	Feminino	67	Dorso nasal	Nodular
35	Masculino	77	Nariz	Nodular ulcerado
36	Feminino	72	Nariz	Nodular
37	Masculino	52	Nariz	Nodular
38	Masculino	70	Região mentoniana	Nodular
39	Feminino	90	Malar esquerdo	Nodular pigmentado

40	Feminino	75	Malar direita	Escleridermiforme ulcerado
41	Masculino	83	Face direita	Nodular
42	Masculino	33	Região temporo-frontal	Nodular pigmentado
43	Feminino	40	Olho	Nodular
44	Masculino	51	Região esternal	Nodular
45	Feminino	72	Face	Nodular
46	Masculino	71	Mão	Nodular
47	Masculino	54	Antebraço esquerdo	Nodular ulcerado
48	Feminino	77	Região pré-auricular	Nodular ulcerado
49	Feminino	75	Nariz	Nodular
50	Masculino	54	Ombro	Nodular ulcerado
51	Feminino	24	Mama	Não informado
52	Feminino	57	Nariz	Nodular
53	Feminino	77	Nariz	Nodular
54	Feminino	65	Fronte	Nodular
55	Feminino	48	Nariz	Superficial
56	Masculino	85	Nariz	Nodular
57	Feminino	58	Lábio superior esquerdo	Nodular
58	Masculino	51	Região peitoral	Nodular
59	Masculino	63	Região cervical	Nodular pigmentado ulcerado
60	Masculino	60	Região fronto-temporal	Nodular
61	Masculino	88	Nariz	Nodular
62	Masculino	95	Periorbitaria esquerda	Nodular
63	Feminino	29	Braço direito	Nodular ulcerado
64	Masculino	69	Pescoço	Nodular ulcerado
65	Masculino	88	Olho	Nodular
66	Masculino	88	Tórax	Nodular
67	Feminino	52	Nariz	Nodular
68	Feminino	52	Ombro direito	Superficial, multifocal
69	Masculino	88	Nariz	Nodular

70	Feminino	67	Região periorbital	Nodular ulcerado
71	Masculino	46	Face	Nodular
72	Feminino	83	Nariz	Nodular
73	Masculino	43	Frontal esquerda	Superficial, multifocal
74	Masculino	43	Pescoço	Superficial, multifocal
75	Masculino	43	Ombro	Superficial, multifocal
76	Feminino	Não identificado	Pre-auricular	Nodular
77	Feminino	83	Nariz	Nodular
78	Feminino	63	Periorbita	Nodular Esclerodermiforme
79	Feminino	78	Temporal esquerda	Nodular/ Superficial, Ulcerado
80	Masculino	53	Ombro	Superficial
81	Masculino	53	Pescoço	Superficial
82	Masculino	72	Mandibular	Nodular
83	Masculino	62	Nariz	Esclerodermiforme
84	Masculino	69	Região zigomática direita	Nodular
85	Feminino	68	Temporal esquerda	Nodular
86	Feminino	68	Dorso da mão direita	Nodular
87	Masculino	79	Mão direita	Nodular ulcerado
88	Masculino	59	Malar direita	Nodular
89	Feminino	69	Região frontal	Nodular pigmentado
90	Feminino	76	Lábio superior esquerdo	Nodular
91	Feminino	67	Face	Nodular
92	Masculino	70	Nariz	Nodular
93	Masculino	79	Nariz	Nodular, pigmentado
94	Masculino	83	Antebraço esquerdo	Cetarose actínica hipertrófica
95	Feminino	67	Face	Nodular
96	Feminino	52	Malar esquerda	Nodular
97	Feminino	57	Nariz	Nodular
98	Masculino	78	Nariz	Nodular ulcerado

99	Masculino	58	Nariz	Nodular
100	Feminino	76	Lábio superior direito	Nodular

3.3. Biologia Molecular

3.3.1 Extração do DNA

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

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

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

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

3.3.2 Validação *in silico*

3.3.2.1 Técnica e desenho dos iniciadores

O método de genotipagem utilizado neste trabalho foi o método Didesoxi Único Alelo Específico PCR (*Dideoxy single allele-specific PCR- DSASP*) desenvolvida por Lima et al (2015). Os iniciadores foram desenhados por validação *in silico* com auxílio de bancos de dados e *software* de análise de alinhamento de sequência como: *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>), *GeneRunner* (<http://www.generunner.net/>) e *BioEdit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

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

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

A genotipagem pelo método DSASP deve considerar as seguintes recomendações:

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

O método DSASP foi padronizado para os SNPs dos genes *XPA* (rs745769173) e *XPC* (rs535425175 e rs761106780) (**tabela 3**).

Tabela 3 - Primer e sequência complementar para genotipagem do SNP rs745769173 do gene *XPA* e dos SNP rs535425175 e rs761106780 do gene *XPC*.

Gene	SNPs	Iniciadores/ Sequências complementares
<i>XPA</i>	rs745769173	5' TTCTTGACTACCCCAAACCTTCRASAG 3'
		5' YGGATTTTGTGTTGTAGAYTRTGAAGAGGKCTSTYGAAGTTT GGGGTAGTCAAGAA 3'
<i>XPC</i>	rs535425175	5' ATGGTAGYCCCYCTCYTCAGAWGGTR 3'
		5'TCAAGRAKGCAYACCWTCTGARGAGRGGGRCTACCAT 3'
<i>XPC</i>	rs761106780	5' TCWARTGGGBRCTCAGCTCACAGCTK 3'
		5'CATTTGMGMAGCTGTGAGCTGAGYVCCCAITWGA 3'

O método DSASP e suas condições

a) As condições da PCR

A PCR foi realizada num volume final de 25uL contendo 200uM de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e o didesoxinucleotídeo de interesse (ddATP, ddCTP, ddTTP ou ddGTP), cloreto de magnésio 2,0 mM - MgCl₂, 20ng/mL de DNA, 200pM iniciadores (**Tabela 3**) e 0,5U AmpliTaq Gold (Life Technologies - Carlsbad, CA). As condições da PCR assimétrica foram as seguintes: uma pré-desnaturação durante 3 minutos a 94°C e 80 ciclos de 94°C durante 20 segundos de 50°C durante 45 segundos e 72°C durante 30 segundos com uma última extensão de 5 minutos a 72°C.

b) As condições de hibridação

O produto da amplificação por PCR de cada amostra foi submetida ao protocolo de hibridação sob as seguintes condições: 200pM da sequência complementar (**Tabela 3**), a 4 °C durante 10 minutos.

c) Análise da Curve Melting

A análise da curva de *melting* para determinação da T_m foi realizada no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies - Carlsbad, CA), seguindo, as condições: Pré-aquecimento a partir de 25°C a 95°C durante 1 minuto, dobrando até 45°C para 5 minutos, e um aquecimento gradual (1°C por minuto) até uma temperatura de 95° C

durante 5 minutos. Para análise da curva de *melting* foi utilizado mistura de SYBR Green 2X e Rox 1X (Life Technologies - Carlsbad, CA).

3.4 Análise estatística

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

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

4 RESULTADOS

Foram analisadas 100 amostras de pacientes do Estado da Paraíba com Carcinoma Basocelular para cada polimorfismo, totalizando 200 alelos para cada SNP estudado. Dos três polimorfismos estudados, apenas o rs535425175 do gene *XPC* mostrou ser associado ao desenvolvimento de CBC nas amostras analisadas, enquanto que os polimorfismos rs745769173 e rs761106780 dos genes *XPA* e *XPC* respectivamente estão no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (**Tabela 4**).

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

Polimorfismos	Genótipos (%)			Frequência alélica		X^2	p-valor
	AA	AG	GG	A	G		
<i>XPA</i> (rs745769173)	0	18	82	0,09	0,91	0,977	0,9
<i>XPC</i> (rs535425175)	6	14	80	0,13	0,87	14,51	0,005
<i>XPC</i> (rs761106780)	0	20	80	0,1	0,9	1,23	0,5

A frequência genotípica do polimorfismo rs745769173 do gene *XPA* foram as seguintes: 0% ($n=0$) de A/A (Ile/Ile), 18% ($n=18$) de A/G (Ile/Thr) e 82% ($n=82$) de G/G (Thr/Thr). Embora a frequência do alelo polimórfico G corresponder a 91% das amostras, as frequências genotípicas indicam que estão no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($X^2=0,977$ e $P<0,9$). A temperatura de *Melting* (T_m) observada do alelo G variou entre 66°C e 67°C, enquanto que o alelo A apresentou T_m de 80°C (**Figuras 8 e 9**).

O polimorfismo rs535425175 do gene *XPC*, segundo as análises estatísticas apresentou-se em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg*, ou seja, apresentou associação significativa com o risco de desenvolver CBC ($X^2=14,51$ e $P<0,005$). A frequência genotípica foi: 6% ($n=6$) de C/C (Lys/Lys), 14% ($n=14$) de A/C (Asn/Lys) e 80% ($n=80$) de A/A (Asn/Ans). A T_m observada do alelo A foi 70°C e 87°C para o alelo C (**Figuras 10, 11 e 12**).

Figura 8 - Genótipo G/G do SNP rs745769173 do gene *XPA* com T_m 66°C para o alelo G.

