



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

POLIANE DA SILVA CALIXTO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs DOS GENES *MLH1* E *MSH2* À
SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA
BASOCELULAR NO ESTADO DA PARAÍBA**

JOÃO PESSOA - PB
2017

POLIANE DA SILVA CALIXTO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPs DOS GENES *MLH1* E *MSH2* À
SUSCEPTIBILIDADE AO DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA
BASOCELULAR NO ESTADO DA PARAÍBA**

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

Orientador: Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima

**JOÃO PESSOA – PB
2017**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C154e Calixto, Poliane da Silva.

Estudo de associação dos SNPS dos genes *MLH1* e *MSH2* à susceptibilidade ao desenvolvimento do carcinoma basocelular no estado da Paraíba / Poliane da Silva Calixto. - João Pessoa, 2017.
66 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN/PPBCM

1. Carcinoma Basocelular - Paraíba. 2. Gene - MLH1.
3. Gene - MSH2. 4. Genotipagem - SNPS. I. Título.

UFPB/BC

CDU - 616-006.6(813.3)(043)

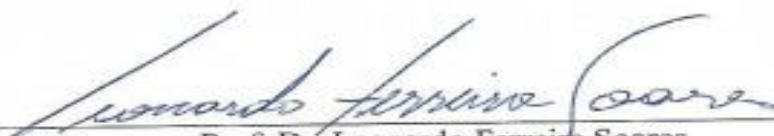
POLIANE DA SILVA CALIXTO

Dissertação de Mestrado avaliada e aprovada em 03/05/2017

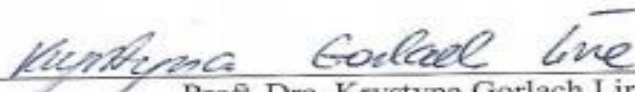
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares
Universidade Estadual da Paraíba
Examinador Externo



Prof. Dra. Krystyna Gorlach Lira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno

Prof. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal da Paraíba
Suplente

Dr. João Ricardo Gonçalves de Oliveira
Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética
Universidade Federal da Paraíba
Suplente

João Pessoa 03 de maio de 2017.

Dedico esta dissertação:

A minha família em especial a minha avó Maria, meu avô Luiz Pedro (*in memoriam*) minha mãe Luzinete e meu irmão Josemberg, pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser meu refúgio em todos os momentos da minha vida, com seu amor incondicional sempre me mostrou o melhor caminho que devo seguir na tentativa de superar todas as minhas dificuldades.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima**, pela a orientação incansável, paciência, críticas construtivas e sugestões, sempre buscando enriquecer o presente estudo com conhecimentos essenciais e assim contribuir significativamente para minha formação profissional e acadêmica.

À **Dra. Sylvia Satomi Takeno**, pela sua amizade, apoio, incentivo e sua importante contribuição na construção deste trabalho.

À **Mayara Maia**, pela convivência e aprendizado compartilhado durante os dois anos de mestrado.

A **Regina Emy Sales de Miranda**, pela sua incansável dedicação, competência e incentivo, que contribuiu para a conclusão das minhas atividades pertinentes ao curso.

Aos **amigos e colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular**, por esses dois anos de convívio, companheirismo e aprendizado compartilhado, principalmente no período das disciplinas.

A todos os membros do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural Oncogenética (**LBMEO**), em especial o **Dr. João Gonçalves de Oliveira** pela sua assistência na realização dos experimentos.

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

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

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

A Universidade Federal da Paraíba (**UFPB**), e ao **Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular**, por ter contribuindo com a minha formação.

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

A fundação **CAPES**, pelo incentivo financeiro para realização desta pesquisa, o qual foi de extrema importância para minha formação acadêmica e profissional.

RESUMO

O carcinoma basocelular (CBC) é considerado um tumor que envolve fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Sendo a radiação UVB considerada um dos principais agentes físicos envolvido na carcinogênese da epiderme promovendo danos ao DNA. Em resposta aos danos no DNA os mecanismos de reparo do DNA são ativados, entre eles, o Mecanismo de Reparo de Mal Pareamento (MMR). O sistema MMR é uma via extremamente importante para manter a fidelidade da replicação, no entanto polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes envolvidos no MMR deve ser considerado fator importante para carcinogênese do CBC. O presente estudo realizou a genotipagem dos SNPs rs560246973 (T>C), rs2303425 (-118 T>C) no gene *MSH2* e rs565410865 (G>T) no gene *MLH1*, em 100 amostras de tecido parafinado de pacientes diagnosticados com carcinoma basocelular. Os resultados foram obtidos por meio do método de genotipagem Didesoxi Único Alelo Específico PCR-DSASP. Os SNPs rs565410865 *MLH1* e rs560246973 (C>T) *MSH2* apresentaram associação estatisticamente significativa à susceptibilidade e o risco de desenvolver CBC. Os resultados sugerem que SNPs rs565410865 *MLH1* e rs560246973 (C>T) *MSH2* são potenciais marcadores moleculares associados à susceptibilidade ao desenvolvimento do CBC nas amostras analisadas.

Palavras-chave: Carcinoma Basocelular, gene *MLH1*, gene *MSH2*, SNPs, DSASP.

ABSTRACT

Basal cell carcinoma (BCC) is considered a tumor involving genetic, epigenetic and environmental factors. UVB radiation is considered to be one of the main physical agents involved in the carcinogenesis of the epidermis promoting DNA damage. In response to DNA damage the DNA repair mechanisms are activated, among them, the mismatch repair mechanism (MMR). The MMR system is an extremely important to maintain the fidelity of replication, however single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes involved in MMR should be considered an important factor for CBC carcinogenesis. The present study carried out the genotyping of SNPs rs560246973 (T> C), rs2303425 (-118 T> C) in the MSH2 gene and rs565410865 (G> T) in the MLH1 gene, in 100 samples of paraffin-embedded tissue from patients diagnosed with basal cell carcinoma. The results were obtained by means of the Dideoxy Single Genotype Allele Specific PCR-DSASP genotyping method. SNPs rs565410865 MLH1 and rs560246973 (C> T) MSH2 showed a statistically significant association with the susceptibility and risk of developing BCC. The results suggest that SNPs rs565410865 MLH1 and rs560246973 (C> T) MSH2 are potential molecular markers associated with susceptibility to the development of BCC in the analyzed samples.

Key words: Basal cell carcinoma, *MLH1* gene, *MSH2* gene, SNPs, DSASP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Etapas adquiridos por uma célula neoplásica para o desenvolvimento da carcinogênese.....	17
Figura 2- As células constituintes da epiderme humana.....	19
Figura 3- Índice de radiação ultravioleta na América do Sul e em João Pessoa PB.....	24
Figura 4 - Espectro solar evidenciando o comprimento de onda da radiação UV nas camadas da pele humana.....	24
Figura 5- Ilustração da correção de erro no DNA pelo Sistema de Reparo de Mal Pareamento (MMR) em humanos.....	26
Figura 6- Localização do gene <i>MLH1</i> no genoma humano.....	28
Figurado 7- Localização do SNP rs565410865 no limite íntron/éxon do gene <i>MLH1</i>	29
Figura 8- Localização do gene <i>MSH2</i> no genoma humano.....	30
Figura 9- Localização do SNP rs560246973 no limite éxon-íntron do gene <i>MSH2</i>	31
Figura 10-Região promotora do gene <i>MSH2</i> e os diferentes fatores de transcrição associados.....	32
Figura 11-Curva de melting representando o genótipo T/T do SNP rs560246973 do gene <i>MSH2</i>	44
Figura 12-Curva de melting representando o genótipo C/C do SNP rs560246973 do gene <i>MSH2</i>	45
Figura 13-Curva de melting representando o genótipo G/G do SNP rs565410865 do gene <i>MLH1</i>	46
Figura 14-Curva de melting representando o genótipo T/T do SNP rs565410865 do gene <i>MLH1</i>	47
Figura 15- Curva de melting representando o genótipo C/C do SNP rs2303425 do gene <i>MSH2</i>	48
Figura 16- Curva de melting representando o genótipo C/T do SNP rs2303425 do gene <i>MSH2</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos fototipos de pele por Fitzpatrick.....	23
Tabela 2- Dados histopatológicos das amostras de pacientes com carcinoma basocelular.....	34
Tabela 3- Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs560246973 (T>C) e susceptibilidade ao CBC.....	41
Tabela 4- Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs565410865 (G>T) e susceptibilidade ao CBC.....	42
Tabela 5- Distribuição alélica e genotípica de SNPs nos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> em indivíduos com CBC.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Genes e seus respectivos polimorfismos, bem como a sequência dos iniciadores e complementares específicos para cada polimorfismo amplificado pelo método DSASP.....	38
Quadro 2- Protocolos para PCR e amplificação dos SNPs nos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RUV	Radiação ultravioleta
CBC	Carcinoma basocelular
CEC	Carcinoma espinocelular
UVA	Radiação ultravioleta A
UVB	Radiação ultravioleta B
UVC	Radiação ultravioleta C
MMR	Reparo por mal pareamento
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
BER	Reparo por excisão de base
ROS	Espécies reativas de oxigênio
DSB	Quebra de fita dupla
NHEJ	Junção de extremidades não homólogas
INCA	Instituto Nacional de Câncer
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
EXO1	Exonuclease 1 humana
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
RPA	Proteína de replicação A
LBMEO	Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética
PCR	Reação em cadeia da polimerase
DSASP	Didesoxi Único Alelo Específico
ddNTP	Didesoxinucleotídeo
T _m	Temperatura de melting
DNTP	Desoxirribonucleotídeos