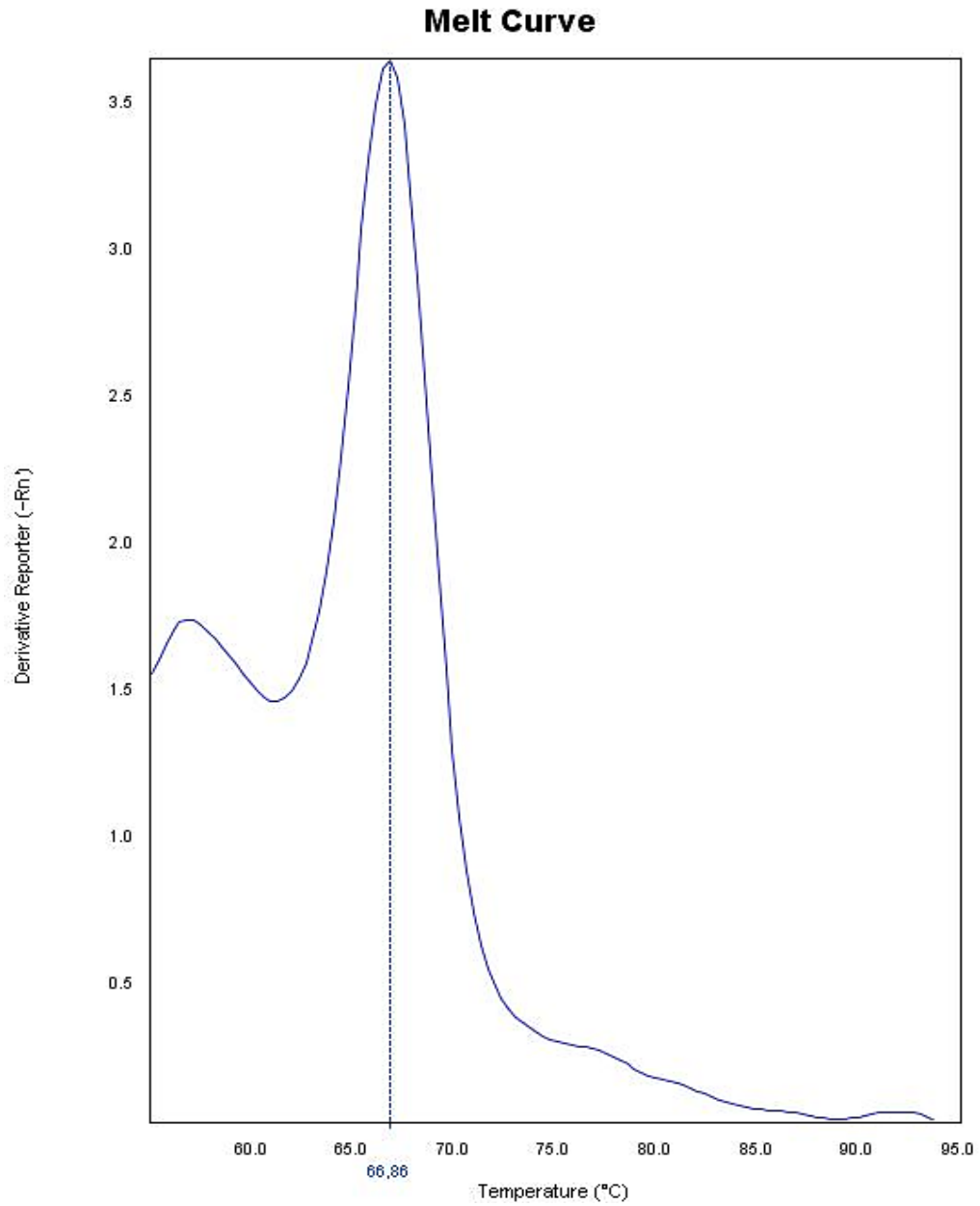


Figura 9 - Genótipo A/G do SNP rs745769173 do gene *XPA* com T_m 80°C para o alelo A

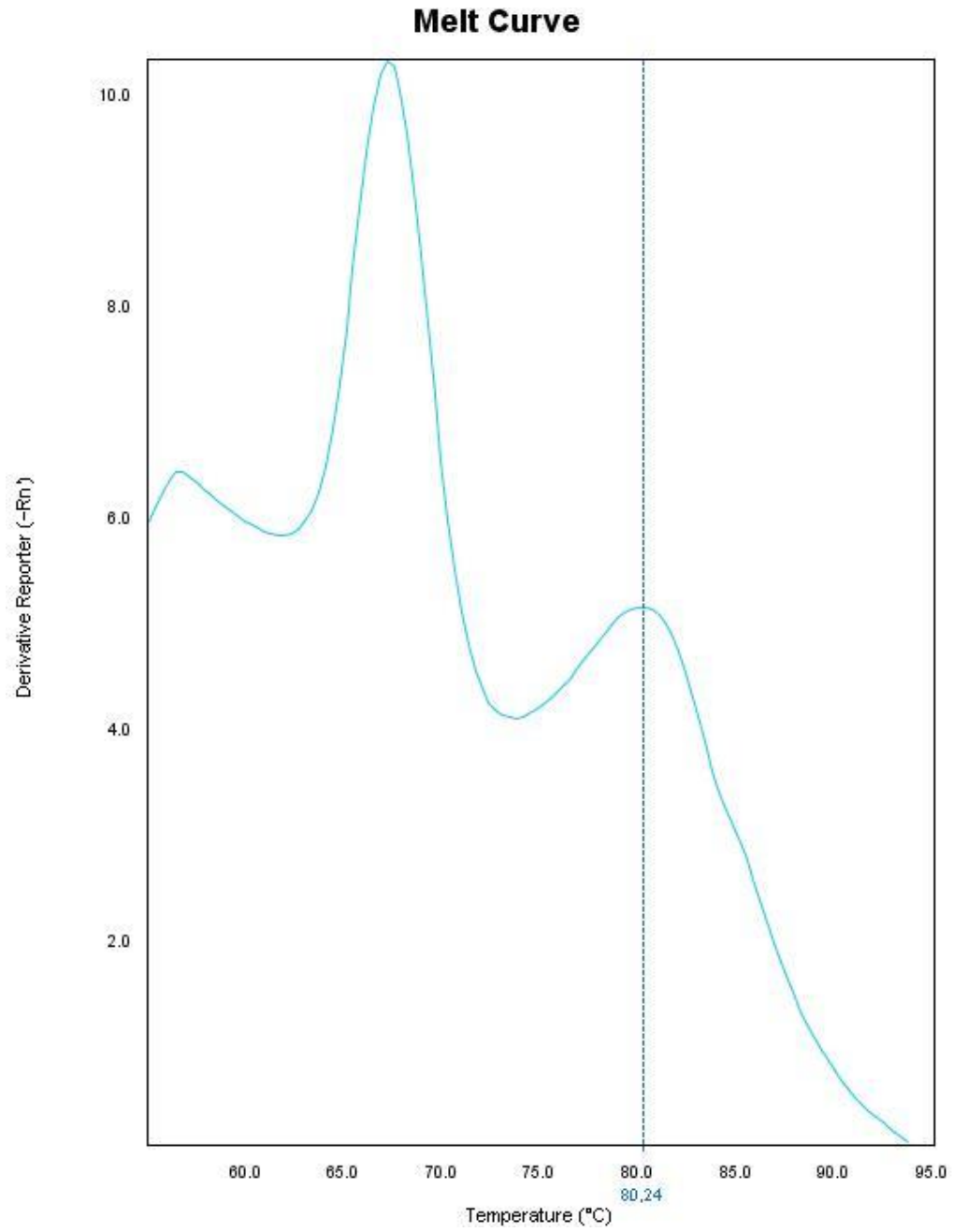


Figura 10 - Genótipo A/A do SNP rs535425175 do gene *XPC* com T_m 70°C para o alelo A.

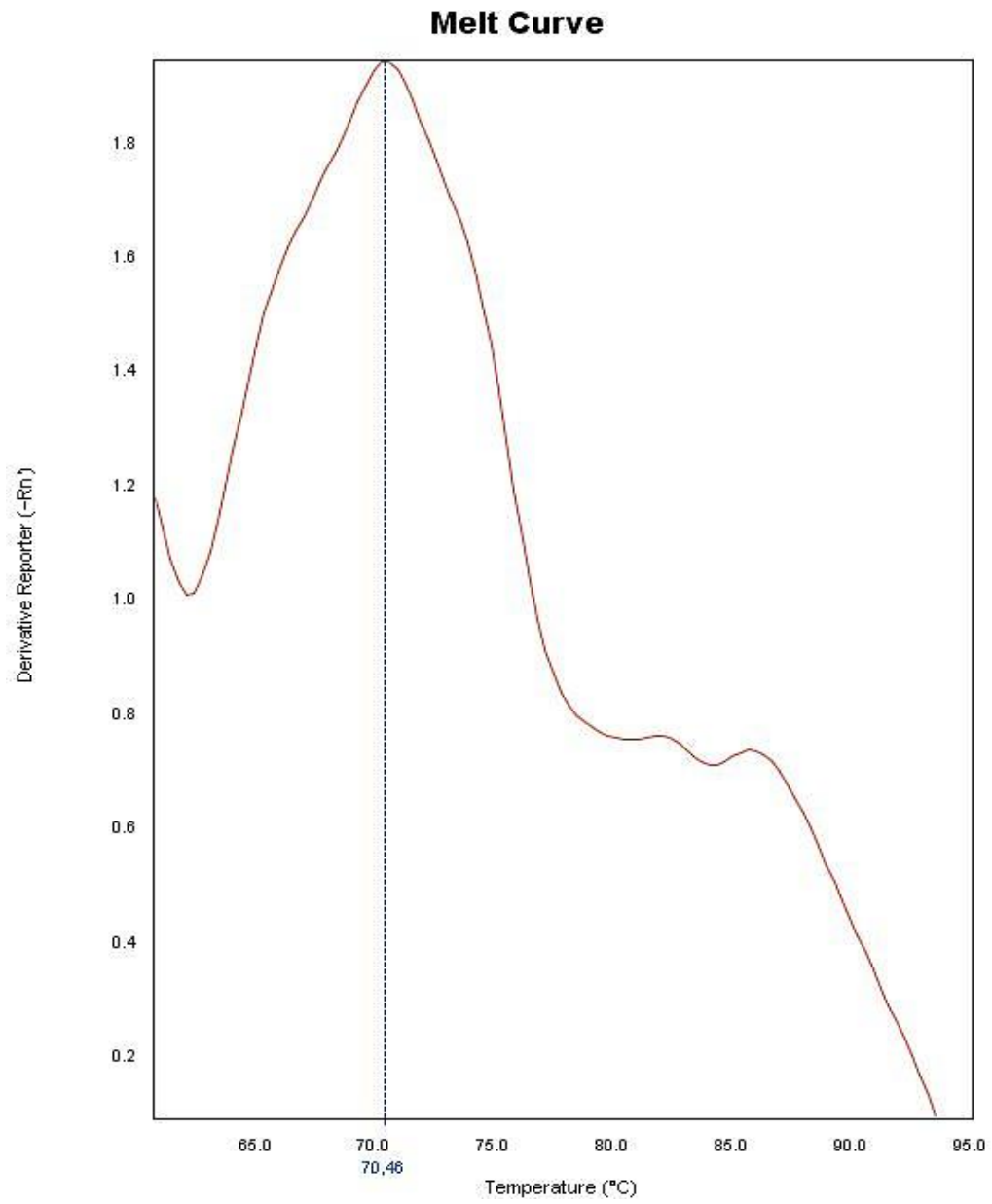


Figura 11 - Genótipo A/C do SNP rs535425175 do gene *XPC* com T_m 87°C para o alelo C.