X ² -	qui- quadrado
RNA	Ácido ribonucleico
SER	Elementos regulatórios de splicing
HSF	Human Splicing Finder
ESS	Silenciador de splicing exônico
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
HRR	Reparo por recombinação homóloga
Mm	milímetro
µm	micrómetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Câncer.....	16
1.2 Pele.....	18
1.2.1 Epiderme.....	18
1.3 Carcinoma basocelular.....	20
1.3.1 Epidemiologia.....	21
1.3.2 Etiologia.....	22
1.4 Mecanismo de Reparo de Mal Pareamento do DNA (MMR)	24
1.5 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs- <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)	27
1.5.1 Gene <i>MLH1</i> e SNP rs565410865.....	28
1.5.2 Gene <i>MSH2</i> e SNPs rs56246972 e rs2303425.....	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Aspectos éticos.....	34
3.2 Amostras	34
3.3 Biologia molecular.....	37
3.3.1. Extração do DNA.....	37
3.3.2. Validação <i>in silico</i>	37
3.3.2.1. Técnica e desenho dos iniciadores.....	37
3.3.3. Método Dideoxi Único Alelo Específico PCR (<i>Dideoxy Single Allele-Specific PCR-DSASP</i>)	38
3.3.3.1. Método DSASP e suas condições.....	39
3.4 Análises estatísticas.....	40
4. RESULTADOS.....	41

4.1 Dados demográficos e histopatológicos	41
4.2 Associação dos SNPs nos genes <i>MSH1</i> e <i>MSH2</i> com o risco de CBC.....	43
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

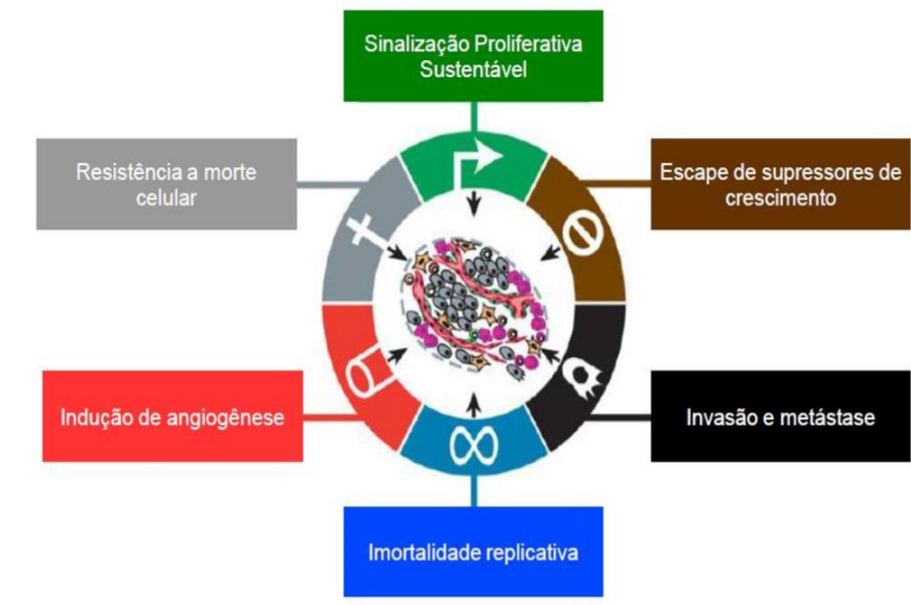
1.1.Câncer

Em princípio estudos consideravam que o câncer se originava por meio de mutações sucessivas no DNA em células germinativas e somáticas, resultando em alterações genéticas que contribuem para o desenvolvimento de cânceres hereditários e esporádicos, estudos posteriores revelaram que alterações epigenéticas, como metilação de genes específicos, também eram relevantes na formação dos tumores, de forma que ambas alterações podem afetar genes associados à carcinogênese resultando em ganho de função quando ativam oncogenes, perda de função quando inativam de genes supressores de tumor e comprometimento da estabilidade genômica quando inativam genes dos mecanismos de reparo do DNA (KNUDSON, 1971; BAYLIN et al., 1986; VOGELSTEIN; KINZLER, 1993).

Os tumores podem ser divididos em duas categorias de acordo com o seu grau proliferativo: benignos quando não há invasão de tecidos adjacentes e malignos que progridem em metástases (WEINBERG, 2008).

O crescimento do tumor envolve uma série de fatores relacionados com a desregulação no ciclo celular, mais precisamente do circuito de processamento de sinais biológicos, que tem como consequência a capacidade de uma célula com mutação proliferar-se continuamente. Hanahan e Weinberg (2011) discutem seis etapas necessários para o desenvolvimento das carcinogêneses: 1) sinalização proliferativa sustentável, 2) escape de supressores de crescimento, 3) invasão e metástase, 4) imortalidade replicativa, 5) indução de angiogênese e 6) resistência a morte celular (Figura 1).

Figura 1- Etapas adquiridas por uma célula neoplásica para o desenvolvimento da carcinogênese.



Fonte: Hanahan e Weinberg (2011).

Damaei et al. (2005) sugerem alguns fatores ambientais de riscos para o desenvolvimento de um tumor, como a exposição contínua a luz ultravioleta, radiação ionizante, tabaco, álcool, agentes infecciosos causadores de algumas patologias, exposição ocupacional, dieta inadequada, agentes químicos cancerígenos entre outros.

Dentre os fatores externos relacionados como o modo de vida e o ambiente do indivíduo, também é observado variações genéticas e epigenéticas na sequência de DNA, que quando integrados aos fatores citados acima podem contribuir nas alterações do genoma. Decorrentes de mutações sucessivas ou até mesmo falhas no mecanismo de metilação do DNA, que podem resultar em perda ou ganho de função em genes envolvidos com o controle do ciclo celular, que correspondem aos proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados com reparo do DNA (BERGER; GARRAWAY, 2009). Podendo assim comprometer a integridade do material genético e consequentemente o desenvolvimento de células tumorais em um determinado tecido.

1.2. Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, este compõe uma área de aproximadamente 2m² e compreende entre 15 a 20% do peso corporal (MARTIN; VULIN; HENDRY, 2016).

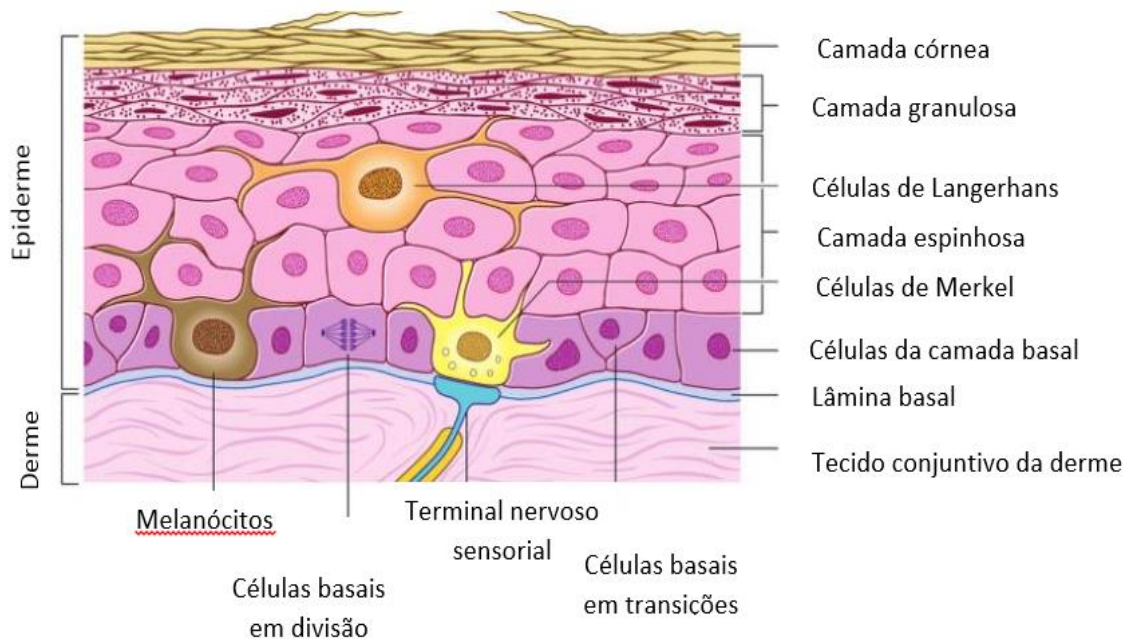
Sua principal função é fornecer proteção contra agressões mecânicas e químicas provenientes do meio externo, como também contribuir para impedir a perda de água, mudanças de temperatura, radiação e infecção (BLANPAIN; FUCHS, 2006). É constituída pela epiderme camada mais externa e a derme, que apresenta tecido conjuntivo vascular, rico em colágeno denso responsável pelas propriedades mecânicas (QUAN; FISHER, 2015) .

1.2.1 Epiderme

A epiderme é composta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, que está ligado a uma lâmina basal subjacente, apresenta espessura em torno de 20 a 100µm até 1,4mm dependendo de sua localização (MARTIN; VULIN; HENDRY, 2016).

Constituídas por quatro camadas (Figura 2): córnea que é a camada mais externa, apresenta queratinócitos desprovidos de núcleos e organelas citoplasmáticas, com grande quantidade de filamentos de queratina; camada granulosa, formada por células que contêm muito grânulos de queratina e que estão passando pelo processo de apoptose; camada espinhosa formada por queratinócitos em mitose, onde se origina o carcinoma espinocelular e por último a camada basal, responsável pela renovação celular da epiderme, devido à grande quantidade de células-troncos e intensa atividade mitótica (BLANPAIN; FUCHS, 2006; KHAN et al., 2012).

Figura 2- As células constituintes da epiderme humana.



Fonte: Standring et al. (2016)

A epiderme é constituída preferencialmente por queratinócitos, estes sofrem sucessivas alterações morfológicas e na composição da queratina, dependendo da sua localização (STANDRING et al., 2016). Também são encontrados outros tipos de células, como células de Lagerhans presentes em quase todas as camadas, funcionam como um componente do sistema imune, pois fazem o reconhecimento de antígenos (KHAN et al., 2012), células de Merkel que associam-se com nervos sensoriais (HAEBERLE; LUMPKIN, 2008) e melanócitos presentes na camada basal, que são responsáveis pela produção de melanina, pigmento que protege a pele contra a radiação ultravioleta (RUV) (HIROBE, 2014).

No entanto, quando a superfície da pele é diretamente exposta à RUV, pode resultar em danos no genoma de suas células (YIN, et al., 2014; KIM; HE, 2014). As células na tentativa de minimizar os efeitos da RUV, possuem diversos mecanismos de defesas, os quais estão reparo do DNA e apoptose (DUBAS; INGRAFFEA, 2013; ESPINHA et al., 2015). No entanto havendo alteração em um desses mecanismos, pode resultar na carcinogênese e no desenvolvimento de um provável câncer de pele, como o Carcinoma Basocelular (CBC).

1.3. Carcinoma Basocelular

O câncer de pele não-melanoma é classificado em dois subtipos, o carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma espinocelular (CEC). O CBC é um tumor maligno, sendo um dos cânceres com maior predominância em seres humanos, apresenta características bem peculiares, alvo de estudos na tentativa de compreender melhor o desenvolvimento da carcinogênese (MADAN et al., 2010).

Em 1827 o cirurgião irlandês, Artur Jacob foi o primeiro a descrever os aspectos clínicos do tumor, o qual denominou de úlcera facial (JACOB, 1827). O nome atual, partiu da descrição histológica pelo patologista Krompecher, ao observar células tumorais semelhantes às da camada basal da epiderme (KROMPECHER, 1903).

A possível origem celular do CBC ainda é duvidosa, estudos relatam seu desenvolvimento a partir de células basais da epiderme humana (LEWIN; CARUCCI, 2015). Há evidências de que as células malignas são derivadas de células-tronco da epiderme interfolicular e da raiz do folículo capilar (YOUSSEF et al., 2010).

O CBC é classificado em vários subtipos histológicos e apresenta comportamentos biológicos bastante distintos, sendo que os mais representativos do tumor são o nodular, superficial e esclerodermiforme (MENDAÇOLLI et al., 2015).

Tumores como estes apresentam um lento crescimento, as lesões proeminentes do desenvolvimento do tumor podem causar dano tecidual e dependendo da sua localização levam ao comprometimento das funções normais de determinados órgãos. As lesões são mais frequentes em áreas fotoexpostas, cerca de 80% são encontradas na cabeça e no pescoço, com predominância na face, especificamente no nariz e nas bochechas, sendo os subtipos nodular, micronodular e infiltrante são predominantes e o subtipo superficial o mais comum nas demais regiões do corpo (CHANG; GAO, 2013; MOHAMMAD, et al, 2015).

A ocorrência de comportamento invasivo, ou seja, metastático é raro (OZGEDIZ, et al., 2008). Todavia é importante salientar que apesar da baixa taxa de mortalidade, é um grave problema para o sistema de saúde pública e privada, configurando-se até mesmo como uma epidemia global, uma vez que é relevante o aumento do número de pessoas com a neoplasia.

Os custos com o tratamento excedem os gastos com outros cânceres, a sua incidência é alta, sendo necessário uma série de opções terapêuticas que podem resultar na cura do paciente,

dentre os quais estão: excisão cirúrgica, curetagem e terapia tópica (GOLDENBERG et al., 2016; GUY et al., 2015).

Desta forma, políticas públicas de prevenção, como também meio que possibilite a detecção precoce do câncer de pele, são essenciais para evitar eventuais problemas na integridade física dos indivíduos, como diminuir gastos na saúde com o tratamento.

1.3.1 Epidemiologia

O câncer de pele não melanoma, é a neoplasia maligna mais frequente na população mundial, estudo recente mostra um aumento significativo em diversos países ao redor do mundo (LOMAS; LEONARDI-BEE; BATH-HEXTALL, 2012).

Cerca de 3,5 milhões de diagnósticos de câncer de pele não melanoma são realizados a cada ano, destes 80% são CBC, caracterizando-o como uma das neoplasias cutâneas mais comum (GANDHI; KAMPP, 2015). Nos Estados Unidos estudo recente relatam um aumento em 14% de diagnósticos de CBC entre 2006 a 2012, com cerca de 2 milhões de novos casos sendo registrados por ano (ROGERS et al., 2015). Na Austrália a incidência de CBC é uma das maiores, quando comparado com outros cânceres frequentes na população (DORAN et al., 2015). Embora a incidência de câncer de pele seja menor em Asiáticos, um estudo realizado entre 2011 a 2013 na Índia, relatou um crescente aumento em diagnósticos de CBC (KUMAR et al., 2014).

No Brasil, o mesmo representa com maior predominância entre homens e mulheres, em estimativa biênio 2016-2017 realizada pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), apontou cerca de 180 mil novos casos de câncer de pele não-melanoma. Na região nordeste estimou-se um risco de 42,48/100 mil habitantes para homens e 44,12 /100 mil habitantes para mulheres, considerando o estado da Paraíba avaliou-se a possibilidade de 2.030 novos casos neste estado (INCA, 2015).

A sua incidência varia entre diferentes populações, sendo mais predominante em pessoas com pele clara, principalmente do tipo I, II e III (classificação por Fitzpatrick) em que pode-se citar os caucasianos, asiáticos entre outros grupos étnicos (SNG et al., 2009; TAN et al., 2015).

Estudo sugere um maior índice de indivíduos portadores desta neoplasia maligna, sendo que os resultados mostram maior prevalência entre homens com idade superior a 60 anos de

idade, isto provavelmente é justificável pelo maior tempo de vida do indivíduo e consequentemente maior exposição acumulativa a radiação solar (REVENGA-ARRANZ et al., 2004).

No entanto nos últimos anos pesquisas apontam uma crescente incidência entre mulheres jovens com faixa etária entre 20 a 30 anos, sendo que esses dados também são significativos para homens jovens (BIRCH-JOHANSEN et al., 2010; WU; STEIN, 2013; MOHAN; CHANG, 2014). Desta forma a realização de estudos para descobrir as possíveis causas que conduzem a maior incidência de câncer de pele na população jovem é de grande relevância no meio científico.

1.3.2 Etiologia

O CBC envolve tanto fatores genéticos, como cor da pele, considerando a classificação dos fototipos de pele proposto por Fitzpatrick (Tabela 1), histórico familiar de algumas síndromes genéticas como síndrome do nevo-basocelular, xeroderma pigmentoso e a síndrome de Lynch (NIKOLAOU; STRATIGOS; TSAO, 2012), instabilidade genômica, resultante de mutações e polimorfismos e fatores ambientais como a exposição prolongada a RUV principalmente na infância, terapia de imunossupressão (DEPR et al., 2011), medicamentos fotossensibilizantes como por exemplo os antibióticos (KARAGAS et al., 2007), radiação ionizante (LICHTER et al., 2000), exposição ao arsênio (SURDU et al., 2013), entre outras substâncias carcinogênicas, a influência de fatores ocupacionais, e o uso de álcool (HUSEIN et al., 2012).

Tabela 1- Classificação dos fototipos de pele por Fitzpatrick.