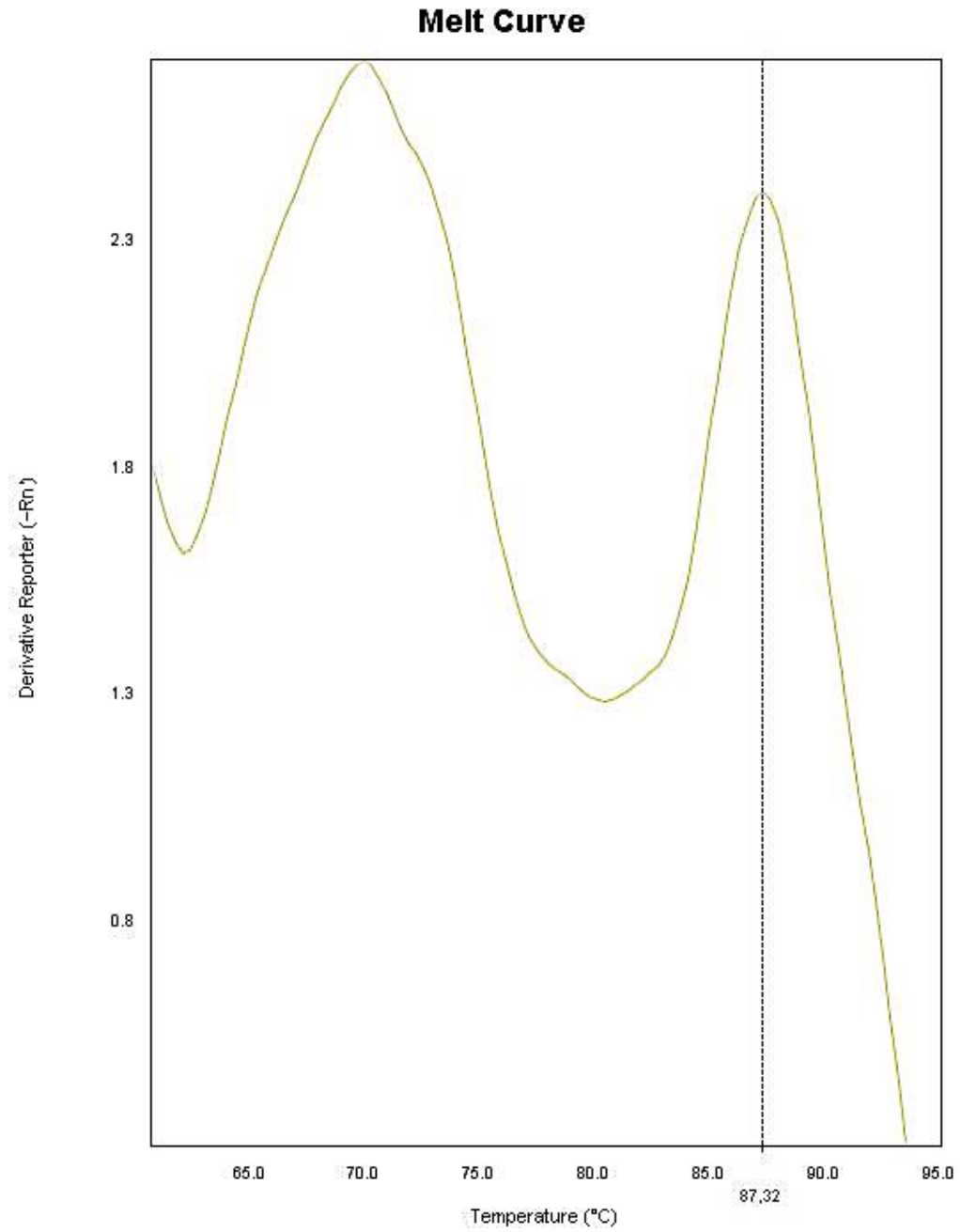
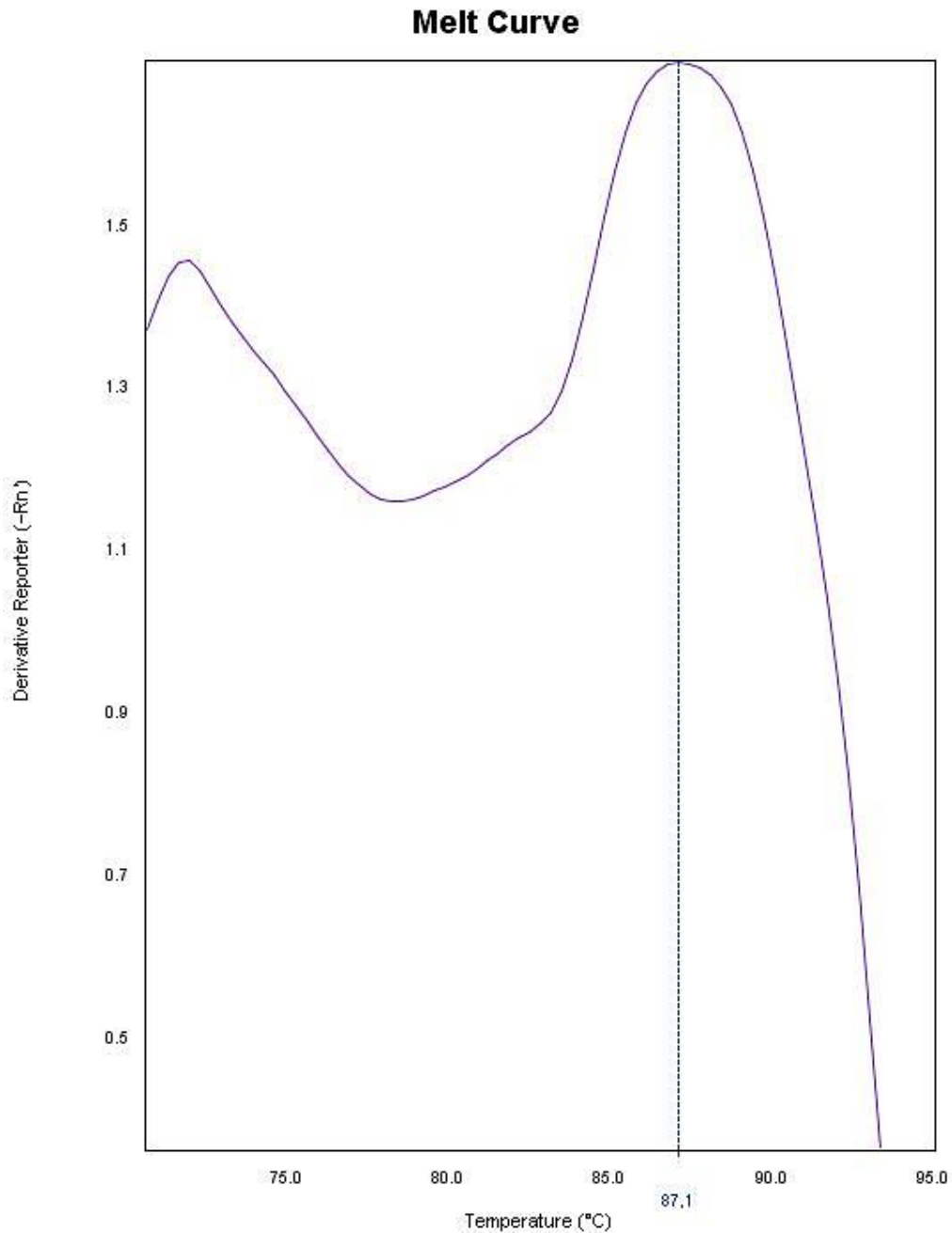


Figura 12 - Genótipo C/C do SNP rs535425175 do gene *XPC* com Tm 87°C para o alelo C.



Quanto à frequência genotípica do polimorfismo rs761106780 do gene *XPC*, obtivemos os seguintes resultados: 0% ($n=0$) de T/T (Glu/Glu), 20% ($n=20$) de T/G (Glu/Ala) e 80% ($n=80$) de G/G (Ala/Ala). As frequências genotípicas nas amostras analisadas indicam que está no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($X^2=1,23$ e $P<0,5$). A temperatura de *Melting* (T_m) observada do alelo G foi 74°C e 88°C para o alelo T (**Figuras 13 e 14**).

Figura 13 - Genótipo G/G do SNP rs761106780 do gene *XPC* com T_m 74°C para o alelo G.

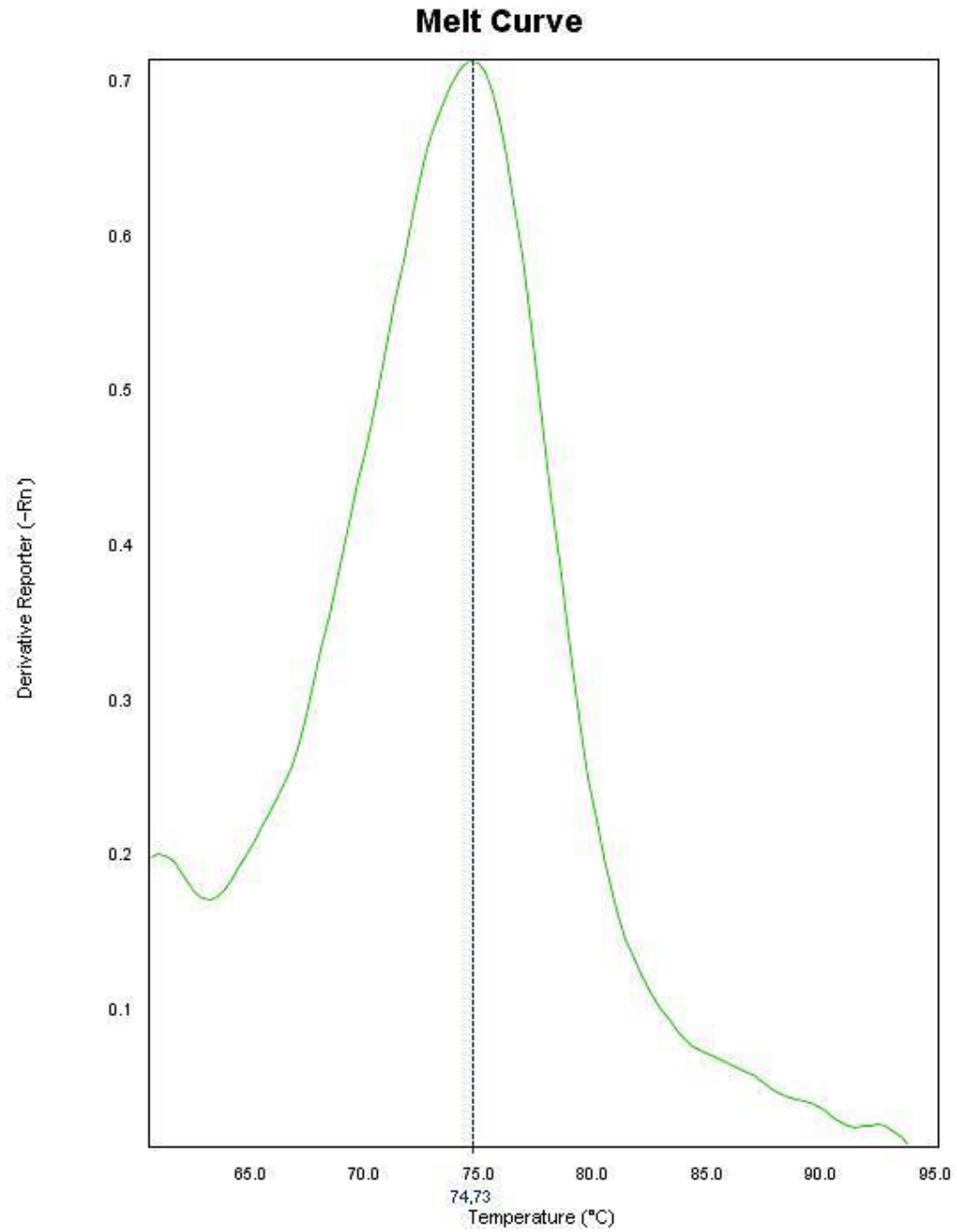
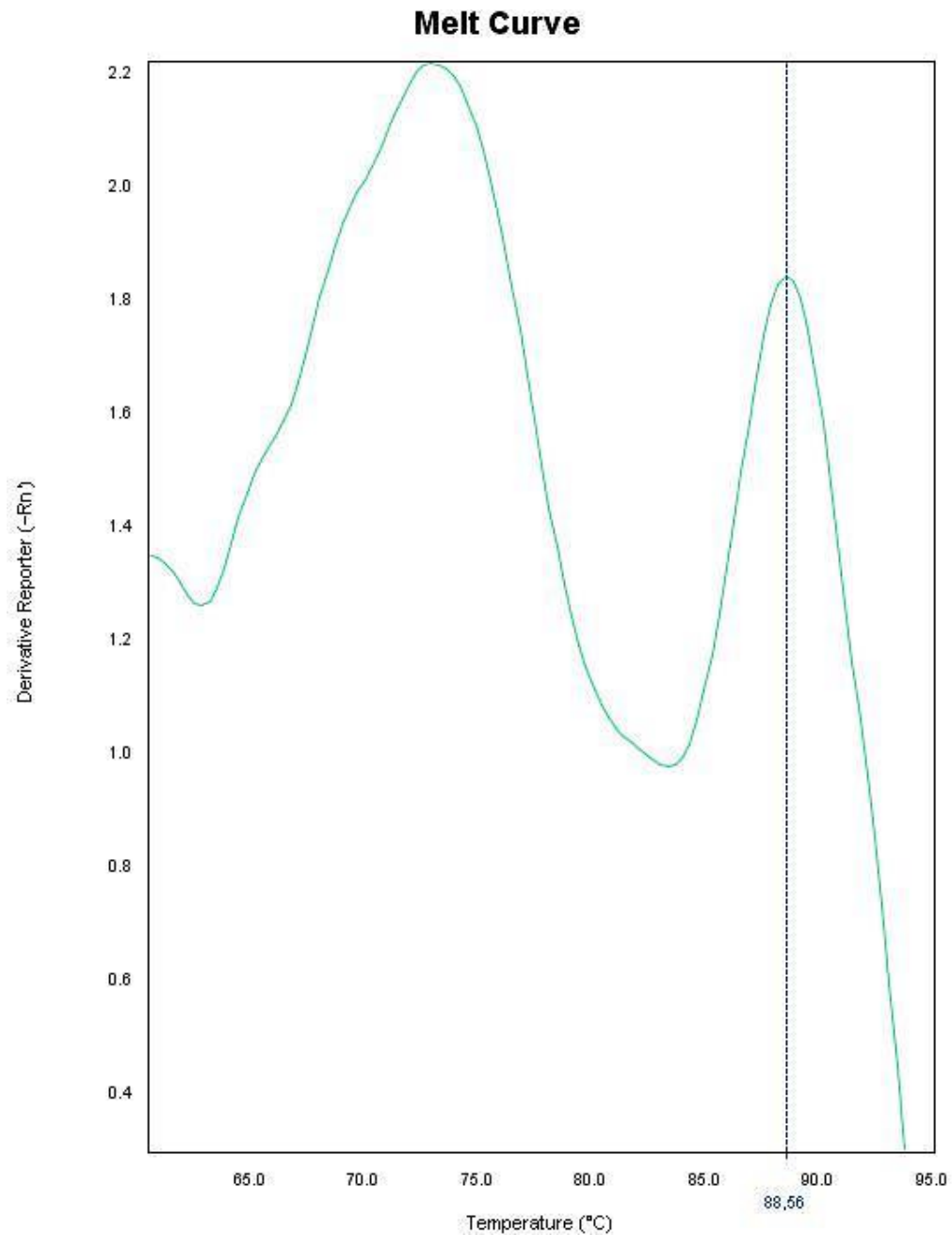