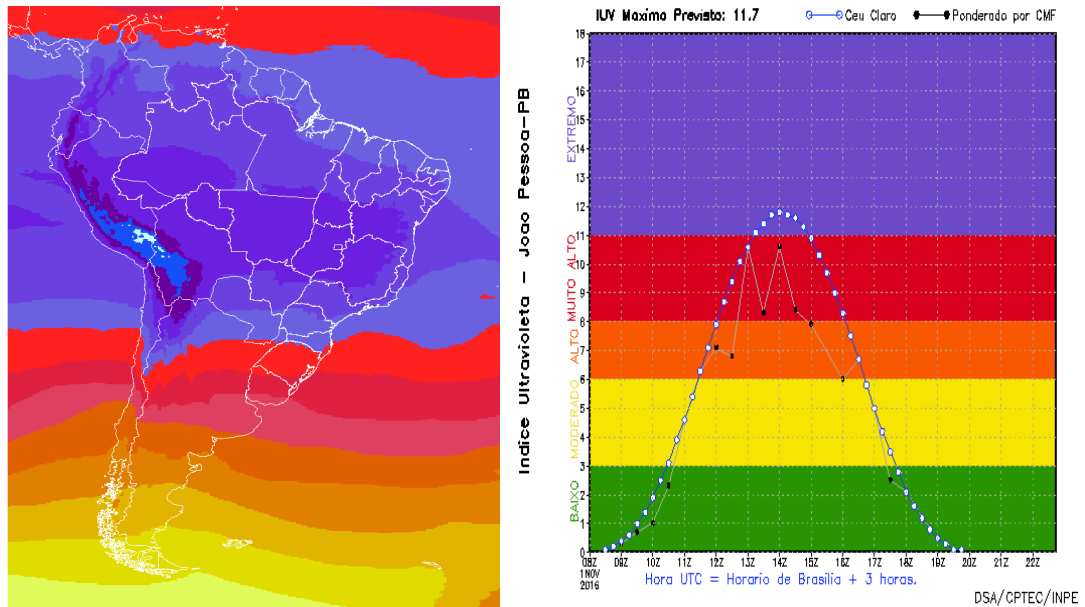
Fototipos	Eritema	Pigmentação	Sensibilidade
I Branca	Sempre se queima	Nunca se bronzeia	Muito sensível
II Branca	Sempre se queima	Às vezes se bronzeia	Sensível
III Morena clara	Queima moderadamente	Bronzeia moderadamente	Normal
IV Morena moderada	Queima pouco	Sempre bronzeia	Normal
V Morena Escura	Queima raramente	Sempre bronzeia	Pouco sensível
VI Negra	Nunca se queima	Totalmente pigmentada	Insensível

Fonte: Pereira (2013).

Um dos fatores predominantes para o seu desenvolvimento do CBC é a exposição prolongada de RUV, principalmente por indivíduos de pele clara (NOUBISSI et al., 2014).

A RUV é classificada considerando o seu comprimento de onda que corresponde a UVA (320-400 nm), UVB (280-320nm) e UVC (200-280nm), sendo que a luz solar que penetra a superfície da terra é composta por 90% UVA e 10% UVB (WRIGHT; WELLER 2015). Consequentemente as regiões e países próximos a linha do equador, como é o caso do Brasil, com 92% de seu território localizado entre a linha do equador e o trópico de Capricórnio, recebem maior incidência dos raios solares (ZINK, 2014). O estado da Paraíba é geograficamente propício ao nível elevado e uniforme de RUV (Figura 3), além de ser banhado pelo oceano Atlântico, que contribui principalmente para diversas atividades socioeconômicas ao ar livre tem como consequência exposição prolongada de indivíduos direta ou indiretamente a radiação solar.

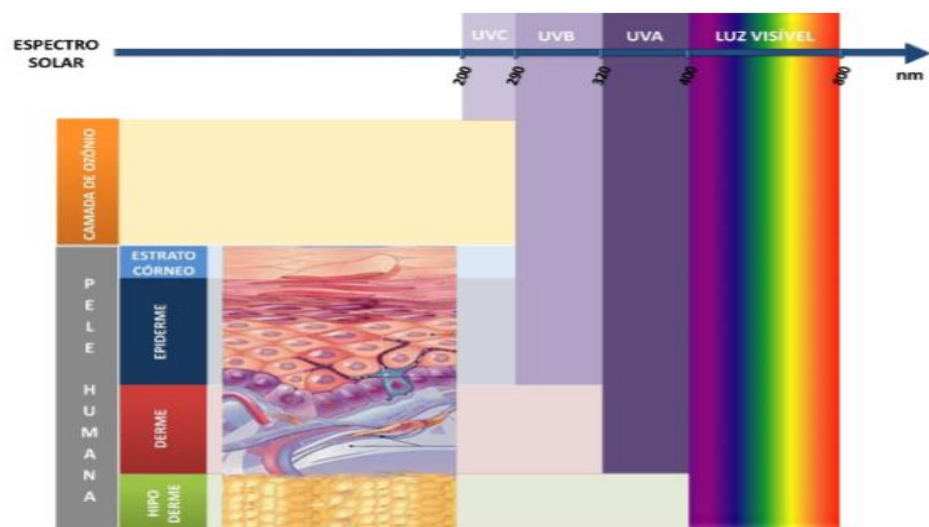
Figura 3- Índice de radiação ultravioleta na América do Sul e em João pessoa PB.



Fonte: <http://satelite.cptec.inpe.br/uv/>

Ao considerar o seu nível de penetração na pele humana, a UVA penetra profundamente na derme onde é absorvida, enquanto que a UVB atinge apenas a epiderme (Figura 4), resultando assim em danos na sequência de DNA de células predominantes desta região.

Figura 4 – Espectro solar evidenciando o comprimento de onda da radiação UV nas camadas da pele humana.



Fonte: Siqueira (2014).

Apesar da UVB incidir em pouca quantidade, é a radiação mais diretamente absorvida pelo DNA, levando a formação de fotoprodutos, que induzem lesões que consequentemente podem interromper a replicação e a transcrição do DNA, sendo desta forma a mais cancerígenas entre as demais (BUDDEN; BOWDEN, 2013).

Desta forma, a UVB é considerada um agente físico causador do processo carcinogênico na epiderme (KIM; HE, 2014). Assim em resposta a danos ao DNA vias de reparo são ativadas para manter a integridade do genoma e evitar a persistência de alterações na sequência nucleotídica que consequentemente pode resultar no desenvolvimento de tumores.

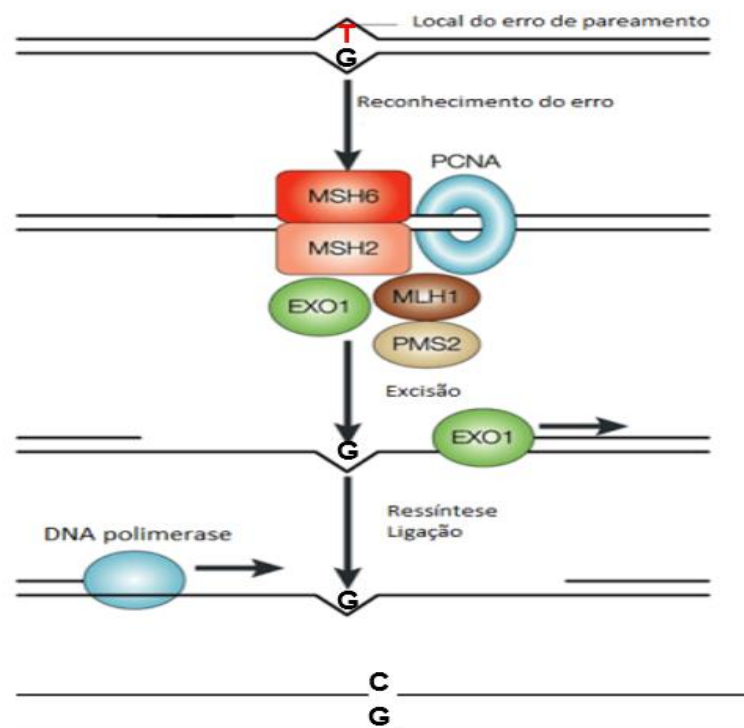
1.4 Mecanismo de Reparo de Mal Pareamento do DNA (MMR)

As enzimas de reparo são de extrema importância na progressão do ciclo celular, pois estas têm como principal finalidade evitar a continuação de possíveis erros, que possam ser induzidos na sequência de DNA. De acordo com Dizdaroglu (2015), todos os organismos vivos, apresentam em suas células, vias de reparo alternativas para reparar diferentes lesões, causadas tanto por agentes endógenos como exógenos, no entanto as mutações e polimorfismos podem interferir na resposta eficaz desse sistema.

São cinco as vias de reparo mais conhecidas até o momento: Reparo de Mal Pareamento (MMR), que faz a correção de erros durante a replicação do DNA na fase S do ciclo celular (ZHANG et al., 2015); Reparo por excisão de nucleotídeos (NER) que reconhece e repara danos do DNA através da identificação de distorções na sequência nucleotídica causadas pela radiação ultravioleta, através da formação de fotoprodutos como dímeros de pirimidina ciclobutanos (CPDs) e (6-4) fotoprodutos pirimidina pirimidona (6-4PP), em que podem atuar impedindo a replicação e transcrição do DNA (BUDDEN; BOWDEN, 2013); Reparo por excisão de base (BER) que é o mecanismo responsável por evitar danos por espécies reativas de oxigênio (ROS) endógenos, pois remove e repara bases oxidadas (LEANDRO; SYKORA; BOHR, 2015); Reparo direto que corresponde a uma via que repara bases danificadas diretamente através da fotorreativação, pelo auxílio da enzima DNA-fotoliase, na qual reverte o dano pela quebra de ligações covalente entre duas pirimidinas e assim regenera o estado original das bases (WATSON, et al, 2008); e o reparo de quebra de fita dupla (DSB), este último pode atuar de duas maneiras tanto por recombinação homóloga (HRR) como por junção de extremidades não homólogas (NHEJ) (MENG, et al, 2015; WOOD, et al, 2005).

O MMR é o mecanismo de reparo do DNA, no qual enzimas detectam e removem possíveis erros, cometidos pela DNA polimerase logo após a síntese de DNA (Figura 5). Então o MMR envolve a excisão dos nucleotídeos que resultam em falhas no alinhamento entre a fita parental e nascente de DNA, os erros mais frequentes são aqueles cometidos pela DNA polimerase em regiões que apresentam sequencias repetidas, ou durante a incorporação de bases erradas (WEINBERG, 2008).

Figura 5- Ilustração da correção de erro no DNA pelo Sistema de Reparo de Mal Pareamento (MMR) em humanos.



Fonte: Adaptado de Schneider (2015).

O MMR é um dos sistemas de reparo mais bem conservados tanto em eucariotos como procariotos (ERIE; WENINGER, 2014). Este corresponde uma via extremamente importante para manter a fidelidade da replicação, uma vez que falhas em seus componentes resulta em mutações na sequência do DNA, que podem causar a susceptibilidade a vários tipos de cânceres.

O sistema em eucariotos utiliza dois grupos de proteínas homólogos a procariotos, as MSH que funcionam como heterodímeros de duas subunidades distintas Muts α (MSH2-MSH6) que reconhece nucleotídeos únicos desemparelhados e Muts β (MSH2-MSH3), este reconhece loops de inserção/deleção, fazem parte o complexo MSH a (Msh4-Msh5) que não apresentam

função no sistema MMR, porém são importantes durante a recombinação mitótica, pois reconhecem junções Holliday (MJELLE, et al., 2015). Já as MLH funcionam também como heterodímeros (MutL α : MLH1 e PMS2; MutL β : MLH1 e PMS1; MutL γ : MLH1 e MLH3), assim todas as proteínas citadas são de extrema importância para a atuação na via MMR em humanos (REYES et al., 2015).

Em humanos o mal pareamento é reconhecido primeiramente por dois heterodímeros MSH2-MSH3 ou MSH2-MSH6, estes quando ligados recrutam o complexo MLH1-PMS2, que apresenta um sítio endonuclease em PMS2, o mesmo também é essencial para recrutar outras proteínas para o reparo como Exo1, PCNA, RPA e a DNA Polimerase δ (SMITH et al., 2013; STOJIC; BRUN; JIRICNY, 2004).

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

Os SNPs compreendem um dos tipos de alterações no genoma mais frequentes, definido como variações de uma única base na sequência nucleotídica que persiste com um percentual maior ou igual a 1% na população (BROOKES, 1999).

Estes podem estar presentes em regiões reguladoras de genes, regiões codificadoras e afetar a expressão gênica causando possíveis alterações na estrutura das proteínas (KIM; MISRA, 2007), sendo relevante a associação de SNPs com a possível susceptibilidade ao desenvolvimento de muitos tipos de doença e consequentemente a resposta do indivíduo, para manter a homeostase celular.

Estudos sugerem associação entre SNP em genes MMR e a susceptibilidade a diversos tumores como em *MSH2* rs63749993 e *MLH1* rs9876116 e câncer de esôfago (Sun et al., 2014), *MLH1* rs1799977 e câncer de mama (Smith, 2008), *PMS2* rs7797466 e câncer de ovário (Song et al., 2006), *MSH2* rs2303425 e câncer colorretal (Mrkonjic et al., 2007), *hMSH2* rs2303425 e câncer gástrico (Xiao et al., 2012), *hMLH1* rs1800734, *hMSH2* rs2303425 e câncer de pulmão (Slováková et al., 2015), *MLH1* rs1799977 e câncer de próstata (Langeberg et al., 2010).

Mutações polimórficas nos genes do mecanismo de reparo MMR, em especial nos genes *hMLH1* e *hMSH2* é um fator ao risco para o indivíduo desenvolver tumores hereditários e esporádicos (XIAO et al., 2012).

Estudos estabelecem correlação entre polimorfismos nos genes *MLH1* e *MSH2* e a susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores de origem epitelial. Em um estudo de meta-análise envolvendo 17.791 casos e 13.782 controles, verificou-se que o polimorfismo rs1800734 (A>G) estava associado com o risco de câncer colorretal (WANG et al., 2012).

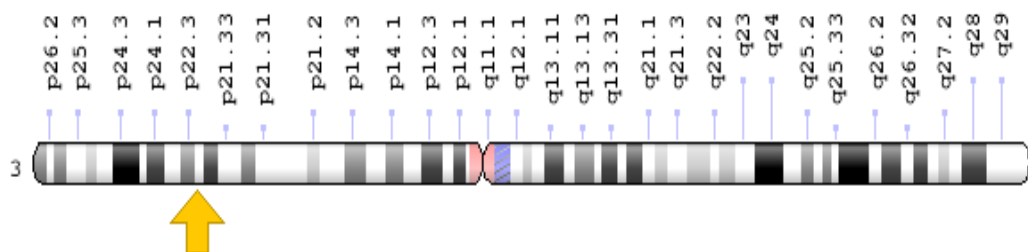
Desta forma, uma vez que os SNPs podem determinar o grau de diversidade genética existente em uma determinada população, estes podem ser utilizados como marcadores genéticos, com finalidade de contribuir para o prognóstico de pacientes susceptíveis a desenvolver CBC, e explicar a evolução clínica e resposta terapêutica dos indivíduos acometidos pela doença. O presente trabalho analisou os SNPs rs560246973 (T>C), rs2303425 (-118 T>C) no gene *MSH2* e rs565410865 (G>T) no gene *MLH1* em amostras de indivíduos diagnosticados com CBC.

1.5.1 Gene *MLH1* e SNP rs565410865

O gene *MLH1* é homólogo mutL de *E. coli*, um dos principais genes envolvidos no mecanismo MMR, sendo o mesmo altamente conservado na maioria das espécies (PAPADOPOULOS et al., 1994).

Em humanos o gene *MLH1* está localizado na região cromossômica 3p22.2 (Figura 6), sendo composto por 19 éxons, 58 kb de comprimento e codifica uma proteína nuclear com 756 aminoácidos apresentando peso molecular de 80 KDa (HAN et al; 1995; FUKUHARA et al., 2014).

Figura 6- Localização do gene *MLH1* no genoma humano.



Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MLH1#location>

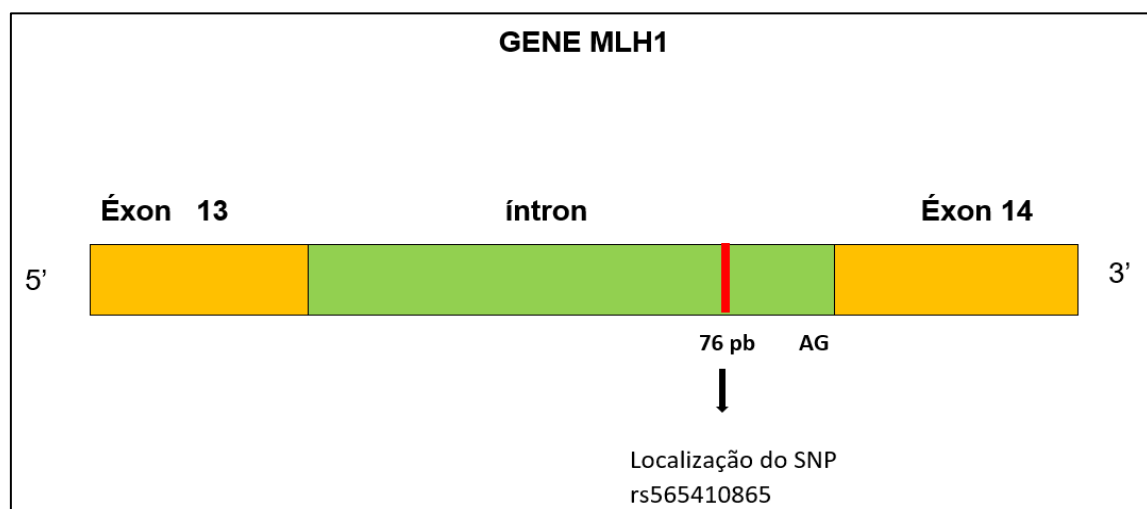
A proteína MLH1 possui um domínio N-terminal, no qual é essencial para a atividade ATPase e um domínio C-terminal, onde reside sítios de interações entre homólogas mutL

MLH2, MLH3, PMS1 ou PMS2, e proteínas EXO1, BLM e PCNA envolvidas no reparo e na replicação do DNA (MODRICH, 2006; DHERIN, et al; 2009; WU, et al., 2015).

Estudos revelam que além da participação no reparo de mal pareamento a proteína MLH1 também realiza outras funções para auxiliar na manutenção da homeostase celular, como a ativação da parada do ciclo celular, no qual o sistema de reparo é recrutado e assim corrige danos possibilitando a continuação do ciclo celular. No caso de danos irreversíveis, atua na ativação do apoptose e na regulação da migração celular interagindo com outras proteínas de sinalização celular e formação do *crossing-over* durante a meiose (MCDAID, et al., 2009; HINRICHSEN, et al., 2014; SANTUCCI-DARMANIN, et al., 2000).