Figura 14 - Genótipo G/T do SNP rs761106780 do gene *XPC* com T_m 88°C para o alelo T.



Nossos resultados também sugerem que houve significância estatística entre os genótipos encontrados do rs535425175 do gene *XPC* e o gênero ($p=0,0384$), porém para as outras variáveis estudadas não houve significância: idade ($p=0,7281$), localização do tumor ($p=0,3792$) e tipo histológico ($p=0,6172$) (**Tabela 4**).

Tabela 5 – Características clinicohistopatológicas associadas com o genótipo do gene *XPC* do SNP rs535425175.

Variável	Gene <i>XPC</i> rs535425175				p valor
	Total	Genótipo CC	Genótipo AC	Genótipo AA	
<i>Gênero*</i>					
Feminino	51	6 (6%)	8 (8%)	37 (37,3%)	
Masculino	48	0 (0%)	6 (6%)	42 (42,4%)	0,0384
<i>Idade*</i>					
20 – 50	8	0 (0%)	2 (2%)	6 (6,1%)	
51 – 70	42	3 (3%)	7 (7,1%)	32 (32,6%)	
71 – 100	48	3 (3%)	5 (5,1%)	40 (40,8%)	0,7281
<i>Localização do tumor**</i>					
Cabeça	77	4 (3,8%)	12 (11,5%)	61 (58,6%)	
Pescoço	4	0 (0%)	0 (0%)	4 (3,8%)	
Tronco	11	1 (0,9%)	0 (0%)	10 (9,6%)	
Membros	6	1 (0,9%)	2 (1,9%)	3 (2,8%)	0,3792
<i>Tipo histológico</i>					
Superficial	11	0 (0%)	1 (1%)	10 (10,1%)	
Nodular (Ulcerado/Pigmentado)	83	5 (5%)	12 (12,1%)	66 (66,6%)	
Esclerodermiforme	4	1 (1%)	1 (1%)	2 (2%)	
Basoescamoso	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)	0,6172

* Apresenta amostra sem informação

**Apresenta amostras com mais de um tipo de tumor

5 DISCUSSÃO

Diversos polimorfismos de nucleotídeo único na literatura têm sido associados com a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer. Neste estudo foi analisada a associação de SNP nos genes *XPA* e *XPC*, responsáveis pelo reparo por excisão de nucleotídeos, com o aumento do risco de desenvolver Carcinoma Basocelular.

Os SNP investigados neste estudo (rs745769173 – *XPA*, rs535425175 – *XPC* e rs761106780 – *XPC*) ainda não foram citados na literatura e foram selecionados por estarem próximo ou em regiões de interação com outras proteínas. O *XPA* interage com diversas proteínas, tais como RPA, TFIIH, *XPC* e o complexo ERCC1-XPF (SCHARER, 2015; NISHI et al, 2005). E o *XPC* interage com TFIIH, hHR23A, hHR23B, CENTN2 e *XPA* (KAMIONKA; FEIGON, 2004; SUGASAWA, 2016; FRANCISCO; MENEZES; CHAMMAS, 2008).

Polimorfismos nas regiões de interação com outras proteínas nos genes de reparo podem contribuir para a ineficiência funcional e conseqüentemente predispor o indivíduo ao desenvolvimento de câncer.

Existem diversos estudos sobre o SNP rs1800975 (A23G) no gene *XPA* relacionados com o risco de desenvolver diversos tipos de câncer. Esse polimorfismo está localizado na região não traduzida 5' (UTR) e está a quatro nucleotídeos a montante do códon de iniciação. Polimorfismos nesta área proximal podem ter implicações para a ligação da subunidade ribossomal 40S e como resultado influenciar nos níveis de proteína na célula (MILLER et al, 2006).

Miller e colaboradores (2006) analisaram diversos SNP no gene *XPA*, uma na região de UTR (rs1800975) e haplótipos dentro de íntrons (rs3176633, rs3176689, rs2805835, rs3176719, rs1962592, rs3176751 e rs3176690) em pacientes com Carcinoma Basocelular e Carcinoma de Células Escamosas. Constataram que o alelo G do polimorfismo rs1800975 está associado a um risco aumentado de CBC e CCE e os sete haplótipos estava no equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Esse foi o primeiro estudo relacionando polimorfismos no gene *XPA* com a predisposição ao desenvolvimento de câncer de pele não melanoma.

Diferentemente de Miller e colaboradores, Ding et al (2009) realizaram uma meta-análise com o objetivo de analisar a associação do polimorfismo rs1800975 com o risco de

câncer. Verificaram que dos 36 casos-controles analisados, em geral não houve associação significativa entre o polimorfismo e a susceptibilidade de desenvolver câncer. Porém, na análise estratificada por tipo de câncer, observou-se que indivíduos com genótipos variantes apresentam maior risco de câncer de pulmão. Também verificaram que indivíduos que possuem o alelo A apresentam maior risco de câncer, exceto para o câncer de pele não melanoma, onde o alelo A foi considerado um fator de proteção. Ding et al (2009) concluíram, com base em outros estudos, que polimorfismos de reparo do DNA onde os alelos variantes são fatores de risco para certos tipos de câncer mas estão associados a um risco relativo abaixo do nulo para estudos de pele são resultados do papel de XPA em diferentes tipos de células ou tecidos. Outra explicação seria uma maior resposta apoptótica nos casos de câncer de pele devido a danos no DNA, levando a apoptose antes da divisão celular.

Outra meta-análise realizada por He, Deng, Luo (2015) para avaliar a associação entre o polimorfismo XPA A23G e o risco de câncer no sistema digestivo, incluindo câncer de esôfago, câncer gástrico, câncer colorretal e carcinoma hepatocelular revelou que não houve associação significativa entre esse polimorfismo e o câncer no sistema digestivo. Também não encontraram associação significativa quando verificado a análise de subgrupos por etnia, no caso, asiáticos e caucasianos em relação ao polimorfismo.

Embora o principal objetivo do mecanismo por reparo por excisão de nucleotídeo seja reparar danos causados pela UV, outros danos causados por carcinógenos podem ser alvo dessa via, caso ocorra alteração na estrutura do DNA. Dessa forma, outros tipos de câncer de origem epitelial também podem ter polimorfismos em *XPA* e *XPC* associados à susceptibilidade para o desenvolvimento de neoplasias.

Outros polimorfismos nos genes *XPA* e *XPC* têm sido associados com o risco de desenvolver câncer de pulmão. O genótipo C/T do polimorfismo rs2808668 (*XPA*) apresentou um aumento significativo de risco de câncer de pulmão ($X^2=9,846$ e $P=0,007$). Enquanto que o polimorfismo rs2733533 (*XPC*) foi associado com 1,48 vezes maior risco de desenvolver a neoplasia. Pacientes homens e com mais de 60 anos são mais suscetíveis a esse tipo de câncer (MEI et al, 2013).

Outro estudo realizado por Sakoda et al (2012) envolvendo 744 casos de paciente com diagnóstico de câncer de pulmão e 1477 controles, analisou 79 SNP em diversos genes responsáveis pelo reparo, dentre eles o *XPA* e o *XPC*. Sakoda e colaboradores verificaram que

o polimorfismo rs3176658 do gene *XPA* foi um dos quatro polimorfismos que apresentaram associação significativa com o diagnóstico.

Nossos resultados sugerem que o polimorfismo rs745769173 (*XPA*) está no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($X^2=0,977$ e $P<0,9$) nas amostras analisadas. Embora o alelo polimórfico G seja mais frequente nas amostras estudadas e esse alelo condicione a mudança de um aminoácido hidrofóbico isoleucina para um aminoácido hidrofílico treonina, este último não exerce influência no desenvolvimento da neoplasia. Provavelmente essa troca de aminoácido não desestabiliza o núcleo hidrofóbico formado por outros aminoácidos próximos, conseqüentemente não afeta a interação com a proteína RPA nessa região. Isso pode justificar a diferença de resultados quando comparado com o estudo realizado por Miller et al (2006), que investigou a associação do SNP rs1800975 (*XPA*) com o câncer de pele não melanoma.