O SNP rs565410865 (G>T) no gene MLH1 se encontra no limite íntron/éxon (Figura 7), próximo de um sítio de processamento 3' e 76 pares de bases a montante do éxon 14. (SHERRY et al., 2001).

Figura 7- Localização do SNP rs565410865 no limite íntron/éxon do gene *MLH1*.



Fonte: Elaborada pela autora.

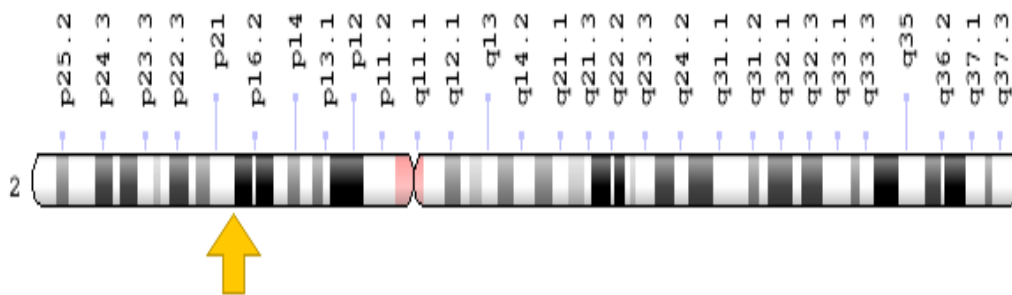
Estudos recentes têm mostrados que a substituição de base em uma sequência de DNA em uma região de íntron pode alterar a regulação do gene em nível de processamento de RNA, uma vez que pode criar novos sítios de processamento, além de alterar elementos regulatórios do *splicing* (SER) (VAN DER KLIFT et al., 2015; WIBOM et al., 2012). Estes elementos reguladores contribuem para a fidelidade do processamento do pré-mRNA, pois estão localizados dentro de éxons e íntros, em sítios específicos para o reconhecimento do

spliceossomo e as proteínas auxiliares de ligação ao RNA aos locais corretos para remoção de íntrons e a junção dos éxons (WARD; COOPER, 2010).

1.5.2 Gene *MSH2* e SNPs rs560246973 e rs2303425

O *MSH2* é um gene homólogo MutS de *E. coli* e envolvido com o MMR, o mesmo localizado em humanos na região cromossômica 2p21 (Figura 8), abrange um segmento de 73 kb com 16 éxons, codificando uma proteína de localização nuclear contendo 934 aminoácidos, apresentando peso molecular correspondente a 104,7 KDa (FISHEL, et al., 1993; KOLODNER, et al., 1994).

Figura 8- Localização do gene *MSH2* no genoma humano.



Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH2#location>

A proteína *MSH2* é um componente do complexo Muts em eucariotos, está envolvida na formação de heterodímeros com *MSH6*.

Estudos de cristalografia foram realizados na tentativa de compreender a estrutura proteica de ambas. Então foram observados nesses estudos 5 domínios conservados similares aos de *E. coli*, definidos como domínio 1 na região N terminal de *MSH2* e *MSH6*, este representa uma região de ligação com o DNA mal pareado, o domínio 2 pode estar envolvido com a sinalização alostérica entre os domínios 3 e 5, o domínio 3 apresenta uma característica marcante, uma vez que está presente em duas áreas distintas da molécula, o domínio 4 é composto por cadeia beta, que faz contato com DNA não específico, e está inserido entre duas regiões do domínio 3, enquanto que o domínio 5 está localizado no C-terminal de ambas proteínas e corresponde ao domínio ABC-ATPase neste ocorre ligação e hidrólise de ATP, a

MSH2 apresenta sítios de ligação ao íon magnésio (FISHEL; WILSON, 1997; WARREN, et al., 2007; EDELBROCK; KALIYAPERUMAL; WILLIAMS 2013).

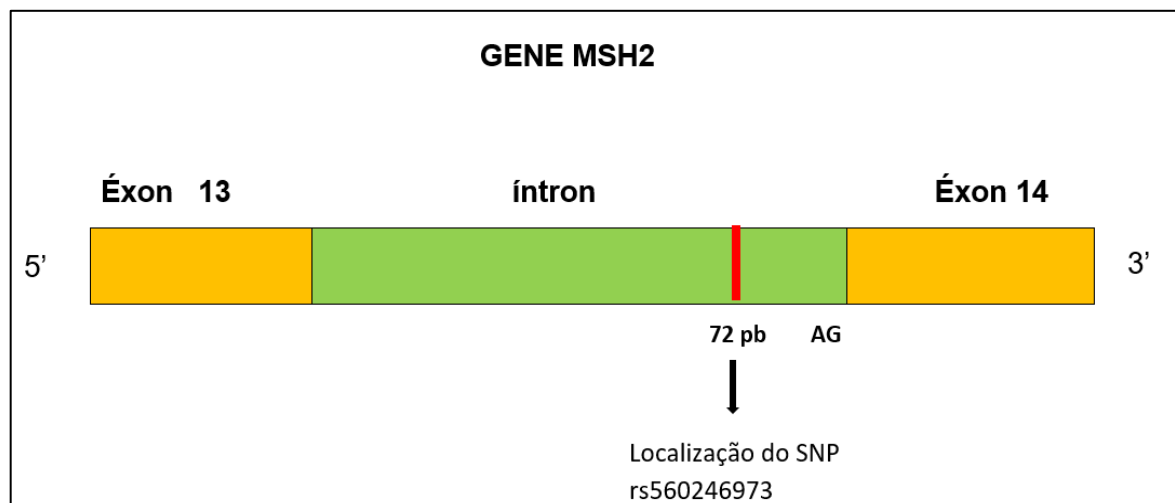
É importante salientar que SNPs em genes MMR principalmente em *MSH2* podem levar a inativação de proteínas de MSH2, sendo um fato relevante para o desenvolvimento de tumores.

Pereira et al. (2013) revelaram uma significativa redução da expressão da proteína MSH2 em células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço, demonstrando que essa baixa expressão está associada a um menor tempo de vida do indivíduo que é relevante para considerá-la como um forte indicador da progressão do tumor.

a) SNP rs560246973 (T>C)

O SNP rs560246973 também está localizado no limite íntron/éxon do gene *MSH2* próximo de um sítio de processamento 3' com 72 pares de bases a montante do éxon 14 (SHERRY et al., 2001) (Figura 9).

Figura 9- Localização do SNP rs560246973 no limite éxon-íntron do gene *MSH2*.

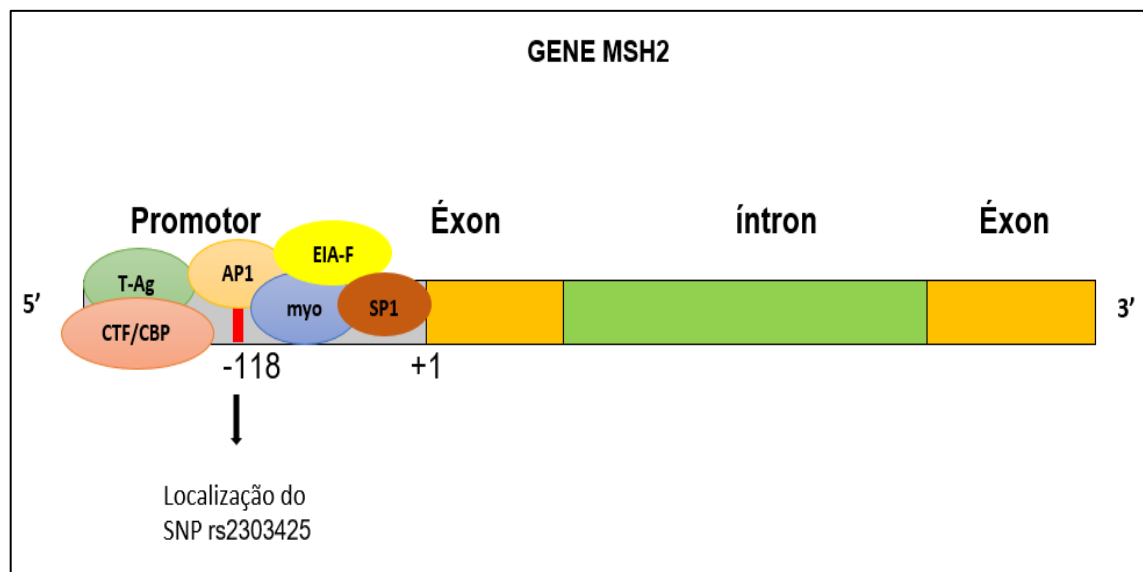


Fonte: Elaborada pela autora.

b) SNP rs2303425 (-118 T>C)

O SNP rs2303425 está localizado na região promotora do gene *MSH2* (Figura 10), 118 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição, mais especificamente em uma região relevante para a ligação de fatores de transcrição (MRKONJIC et al., 2007).

Figura 10- Região promotora do gene *MSH2* e os diferentes fatores de transcrição associados.



Fonte: Elaborada pela autora.

Segundo Bansidhar; Silinsky (2012), o gene *MSH2* pode sofrer inativação tanto por alterações epigenéticas como mutações gênicas na região promotora. Iwahashi et al. (1998) demonstraram que a região promotora do gene *MSH2* é composta por 298 pb, no qual apresenta elementos de ativação em cis que servem como sítios de ligação para diferentes fatores de transcrição.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a genotipagem dos SNPs rs560246973 (T>C), rs2303425 (-118 T>C) no gene *MSH2* e rs565410865 (G>T) no gene *MLH1*, em amostras de tecido parafinado de pacientes diagnosticados com carcinoma basocelular.

2.2 Objetivos Específicos

1 - Estabelecer a frequência alélica dos SNPs rs560246973(T>C), rs565410865(G>T), rs2303425 (-118 T>C) 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/Patologia Ivan Rodrigues/ João Pessoa - PB, com diagnóstico histopatológico de Carcinoma Basocelular e informações sobre sexo, 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 pacientes com carcinoma basocelular.

Amostra	Sexo	Idade	Localização anatômica	Tipo histopatológico
1	Masculino	66	Orelha	Nodular ulcerado
2	Masculino	65	Região molar	Nodular pigmentado
3	Feminino	78	Orelha	Nodular
4	Feminino	81	Nariz	Nodular ulcerado
5	Feminino	78	Sulco nasolabial	Nodular ulcerado
6	Masculino	78	Orelha	Nodular ulcerado
7	Feminino	57	Nariz	Esclerodermiforme
8	Masculino	83	Olho	Nodular pigmentado
9	Feminino	74	Orelha	Nodular
10	Feminino	78	Nariz	Nodular pigmentado
11	Masculino	70	Orelha	Nodular
12	Feminino	53	Nariz	Nodular basoescamoso
13	Masculino	85	Nariz	Superficial
14	Feminino	74	Região Molar	Nodular pigmentado
15	Feminino	57	Região maxilar	Infiltrante
16	Masculino	51	Ombro	Nodular
17	Masculino	78	Joelho	Nodular
18	Feminino	63	Dorso do nariz	Nodular

19	Masculino	78	Ponta Nasal	Nodular
20	Masculino	53	Olho	Nodular
21	Masculino	92	Região molar	Nodular, ulcerado
22	Feminino	82	Nariz	Nodular pigmentado
23	Feminino	72	Nariz	Nodular
24	Feminino	58	Nariz	Superficial multifocal
25	Feminino	68	Nariz	Nodular
26	Masculino	45	Ombro	Superficial multifocal
27	Feminino	58	Sulco nasolabial	Nodular
28	Feminino	58	Nariz	Nodular
29	Masculino	81	Abdôme	Nodular
30	Masculino	77	Orelha	Ulcerado
31	Masculino	70	Nariz	Nodular
32	Masculino	77	Nariz	Ulcerado
33	Feminino	80	Pescoço	Nodular
34	Masculino	54	Lábio superior	Nodular
35	Feminino	66	Região retro-auricular	Nodular
36	Feminino	69	Dorso Nasal	Nodular
37	Feminino	62	Olho	Nodular, pigmentado
38	Masculino	54	Nariz	Nodular
39	Feminino	71	Olho	Nodular
40	Masculino	62	Face	Nodular
41	Feminino	67	Dorso nasal	Nodular
42	Feminino	72	Nariz	Nodular
43	Masculino	33	Frontal	Nodular pigmentado
44	Masculino	36	Nariz	Nodular ulcerado
45	Feminino	38	Torax	Superficial
46	Feminino	72	Face	Nodular
47	Masculino	71	Mão	Nodular
48	Feminino	58	Região molar	Nodular
49	Masculino	54	Antebraço	Nodular ulcerado
50	Feminino	77	Região pré-auricular	Nodular ulcerado
51	Feminino	75	Nariz	Nodular
52	Feminino	63	Face	Nodular
53	Masculino	54	Ombro	Nodular ulcerado
54	Feminino	57	Nariz	Nodular
55	Feminino	77	Nariz	Nodular
56	Feminino	65	Órbita	Nodular
57	Feminino	65	Região frontal	Nodular
58	Masculino	85	Nariz	Nodular
59	Masculino	51	Região peitoral	Nodular
60	Feminino	68	Mento esquerdo	Nodular
61	Masculino	63	Região cervical Frontal-temporal	Nodular ulcerado
62	Masculino	60		Nodular
63	Masculino	69	Pescoço	Nodular ulcerado

64	Feminino	66	Nariz	Nodular
65	Masculino	88	Olho	Nodular
66	Masculino	88	Torax	Nodular
67	Feminino	52	Nariz	Nodular
68	Masculino	88	Nariz	Nodular
69	Feminino	67	Região periorbital	Nodular ulcerado
70	Feminino	83	Nariz	Nodular
71	Masculino	43	Fúrcula esternal	Superficial multifocal
72	Masculino	43	Regiãofrontal	Superficial multifocal
73	Masculino	43	Pescoço	Superficial multifocal
74	Masculino	43	Ombro	Superficial multifocal
75	Feminino	83	Nariz	Nodular
76	Feminino	63	Região periorbita	Nodular esclerodermiforme
77	Feminino	78	Temporal	Nodula ulcerado
78	Masculino	58	Ombro	Nodular ulcerado
79	Masculino	53	Ombro	Superficial
80	Masculino	53	Pescoço	Superficial
81	Masculino	72	Região mandibular	Nodular
82	Feminino	55	Nariz	Nodular
83	Masculino	62	Nariz	Esclerodermiforme
84	Masculino	69	Região zigomática	Nodular
85	Feminino	68	Região temporal	Nodular
86	Masculino	83	Antebraço	Superficial
87	Masculino	59	Região molar	Nodular
88	Feminino	69	Região frontal	Nodular pigmentado
89	Feminino	76	Lábio superior	Nodular
90	Feminino	67	Face	Nodular
91	Masculino	70	Nariz	Nodular
92	Masculino	79	Nariz	Nodularpigmentado
93	Masculino	83	Antebraço	Superficial
94	Feminino	67	Face	Nodular
95	Feminino	41	Região peitoral	Nodular
96	Feminino	52	Região molar	Nodular
97	Feminino	57	Nariz	Nodular
98	Masculino	78	Nariz	Nodular ulcerado
99	Masculino	58	Nariz	Nodular
100	Feminino	76	Lábio superior	Nodular

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Biologia Molecular

3.3.1 Extração do DNA

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

As amostras de tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA segundo Shi et al. (2002) com modificações. Foram utilizados de 5 a 8 cortes histológicos com 3µm 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 Shi et al. (2002), após o processo de lavagem por xilol e as amostras secas, foram adicionados 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 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 transferido para outro microtubo de centrífuga, onde foram adicionados 1,5mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Este microtubo 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 absoluto refrigerado e realizada a centrifugação a 10.000 RPM por 5 minutos. O DNA foi desidratado em estufa a 60°C. Após a secagem o DNA 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 no trabalho foi o método de genotipagem Dideoxi Único Alelo Específico PCR (Dideoxy single allele-specific PCR- DSASP) desenvolvida por Lima et al (2015). Para genotipagem dos SNPs do gene MLH1 (rs565410865) e do gene MSH2

(rs560246973 e rs2303425) foram desenhados iniciadores e sequências complementares em regiões intrônicas e promotora dos respectivos genes (Quadro 1).

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/nucore/>; <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>).

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

Gene	SNPs	Iniciadores/ Sequências complementares
MIH1	rs565410865	5'CTTTGCTTACTTGGTGTCTCTAGTTCTGG 3' 5'CAGGMACCAGAACTAGAGACACCAAGTAAGCAAAG3"
MSH2	rs560246973	5'AATCCATTATGTTTGTGGCRTATCCTTCCC 3' 5'GACRATACATTGGGAAGGATAYGCCACAAACATAATG GTT 3'
MSH2	rs2303425	5'ACCCWCSKAAACSCAGCCCTGGAAGC3' 5'KACCAYAYCMARTCAGCTTCCAGGGCTGSGTTTMSG WGGGT3'

Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.3 Método Didesoxi Único Alelo Específico PCR (*Dideoxy Single Allele-Specific PCR- DSASP*)

O método DSASP se apresenta como procedimento de genotipagem e consiste em desenhar o iniciador e sequencia complementares específicos, o método apresenta alta sensibilidade e pode ser usada para qualquer polimorfismo de base única (LIMA et al., 2015).

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 T_m diferentes; cada fragmento ou T_m corresponde ao seu alelo específico, o que permite a discriminação do alelo.

3.3.3.1. O método DSASP e suas condições

a) As condições da PCR assimétrica

Para detecção dos SNPs do gene MLH1 (rs565410865) e do gene MSH2 (rs560246973 e rs2303425) foram utilizados protocolos de PCR assimétrica em que se obteve melhores resultados para análise. As condições necessárias para a PCR assimétrica e amplificação das sequências de interesse dos genes MLH1 e MSH2 estão resumidas a seguir (Quadro 2).

Quadro 2- Protocolos para PCR assimétrica e amplificação dos SNPs nos genes MLH1 e MSH2.