Foram encontradas associações significativas entre o polimorfismo rs2228001 (*XPC*) e o risco de câncer de pulmão na população asiática. Jin et al (2014) na meta-análise realizado com base em 14 estudos, verificaram que o genótipo homozigótico Lys939Gln foi associado com o risco de desenvolver o câncer de pulmão. Enquanto que o polimorfismo rs2228000 não foi associado com o risco dessa patogênese.

Em câncer de mama, um trabalho realizado com 450 pacientes e 430 controles, investigou a associação de 11 SNP localizados em seis diferentes genes da via de reparo por excisão de nucleotídeo com a predisposição para o câncer de mama. Quatro polimorfismos apresentaram associação significativa com a neoplasia, dentre eles o rs1800975 (*XPA*) e o rs2228000 (*XPC*) (HE et al, 2016).

O rs2228000 (Ala499Val) e o rs2228001 (Lys939Gln) são os polimorfismos mais relatados na literatura para o gene *XPC* e diversos estudos têm investigado a associação desses polimorfismos com o desenvolvimento de câncer. Uma meta-análise realizada por Hua et al (2016), envolvendo 1141 casos de pacientes com câncer colorretal e 1173 controles investigaram a associação desses dois polimorfismos com o risco de desenvolver o câncer colorretal. Em geral, os resultados revelaram que nenhuma associação foi observada entre rs2228000 ($P=0,300$), rs2228001 ($P=0,095$) e o risco de câncer colorretal. Mas nas análises estratificadas por idade, gênero e tabagismo; descobriram que o polimorfismo Lys939Gln foi significativamente associado a um risco aumentado desse tipo de câncer em indivíduos com 57 anos ou menos (HUA et al, 2016).

Hua e colaboradores também estudaram a população do Sul da China, procurando a associação dos polimorfismos rs2228000, rs2228001, rs2607775 e rs1870134 do gene *XPC* com o câncer gástrico e os resultados indicaram que as variações genéticas nesse gene podem ter um fraco efeito sobre a susceptibilidade nesse tipo de câncer na população do sul da China; o que justifica a confirmação em estudos prospectivos maiores com diferentes populações étnicas (HUA et al, 2016).

Em Carcinoma de Células Escamosas da Cabeça e Pescoço (CCECP), um tipo de câncer de pele não melanoma, Farnebo et al (2015) procurou investigar os SNP como potenciais fatores de risco e indicadores de sobrevida entre pacientes caucasianos. Quatro polimorfismos de quatro genes do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeo foram estudados em 169 pacientes e 344 controles. Os resultados sugerem que todos os SNP podem afetar o risco e a sobrevivência de CCECP e que o rs222800 (*XPC*) está associado a um risco aumentado de CCECP e de Carcinoma de Laringe. As análises estatísticas também revelaram um risco aumentado de duas vezes nos pacientes com diagnóstico de CCECP na presença do alelo T no grupo total, assim como para homens homocigóticos $P=0,02$ e um risco aumentado de três vezes mais em Carcinoma de Laringe. Os autores acreditam que o risco aumentado dessas neoplasias também está relacionado com o local que é continuamente exposto a fatores exógenos e endógenos que causam danos no DNA.

Não foram encontrados estudos de associação de SNP do gene *XPC* com a susceptibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma Basocelular. Mas existem alguns estudos de associação de polimorfismos com o risco de desenvolver Melanoma. Jiang e colaboradores (2015), Zhou et al (2014) realizaram meta-análises sobre a associação do polimorfismo Lys939Gln na patogênese do Melanoma em caucasianos, porém os resultados sugerem que não houve evidência de um papel importante desse polimorfismo.

Não encontramos associação entre o polimorfismo rs761106780 (*XPC*) com o diagnóstico de CBC. Segundo as análises, os genótipos para os alelos T e G estão no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($X^2=1,23$ e $P<0,5$). Esse polimorfismo está a um nucleotídeo a montante do rs2228001, um dos polimorfismos mais estudados do gene *XPC* e relacionado com a associação entre neoplasias. Além disso, o polimorfismo em nosso estudo encontra-se na região interação com a proteína CENT2, que estimula o reparo através da interação com *XPC* (THOMPSON et al, 2006). Sugerimos com isso, que o rs761106780 não segrega junto com o rs2228001, ou seja, não são haplótipos e a mudança de aminoácido ocasionada pela

troca de uma citosina pela adenina neste polimorfismo não interfere na interação do XPC com o CENT2.

Quanto ao SNP rs535425175 (XPC), nossos resultados sugerem que houve associação significativa ($X^2=14,51$ e $P<0,005$) entre esse polimorfismo e a susceptibilidade ao desenvolvimento de Carcinoma Basocelular. As análises revelaram que o genótipo homocigoto CC confere um risco aumentado de desenvolver CBC. O rs535425175 é um SNP próximo do códon a jusante do sítio de interação com o TFIIH, um fator de transcrição que possui uma subunidade com atividade helicase. Esta é recrutada pelo XPC necessária a atividade de reparo.

Dessa forma, os resultados apresentados nesse trabalho corroboram com alguns estudos anteriores, que alguns polimorfismos em regiões de interação com outras estruturas (proteicas ou ribossomais) nos genes *XPA* e *XPC* podem contribuir para o desenvolvimento de câncer de pele não melanoma, como os resultados apresentados por Miller et al (2006) e He et al (2016). Também foi observado que em geral, os polimorfismos mais estudados na literatura nesses genes não apresentam associação com o risco de desenvolver neoplasias, exceto quando se refere ao câncer de pele não melanoma e o câncer de pulmão como observado por Ding et al (2009) e Jing et al (2014). Provavelmente isso acontece porque esses tecidos são mais expostos a agentes exógenos e endógenos que lesionam o DNA, alterando a estrutura do DNA como dito por Farnebo et al (2015). Essa forma de lesionar o DNA, através da adição de adutos devido à exposição de compostos por meio do tabagismo e formação de dímeros de pirimidina provocada pela UV são os alvos do mecanismo por reparo por excisão de nucleotídeos.

Os polimorfismos relatados na literatura sobre os genes *XPA* e *XPC* são poucos, necessitando realizar mais estudos e em diferentes etnias, a fim de verificar a influência do polimorfismo em diversas populações. A maioria dos SNP estudados nesses genes localiza-se em regiões de interação com outras proteínas. O rs1800975 (*XPA*), por exemplo, localiza-se no domínio de interação com a subunidade menor do ribossomo. Enquanto que o rs222800 (*XPC*) localiza-se no domínio de interação com o RAD23B e o rs2228001 (*XPC*) está no domínio de interação com o TFIIH e o CENT2 (JIN et al, 2014; NISHI et al, 2005).

Quanto às variáveis clínicas histopatológicas, nossos resultados corroboram com os dados do Inca (2015), no qual as mulheres são mais afetadas pelo CBC do que os homens. Também, segundo Chinem; Miot (2011), o CBC é prevalente na população com mais de 50

anos, os tumores são mais encontrados na cabeça e do tipo Ulcerado pigmentado, conforme observado em nosso estudo.

6 CONCLUSÕES

- 1 – Os resultados sugerem que há associação significativa entre o polimorfismo rs535425175 do gene *XPC* com o desenvolvimento de Carcinoma Basocelular nas amostras analisadas.
- 2 – Os resultados sugerem que não houve associação entre os SNP rs745769173 do gene *XPA* e rs761106780 do gene *XPC* com a susceptibilidade ao desenvolvimento de CBC.
- 3 – Nossos resultados também sugerem que houve significância estatística entre os genótipos encontrados do rs535425175 do gene *XPC* com o gênero do indivíduo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, Bruce. (et al). **Biologia Molecular da Célula**. – 5ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396p.

ALEKSEEV, S.; COIN, F. Orchestral maneuvers at the damaged sites in nucleotide excision Repair. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 72:2177–2186, February 2015.

ALMEIDA, A. C. C. et al. Frequência do carcinoma basocelular na população menor de 50 anos: estudo do serviço e revisão da literatura. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, 84(6):692-4, Outubro 2009.

ASO COL DERMA. Disponível em:

http://www.cancerdepielcolombia.org/dt_portfolios/carcinoma-basocelular-> Acessado em: 24 de Nov. de 2016.

BAYLE, S. B. ; HOPPENER, J. W. M. BUSTROS, A. et al. DNA Methylation Patterns of the Calcitonin Gene in Human Lung Cancers and Lymphomas. **American Association for Cancer Research**, 46, 2917-2922, June 1986.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene** 234 (1999) 177–186, May 1999.

BUDDEN, T.; BOWDEN, N. A. The Role of Altered Nucleotide Excision Repair and UVB-Induced DNA Damage in Melanomagenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, 14, 1132-1151; ISSN 1422-0067, 2013.

CHARBONNIER, J. B. et al. Structural, Thermodynamic, and Cellular Characterization of Human Centrin 2 Interaction with Xeroderma Pigmentosum Group C Protein. **J. Mol. Biol.** 373, 1032–1046, 2007.

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

DECORDIER, I.; LOOCK, K. V.; KIRSCH-VOLDERS, M. Phenotyping for DNA repair capacity. **Mutation Research** 705 (2010) 107–129, 2010.

DING, D. et al. Genetic variation of XPA gene and risk of cancer: a systematic review and pooled analysis. **International Journal of Cancer**, 131, 488–496, 2012.

DOHERTY, J. A. et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and endometrial cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 20(9): 1873–1882, September 2011.

DOURMISHEV, L. A; RUSINOVA, D.; BOTEV, I. **Clinical variants, stages, and management of basal cell carcinoma.** Indian Dermatology Online Journal - Vol. 4 - Issue 1, 2013.

ENSEMBL. Disponível em:

<http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Sequence?db=core;r=3:14145451-14146451;v=rs761106780;vdb=variation;vf=126627993> Acessado em: 23 Nov. de 2016.

FARNEBO, L. et al. DNA repair genes XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 are associated with risk and survival of squamous cell carcinoma of the head and neck. **DNA Repair**, 31 (2015) 64–72, 2015.

FRANCISCO, G.; MENEZES, P. R.; CHAMMAS, R. XPC polymorphisms play a role in tissue-specific carcinogenesis: a meta-analysis. **European Journal of Human Genetics** (2008) 16, 724–734, 2008.

FENG, J. et al. XPA A23G polymorphism is associated with the elevated response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. **Acta Biochim Biophys Sin** 41:429–35, 2009.

HE, B. S. et al. Nucleotide excision repair pathway gene polymorphisms are linked to breast cancer risk in a Chinese population. **Oncotarget**, Advance Publications, 2016.

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

HE, J. et al. Associations of Lys939Gln and Ala499Val polymorphisms of the XPC gene with cancer susceptibility: A meta-analysis. **International Journal of Cancer**, 133, 1765–1775, 2013.

HE, L.; DENG, T.; LUO, HESHENG. XPA A23G polymorphism and risk of digestive system cancers: a meta-analysis. **Onco Targets and Therapy**, 8 385–394, 2015.

HUA, R. X. et al. Association of XPC Gene Polymorphisms with Colorectal Cancer Risk in a Southern Chinese Population: A Case-Control Study and Meta-Analysis. **Genes**, 7, 73, 2016.

IKEGAMI, T.; et al. Solution structure of the DNA- and RPA-binding domain of the human repair factor XPA. **Nature Structural Biology**, volume 5, number 8, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / **Instituto Nacional de Câncer**. – Rio de Janeiro: Inca, 2011. 128 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / **Instituto Nacional de Câncer**. – Rio de Janeiro: Inca, 2015.

KAMIONKA M., FEIGON J. Structure of the XPC binding domain of hHR23A reveals hydrophobic patches for protein interaction. **Protein Sci**;13(9):2370-7, 2004.

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

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

KRAEMER, K. H.; DIGIOVANNA, J. J. Global contributions to the understanding of DNA repair and skin cancer. **Milestones/Cutaneous Biology**, September 2014.

KONDO, S., et al. Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. **Nature** 348: 73-76, 1990.

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

LEHMANN, A. R.; MCGIBBON, D.; STEFANINI M. Xeroderma pigmentosum. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, 6:70, 2011.

LIMA, ELEONIDAS MOURA; LOPES, OTÁVIO SÉRGIO; SOARES, LEONARDO FERREIRA; ARRUDA, TALITTA DANTAS; GIGEK, CAROLINA OLIVEIRA; MELO, CYNTHIA GERMOGLIO FARIAS et al. Dideoxy single allele-specific PCR - DSASP new method to discrimination allelic. **Braz. arch. biol. Technol.** 58(3):414-420, 2015.

JIANG, W. et al. A meta-analysis of XPC Lys939Gln polymorphism and Melanoma susceptibility. **JEADV**, 30, 1327–1331, 2015.

JIN, B. et al. Association of XPC Polymorphisms and Lung Cancer Risk: A Meta-Analysis. **Plos One**, Vol. 9, Issue 4, e93937, 2014.

MEI, C. et al. Polymorphisms in DNA repair genes of XRCC1, XPA, XPC, XPD and associations with lung cancer risk in Chinese people. **Thoracic Cancer**, ISSN 1759-7706, 2013.

MENCK, C. F. M.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: what do they tell us about cancer and aging? **Genetics and Molecular Biology**, 37, 1 (suppl), 220-233, 2014.

MILLER, K. L. XPA, haplotypes, and risk of Basal and Squamous Cell Carcinoma. **Carcinogenesis**; vol.27 n.8 p.1670–1675, 2006.

MIYAMOTO, I., MIURA, N., NIWA, H., MIYAZAKI, J., TANAKA, K. Mutational analysis of the structure and function of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein: identification of essential domains for nuclear localization and DNA excision repair. **J. Biol. Chem.** 267: 12182-12187, 1992.

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

NISHI, R. et al. Centrin 2 Stimulates Nucleotide Excision Repair by Interacting with Xeroderma Pigmentosum Group C Protein. **Molecular and Cellular Biology**, p. 5664–5674, 2005.

OKUDA, M. et al. Structural Insight into the Mechanism of TFIIH Recognition by the Acidic String of the Nucleotide Excision Repair Factor XPC. **Structure** 23, 1827–1837, 2015.

OTSUKA, A. et al. Hedgehog signaling in Basal Cell Carcinoma. Japanese Society for **Investigative Dermatology**, 78 (2015) 95–100, 2015.

PENG, Q. et al. XPC Lys939Gln polymorphism contributes to colorectal cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. **Diagnostic Pathology**, 9:120, 2014.

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

RUCZINSKI, I. et al. A population-based study of DNA repair gene variants in relation to non-melanoma skin cancer as a marker of a cancer-prone phenotype. **Carcinogenesis**, vol.33 n.9 p.1692–1698, 10.1093, 2012.

SAKODA, L. C. et al. Germ line variation in nucleotide excision repair genes and lung cancer risk in smokers. **Int J Mol Epidemiol Genet**, 3(1):1-17, 2012.

SANTIAGO, K. M. et al. Xeroderma Pigmentosum: Low Prevalence of Germline *XPA* Mutations in a Brazilian XP Population. **International Journal of Molecular Sciences**, 16, 8988-8996, ISSN 1422-0067, April 2015.

SCHARER, O. D. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. Cold Spring Harbor **Perspectives in Biology**, 2013.

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

SUGASAWA, K. Molecular mechanisms of DNA damage recognition for mammalian nucleotide excision repair. **DNA Repair**, 2016.

TANAKA K, et al. Analysis of human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. **Nature** 348:73-76, 1990.

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

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

WHELESS, L. et al. A Community-Based Study of Nucleotide Excision Repair Polymorphisms in Relation to the Risk of Non-Melanoma Skin Cancer. **Journal of Investigative Dermatology**, Vol. 132, 1354–1362, 2012.

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

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

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

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

ANEXOS

Tumor Biology



**Association of single-nucleotide polymorphisms of gene XPC
with susceptibility to basocellular carcinoma in samples
from the Northeast region of Brazil.**

Journal:	Tumor Biology
Manuscript ID	TUB-17-0145
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	30-Jan-2017
Complete List of Authors:	Mala , Mayara; Universidade Federal da Paraíba, Biologia Molecular Calixto , Poliane; Universidade Federal da Paraíba, Biologia Molecular Lopes, Otávio; Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; São Paulo – SP – Brasil Carvalho Filho , Ivan; Laboratório de Análises Médicas - UNILAB, João Pessoa - PB – Brasil, Departamento de Patologia Takeda Herrero , Sylvia; Universidade Federal da Paraíba, Biologia Molecular Melo, Cynthia; Universidade Federal da Paraíba, Farmácia Soares, Leonardo; Universidade Estadual da Paraíba, Farmácia Medeiros , Arnaldo; Universidade Federal da Paraíba, Medicina Delatorre , Milio; Universidade Federal da Paraíba, Biologia Molecular Calcagno, Danielle ; Universidade Federal do Para Burbano, Rommel; Universidade Federal do Para Lima, Eleonidas; Universidade Federal da Paraíba, Biologia Molecular
Keywords:	Basal cell carcinoma, Nucleotide excision repair, Single nucleotide polymorphism, DSASP, Genotyping
Abstract:	Basal Cell Carcinoma (BCC) is the common neoplasm in humans and its main etiological factor is exposure to solar radiation. Mutations in repair genes can lead to tumor progression and loss of cell integrity leading to the onset of cancer. Nucleotide excision repair (NER) is an important mechanism primarily used to repair injuries caused by UV. The objective of this study was to evaluate single-nucleotide polymorphisms rs745769173, rs761106780 and rs535425175 and risk of developing BCC. The present study analyzed 100 samples of paraffin-embedded tissue from patients with histopathological diagnosis of BCC. The results were obtained by genotyping method, Dideoxy Unique Allele Specific – PCR (DSASP). The statistical analysis and application of Chi-square and Fisher's exact test. The SNP rs535425175 of the XPC gene showed a significant association with the BCC in the analyzed samples ($P < 0.005$). The results suggest that the SNP rs535425175 of the XPC gene may be considered a risk factor associated with the development of BCC.

ANEXO B: Artigo**Title:**

Association of single-nucleotide polymorphisms of gene XPC with susceptibility to basocellular carcinoma in samples from the Northeast region of Brazil.

Short Title: Association of SNP of gene XPC in BCC in the Brazilian population.

Abstract

Basal Cell Carcinoma (BCC) is the common neoplasm in humans and its main etiological factor is exposure to solar radiation. Mutations in repair genes can lead to tumor progression and loss of cell integrity leading to the onset of cancer. Nucleotide excision repair (NER) is an important mechanism primarily used to repair injuries caused by UV. The objective of this study was to evaluate single-nucleotide polymorphisms rs745769173, rs761106780 and rs535425175 and risk of developing BCC. The present study analyzed 100 samples of paraffin-embedded tissue from patients with histopathological diagnosis of BCC. The results were obtained by genotyping method, Dideoxy Unique Allele Specific – PCR (DSASP). The statistical analysis and application of Chi-square and Fisher's exact test. The SNP rs535425175 of the XPC gene showed a significant association with the BCC in the analyzed samples ($P < 0.005$). The results suggest that the SNP rs535425175 of the XPC gene may be considered a risk factor associated with the development of BCC.

Key words: Basal cell carcinoma, Nucleotide excision repair, Single nucleotide polymorphism, DSASP, Genotyping.

Introduction

Basal Cell Carcinoma (BCC) is the most common neoplasia in the world and originates from pluripotent basal cells that have lost their differentiation capacity [1,2]. The main etiological factor is exposure to UVB rays that damage DNA [3], which can lead to

mutations in important genes regulating cellular functions [4]. Other factors and personal genetic predispositions may also be associated with the development of BCC [5].

The cell has several pathways of repair mechanisms involving more than 130 genes that correct DNA damage, contributing to the integrity and maintenance of genomic stability. However, mutations in repair genes can lead to tumor progression and loss of cell integrity leading to the onset of cancer [6].

Nucleotide excision repair (NER) is an important mechanism for repairing UV-induced lesions and removing adducts that prevent replication and DNA transcription. The NER pathway is composed of 28 genes, eight of which are from the XP family. Defects in some of these genes may lead to the development of several syndromes, among them Xeroderma Pigmentosum (XP), which is associated with the deficiency of DNA repair caused by UV radiation lesions [6,7].

The XPA gene is located in the chromosomal region 9q22.33 [8]. It is involved in both global and transcriptional genome repair pathways [9]. XPA detects the presence of DNA damage, recruits NER factors, stabilizes repair intermediates, positions repair machinery in DNA and interacts with various proteins, such as TFIIH and ERCC1-XPF, RPA, hHRD23B, DDB, PCNA [10,11].

The XPC gene is located in the chromosomal region 3p25.1 [12]. XPC recognizes and binds to damaged DNA, interacts with hHR23 to protect itself from proteolytic degradation, interacts with CENTN2 to increase its binding affinity for DNA. It recruits the TFIIH, which acts as a helicase and together with the RPA constitutes the pre-incision complex, opening the double helix [12-14].

Several studies have investigated the influence of many SNPs on the XPA and XPC genes in the risk of developing CBC [15-18]. Thus, this study aimed to analyze

polymorphisms (SNPs) of XPA (rs745769173) and XPC (rs535425175 and rs761106780) located regions of interaction with several proteins in samples of paraffin tissue from patients in northeastern Brazil.

Material and Methods

Samples

The present study analyzed 100 samples of paraffin-embedded tissue from patients with histopathological diagnosis of BCC, totaling 200 alleles for each SNP studied. It is a retrospective study and samples has more than five years old and were provided by the bank of data by the Laboratory UNILAB/João Pessoa – PB. The present study is part of the thematic project approved by the Ethics Committee of the University Hospital Lauro Wanderley - UFPB under the code CAAE: 36522614.2.3001.5883.

DNA extraction

The samples were submitted to DNA extraction, Structural Molecular Biology Laboratory and Oncogenetics - LBMEO/ UFPB. The DNA sample was extracted according to the method described by Shang Rong-Shi et al [11] with modifications. Genomic DNA isolated by stored at -20°C.

Method Dideoxy single allele-specific PCR-DSASP

The polymorphisms was performed by the method of genotyping Dideoxy Single Allele Specific PCR - DSASP developed by Lima et al. [20]. To detect the *SNPs* rs745769173 (XPA gene), rs761106780 and rs535425175 (XPC gene) DSASP method involving specific primer with specific characteristics, and sequence complementary to the hybridization step. These sequences were obtained by *in silico* validation (Software GeneRunner).

Validation *in silico*

The primers used for DSASP of the *SNPs* rs745769173 (*XPA* gene), rs761106780 and rs535425175 (*XPC* gene) were designed based on the database Ensembl Genome Browser and using the Gene Runner program (Table 1.) to evaluate the annealing temperature, the formation of secondary structure and size of the amplified fragments.

Table 1. Primer and complementary sequence for genotyping the SNP rs745769173 of the *XPA* gene and the SNPs rs535425175 and rs761106780 of the *XPC* gene.

Gene	SNPs	Primers/ Complementary sequence
<i>XPA</i>	rs745769173	5' TTCTTGACTACCCCAAACCTTCRASAG 3' 5'YGGATTTTGTGTTGTAGAYTRTGAAGAGGKCTSTYGAAGTTTGGGGT AGTCAAGAA 3'
<i>XPC</i>	rs535425175	5' ATGGTAGYCCCYCTCYTCAGAWGGTR 3' 5'TCAAGRAKGCAAYACCWTCTGARGAGRGGGRCTACCAT 3' 5' TCWARTGGGBRCTCAGCTCACAGCTK 3'
<i>XPC</i>	rs761106780	5'CATTTGMGMAGCTGTGAGCTGAGYVCCCAITWGA 3'

PCR Conditions

PCR was performed in a final volume of 25 μ L containing 200 μ M dNTP (dATP, dCTP, dTTP and ddGTP), 2.0 mM $MgCl_2$, 20 ng/ μ L DNA, 200 pM primer and 0.5 U AmpliTaq Gold (Life Technologies - Carlsbad, CA). PCR conditions for amplification of single stranded DNA were as follows: a pre-denaturation for 3 min at 94°C and 80 cycles of 94°C for 20 s of 50°C for 45 s and 72°C for 30 s with a final extension of 5 min at 72°C.

Hybridization conditions

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

Melting Curve Analysis

The melting curve were analysed to determine the T_m performed by Real Time PCR equipment 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies - Carlsbad, CA) following the conditions: preheat starting at 25°C to 95°C for 1 min, folding up to 45°C for 5 min and gradual heating (1°C/min) until a temperature of 95°C for 5 min. For melting curve analysis, SYBR[®] Green Mix (Life Technologies - Carlsbad, CA) was used.

Statistical Analysis

Analyzes of Hardy-Weinberg and Chi-square test were carried out using the statistical program BioEstat 5.3. O $P < 0,05$ considered significant.

Results

The SNPs rs745769173 of the XPA gene and the rs761106780 of the XPC gene were not associated with Basal Cell Carcinoma. Only rs535425175 of the XPC gene was shown to be associated with the development of BCC in the analyzed samples ($P < 0.005$) (Table 2.). The genotype frequency of rs535425175 was 6% ($n = 6$) C / C (Lys / Lys), 14% ($n = 14$) A / C (Asn / Lys) and 80% (Asn / Ans). The observed T_m was 70 °C for allele A and 87 °C for allele C (Figures 1 and 2).

Table 2. Genotypic distribution and allelic frequency of SNPs in the genes studied.

SNP	Genotypes (%)			Allele frequency		χ^2	p-value
<i>XPA</i> (rs745769173)	AA	AG	GG	A	G	0,977	0,9
	0	18	82	0,09	0,91		
<i>XPC</i> (rs535425175)	CC	AC	AA	C	A	14,51	0,005
	6	14	80	0,13	0,87		
<i>XPC</i> (rs761106780)	TT	TG	GG	T	G	1,23	0,5
	0	20	80	0,1	0,9		

Our results also suggest that there was a statistical significance between the genotypes of the XPC gene rs535425175 and the gender ($p = 0.0384$), but for the other variables studied there was no significance: age ($p = 0.7281$), tumor location ($p = 0.3792$) and histological type ($p = 0.6172$) (Table 3.).

Table 3. Clinicohistopatological characteristics associated with the genotype.

Variable	Gene XPC rs535425175			p valor	
	Total	Genotype CC	Genotype AC		Genotype AA
Genre*					
Female	51	6 (6%)	8 (8%)	37 (37,3%)	0,0384
Male	48	0 (0%)	6 (6%)	42 (42,4%)	
Age*					
20 – 50	8	0 (0%)	2 (2%)	6 (6,1%)	0,7281
51 – 70	42	3 (3%)	7 (7,1%)	32 (32,6%)	
71 - 100	48	3 (3%)	5 (5,1%)	40 (40,8%)	
Location of tumor**					
Head	77	4 (3,8%)	12 (11,5%)	61 (58,6%)	0,3792
Neck	4	0 (0%)	0 (0%)	4 (3,8%)	
Trunk	11	1 (0,9%)	0 (0%)	10 (9,6%)	
Members	6	1 (0,9%)	2 (1,9%)	3 (2,8%)	
Histological type					
Superficial	11	0 (0%)	1 (1%)	10 (10,1%)	0,6172
Nodular (Ulcerated / Pigmented)	83	5 (5%)	12 (12,1%)	66 (66,6%)	
Sclerodermiform	4	1 (1%)	1 (1%)	2 (2%)	
Bassoquamous	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)	

* Displays sample without information

** Presents samples with more than one type of tumor

Discussion

Several single-nucleotide polymorphisms have been associated with susceptibility to the development of cancer. The SNPs investigated in this work (rs745769173 - XPA, rs535425175 and rs761106780 - XPC) have never been cited in previous studies and were selected because they are close to or in regions of interaction with other proteins.

Miller et al. (2006) analyzed several SNPs in the XPA gene, one in the UTR region (rs1800975) and haplotypes within introns (rs3176633, rs3176689, rs2805835, rs3176719, rs1962592, rs3176751 and rs3176690) in patients with Basal Cell Carcinoma and Cell Carcinoma Squamous. They found that the G allele of polymorphism rs1800975 is associated with an increased risk of BCC and CEC and the seven haplotypes were in the Hardy-Weinberg equilibrium. This was the first study to relate polymorphisms in the XPA gene with the predisposition to the development of non-melanoma skin cancer [15].

Differently from Miller and colleagues, Ding et al (2009) performed a meta-analysis to analyze the association of rs1800975 polymorphism with cancer risk. They verified that of the 36 control cases analyzed, in general there was no significant association between the polymorphism and the susceptibility to develop cancer. However, in stratified analysis by type of cancer, it was observed that individuals with variant genotypes present a higher risk of lung cancer [21].

Significant associations were also found between the rs2228001 polymorphism (XPC) and the risk of lung cancer in the Asian population. Jin et al (2014) in the meta-analysis conducted on the basis of 14 studies found that the homozygous genotype Lys939Gln was associated with the risk of developing lung cancer. While the polymorphism rs2228000 was not associated with the risk of this pathogenesis [22].

In Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (CCECP), a type of non-melanoma skin cancer, Farnebo et al. (2015) sought to investigate PNS as potential risk factors and indicators of survival among Caucasian patients. Four polymorphisms of four genes of the nucleotide excision repair mechanism were studied in 169 patients and 344 controls. The results suggest that all SNPs may affect the risk and survival of CCECP and that rs222800 (XPC) is associated with an increased risk of CCECP and Laryngeal Carcinoma. Statistical analyzes also revealed a twofold increased risk in patients diagnosed with CCECP in the presence of the T allele in the total group, as well as in homozygous men $P = 0.02$ and a three-fold increased risk in Laryngeal Carcinoma [23].

No association studies of XPC gene SNP with susceptibility to the development of Basal Cell Carcinoma were found. But there are some studies of association of polymorphisms with the risk of developing melanoma. Jiang and colleagues (2015), Zhou et al (2014) performed meta-analyzes on the association of Lys939Gln polymorphism in the pathogenesis of melanoma in Caucasians, but the results suggest that there was no evidence of an important role of this polymorphism [24].

Our results suggest that there was a significant association ($P < 0.005$) between polymorphism rs535425175 (XPC) and susceptibility to the development of Basal Cell Carcinoma. The analysis revealed that the homozygote genotype CC confers an increased risk of developing BCC. The rs535425175 is a SNP near the codon downstream of the site of interaction with TFIIH, a helicase recruited by the XPC required repair activity. The SNPs rs745769173 and rs761106780 of the XPA and XPC genes respectively showed no association with the neoplasia.

Conflict of Interest: None

Acknowledgments: The authors would like to thank Jimmy Johnson for proofreading the article.

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

Ethical approval: The present study is part of the thematic project approved by the Ethics Committee of the University Hospital Lauro Wanderley - UFPB under the code CAAE: 36522614.2.3001.5883.

Guarantor: Not applied.

Contributorship: Not applied.

References

1. Otsuka A, Levesque MP, Dummer R, Kabashima K. Hedgehog signaling in Basal Cell Carcinoma. *Japanese Society for Investigative Dermatology*, 78 (2015) 95–100, 2015; doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.02.007.
2. Almeida ACC, Conte B, Veríssimo RP, Yamashita T, Mattos AC, Ferreira MCF. Frequência do carcinoma basocelular na população menor de 50 anos: estudo do serviço e revisão da literatura. In: *Anais Brasileiro de Dermatologia*, 84(6):692-4, 2009.
3. Dourmishev LA; rusinova D, Botev I. Clinical variants, stages, and management of basal cell carcinoma. *Indian Dermatology Online Journal - Vol. 4 - Issue 1*, 2013.
4. Chinem VP, Miot HA. Epidemiologia do Carcinoma Basocelular. In: *Anais Brasileiro de Dermatologia*; 86(2):292-305, 2011.
5. Kosiniak-Kamysz A. Pośpiech E, Wojas-Pelc A, Marcińska M, Branicki W. Potential association of single nucleotide polymorphisms in pigmentation genes with the development of Basal Cell Carcinoma. *Journal of Dermatology*. 2012; 39: 693–698.
6. Decordier I, Loock KV, Lirsch-Volders M. Phenotyping for DNA repair capacity. *Mutation Research* 705 (2010) 107–129, 2010.
7. Weinberg RA. *A biologia do câncer*. – Porto Alegre: Artmed, 2008.

8. Tanaka K, Miura N, Satokata I, Miyamoto I, Yoshida MC, Satoh Y, Kondo S, Yasui A, Okayama H, Okada Y. Analysis of human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature* 348:73-76, 1990.
9. Ding D, Zhang Y, Yu H, Guo Y, Jiang L, He X, Ma H, Zheng W. Genetic variation of XPA gene and risk of cancer: a systematic review and pooled analysis. *International Journal of Cancer*, 2012; 131, 488–496; doi: 10.1002/ijc.26391.
10. Scharer OD. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013.
11. Nishi R, Okuda Y, Watanabe E, Mori T, Iwai S, Masutani C, Sugasawa K, Hanaoka F. Centrin 2 Stimulates Nucleotide Excision Repair by Interacting with Xeroderma Pigmentosum Group C Protein. *Molecular and Cellular Biology*, p. 5664–5674, 2005; doi: 10.1128/MCB.25.13.5664-5674.2005.
12. Kamionka M, Feigon J. Structure of the XPC binding domain of hHR23A reveals hydrophobic patches for protein interaction. *Protein Sci*;13(9):2370-7, 2004; doi: 10.1110/ps.04824304.
13. Sugasawa, K. Molecular mechanisms of DNA damage recognition for mammalian nucleotide excision repair. *DNA Repair*, 2016; doi: 10.1016/j.dnarep.2016.05.015.
14. Francisco G, Menezes PR, Chammas R. XPC polymorphisms play a role in tissue-specific carcinogenesis: a meta-analysis. *European Journal of Human Genetics* (2008) 16, 724–734, 2008.
15. Miller KL, Karagas MR, Kraft P, Hunter DJ, Catalano PJ, Byler SH, Nelson HH. XPA, haplotypes, and risk of Basal and Squamous Cell Carcinoma. *Carcinogenesis*; vol.27 n.8 p.1670–1675, 2006; doi: 10.1093/carcin/bgi376.
16. Mei C, Hou M, Guo S, Hua F, Zheng D, Xu F, Jiang Y, Li L, Qiao Y, Fan Y, Zhou Q. Polymorphisms in DNA repair genes of XRCC1, XPA, XPC, XPD and associations with lung cancer risk in Chinese people. *Thoracic Cancer*, ISSN 1759-7706, 2013; doi: 10.1111/1759-7714.12073.

17. Sakoda LC, Loomis MM, Doherty JA, Julianto L, Barnett MJ, Neuhauser ML, Thornquist MD, Weiss NS, Goodman GE, Chen C. Germ line variation in nucleotide excision repair genes and lung cancer risk in smokers. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 3(1):1-17, 2012.
18. He L, Deng T, Hesheng L. XPA A23G polymorphism and risk of digestive system cancers: a meta-analysis. *Onco Targets and Therapy*, 8 385–394, 2015.
- 19 - Shang-Rong S, Cotel, RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y, Liu D, Lim H, Taylor CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *The Journal of Histochemistry e Cytochemistry*. Thousand Oaks, CA. 50(8): 1005-1011, 2002.
- 20 - Lima, EM; Lopes OS, Soares, LF; Arruda TD, Gigeck CO, Melo CGF, Smith MAC, Oliveira JRG, Medeiros A, Dellatorre P, Burbano, RR. Dideoxy single allele-specific PCR - DSASP new method to discrimination allelic. *Braz. arch. biol. Technol*. 58(3):414-420, 2015.
21. Ding D, Zhang Y, Yu H, Guo Y, Jiang L, He X, Ma W, Zheng W.. Genetic variation of XPA gene and risk of cancer: a systematic review and pooled analysis. *International Journal of Cancer*, 131, 488–496, 2012; doi: 10.1002/ijc.26391.
22. Jin B, Dong Y, Zhang X, Wang H, Han B. Association of XPC Polymorphisms and Lung Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Plos One*, Vol. 9, Issue 4, e93937, 2014.
23. Farnebo L, Stjernström A, Fredrikson M, Ansell A, Garvin S, Thunell LK. DNA repair genes XPC, XPD, XRCC1, and XRCC3 are associated with risk and survival of squamous cell carcinoma of the head and neck. *DNA Repair*, 31 (2015) 64–72, 2015; doi: 10.1016/j.dnarep.2015.05.003.
24. Zhou L, Lu Y, Yang G, Wu J. Quantitative assessment of the association between XPC Lys939Gln polymorphism and Cutaneous Melanoma risk. *Tumor Biol*. 35:1427–1432, 2014; doi: 10.1007/s13277-013-1196-y.

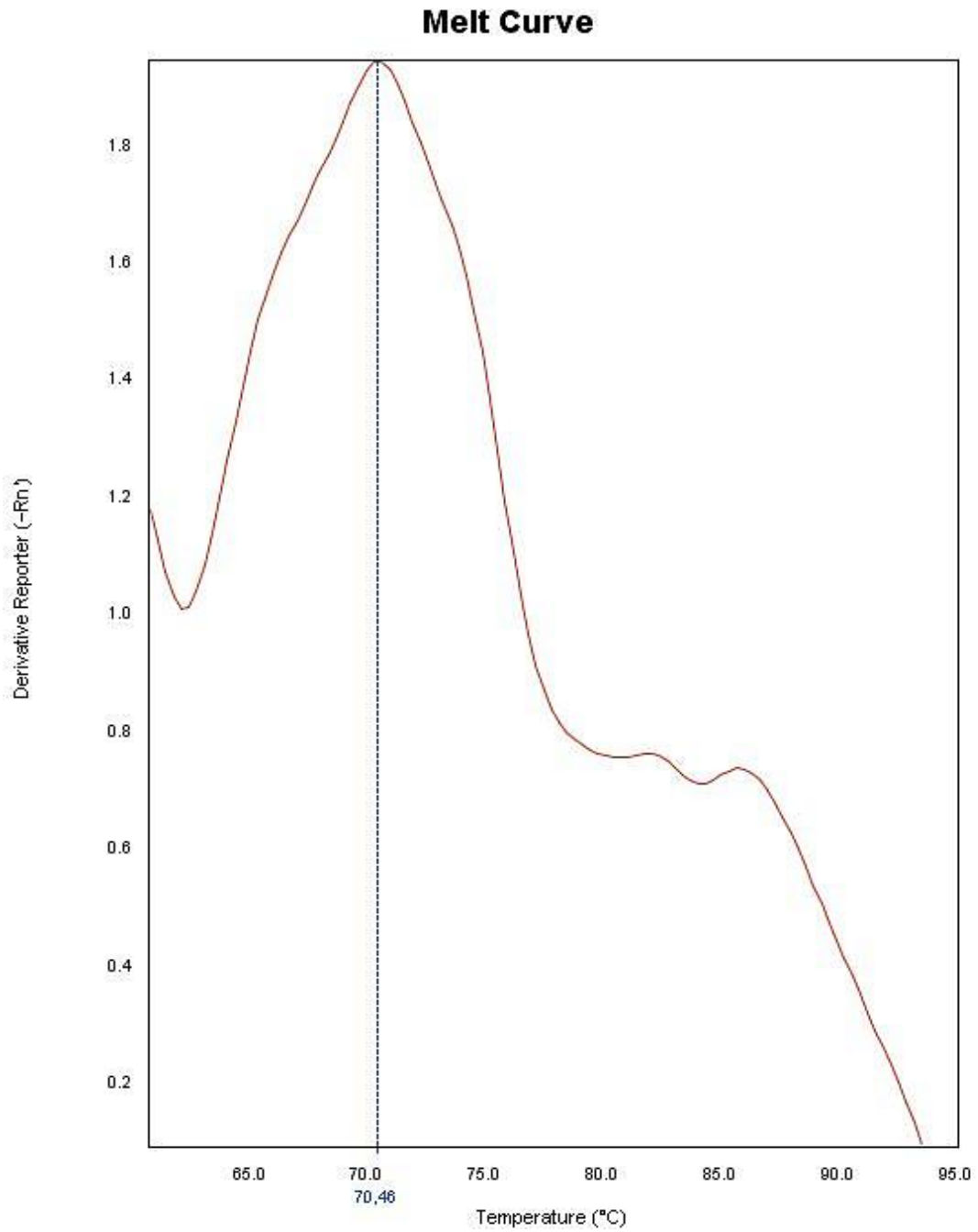


Figure 1 – Genotype A/A of the SNP rs535425175 of the XPC gene with T_m 70°C for the allele A.

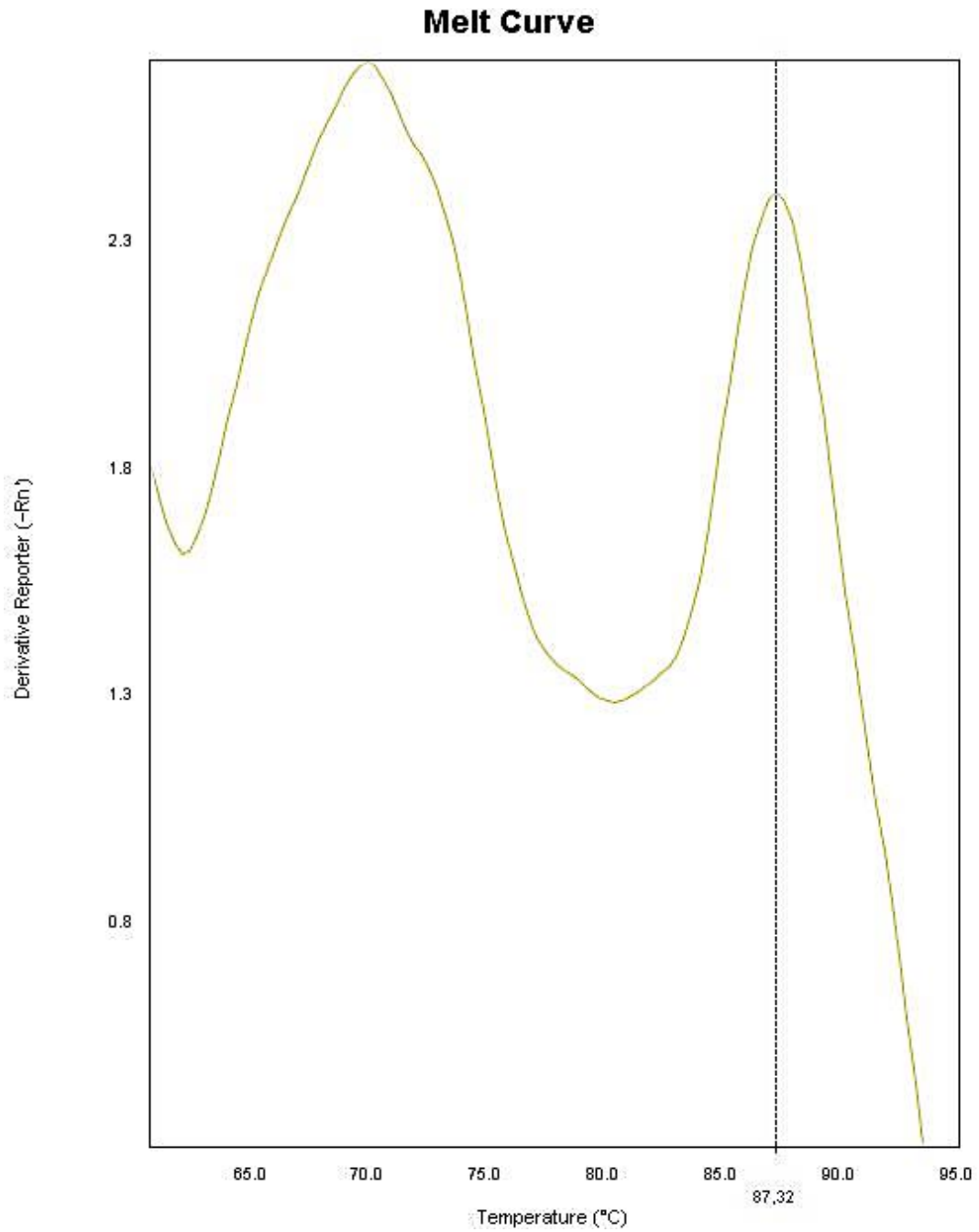


Figure 2 - Genotype A/C of the SNP rs535425175 of the XPC gene with T_m 87°C for the C allele.