GENE	PCR	MLH1	MSH2	MSH2
SNPs		rs565410865	rs560246973	rs2303425
Preparo da Reação	H ₂ O	14ul	14ul	15,5ul
	Tampão	10 X	10 X	10 X
	MgCl ₂	2mM	2mM	2mM
	dNTP+ddNTP	4ul	4ul	3ul
	Iniciador	1,5ul	1,5 ul	2ul
	Taq DNA polimerase	1U	1U	1U
	DNA	400ng/ul	400ng/ul	200ng/ul
	Volume final da reação	25ul	25ul	25ul

Fonte: Elaborado pela autora.

No método DSASP a PCR é assimétrica, ou seja, usa-se apenas um primer para amplificar apenas uma fita correspondente ao fragmento de interesse, desta forma foi necessário logo após a amplificação, fazer a hibridização com uma sequência complementar. Assim, para todas os SNPs as condições da PCR assimétrica foram as seguintes: Pré-desnaturação durante 2 minutos a 94°C e 100 ciclos de desnaturação durante 10 segundos a 94°C, anelamento por 40 segundos a 55°C, extensão durante 15 segundos a 72°C com uma última extensão de 2 minutos a 72°C e temperatura de conservação de 12°C constante.

b) As condições de hibridização

O produto da amplificação por PCR assimétrica de cada amostra foi submetido ao protocolo de hibridização sob as seguintes condições: 200pM da sequência complementar (Quadro 1), 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 Análises estatísticas

Nas amostras de Carcinoma Basocelular foram calculadas as frequências alélicas e testadas segundo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dessa forma, o equilíbrio 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

4.1 Dados demográficos e histopatológicos

Quando analisada a associação dos genótipos encontrados para o SNP rs560246973 (C>T) no gene *MSH2* e as variáveis gênero, faixa etária, localização anatômica da neoplasia e tipos histopatológicos, observou-se que não houve nenhuma significância estatística (Tabela 3). No entanto em relação aos genótipos encontrados para o SNP rs565410865 (G>T) no gene *MLH1* houve significância estatística para as variáveis faixa etária ($p=0,0027$) e localização anatômica ($p=0,0191$) (Tabela 4).

Tabela 3 - Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs560246973 (T>C) e susceptibilidade ao CBC.

MSH2 rs560246973 (T>C)					
Variável	Total	Genótipo TT	Genótipo TC	Genótipo CC	p valor
Gênero					
Feminino	51 (51%)	41(80%)	0 (0%)	10 (20%)	0,6328
Masculino	49 (49%)	37 (75%)	0 (0%)	12 (25%)	
Faixa etária					
30-50	9 (9%)	6 (67%)	0 (0%)	3 (33%)	0,2571
50-70	49 (49%)	36 (73%)	0 (0%)	13 (27%)	
70-90	42 (42%)	36 (86%)	0 (0%)	6 (14%)	
Localização anatômica					
Cabeça e pescoço	84 (84%)	66 (79%)	0 (0%)	18 (21%)	0,9195
Tronco	11 (11%)	8 (73%)	0 (0%)	3 (27%)	
Membros superiores	4 (4%)	3 (75%)	0(0%)	1(25%)	
Membros inferiores	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	

Tipos histopatológicos					
Nodular	83 (83%)	64 (77%)	0 (0%)	19 (23%)	0,8246
Esclerodermiforme	2 (2%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Superficial	12 (12%)	9 (75%)	0 (0%)	3 (25%)	
Infiltrante	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ulcerado	2 (2%)	2 (100%)	0(0%)	0 (0%)	

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4- Dados demográficos e histopatológicos associados com a variação genotípica do SNP rs565410865 (G>T) e susceptibilidade ao CBC.

MLH1 rs565410865 (G>T)					
Variável	Total	Genótipo GG	Genótipo GT	Genótipo TT	p valor
Gênero					
Feminino	51(51%)	41 (80%)	0 (0%)	10 (20%)	p 0,4157
Masculino	49(49%)	43 (88%)	0 (0%)	6 (12%)	
Faixa etária					
30-50	9 (9%)	4 (44%)	0 (0%)	5 (56%)	p 0,0027
50-70	49(49%)	44 (90%)	0 (0%)	5 (10%)	
70-90	42(42%)	36 (86%)	0 (0%)	6 (14%)	
Localização anatômica					
Cabeça e pescoço	84(84%)	73 (87%)	0 (0%)	11 (13%)	p 0,0191
Tronco	11 (11%)	7 (64%)	0 (0%)	4 (36%)	
Membros superiores	4 (4%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Membros inferiores	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	

Tipos histopatológicos					p 0,4363
	83				
Nodular	(83%)	71 (86%)	0 (0%)	12 (14%)	
Esclerodermiforme	2 (2%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
	12				
Superficial	(12%)	8 (67%)	0 (0%)	4 (33%)	
Infiltrante	1 (1%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ulcerado	2 (2%)	2 (100%)	0 (0%)	0(0%)	

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Associação dos SNPs nos genes *MSH1* e *MSH2* com o risco de CBC

O papel da influência de SNPs em genes *MSH2* (rs560246973 e rs2303425) e *MLH1* (rs565410865) no desenvolvimento do carcinoma basocelular ainda é desconhecido. Assim, no presente trabalho foram estabelecidas e analisadas as frequências alélicas e genótípicas dos referidos SNPs, segundo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5).

Este trabalho é o primeiro estudo com a finalidade de avaliar a associação dos SNPs rs560246973 e rs2303425 no gene *MSH2* e o rs565410865 no gene *MLH1* com a susceptibilidade ao desenvolvimento de carcinoma basocelular no estado da Paraíba e na literatura especializada.

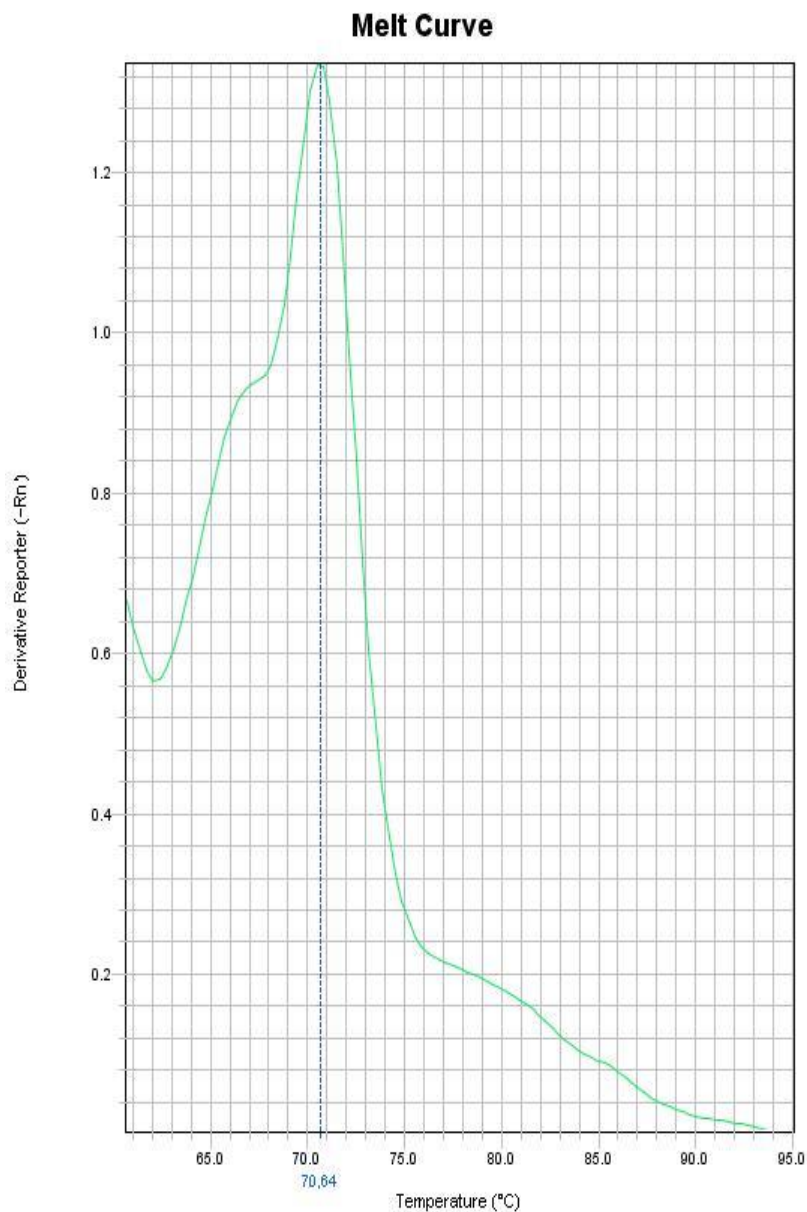
Tabela 5- Distribuição alélica e genotípica de SNPs nos genes *MLH1* e *MSH2* em indivíduos com CBC.

Gene/SNPs		Genótipos		Frequência alélica		X ²	p-valor
MSH2							
rs560246973	TT	TC	CC	T	C	96,16	0,0001
	78 (78%)	0 (0%)	22 (22%)	0,78	0,22		
MLH1							
rs565410865	GG	GT	TT	G	T	97,44	0,0001
	84 (84%)	0 (0%)	16 (16%)	0,84	0,16		
MSH2							
rs2303425	CC	CT	TT	C	T	0,97	0,62
	82 (82%)	18(18%)	0 (0%)	0,91	0,09		

Fonte: Elaborada pela autora.

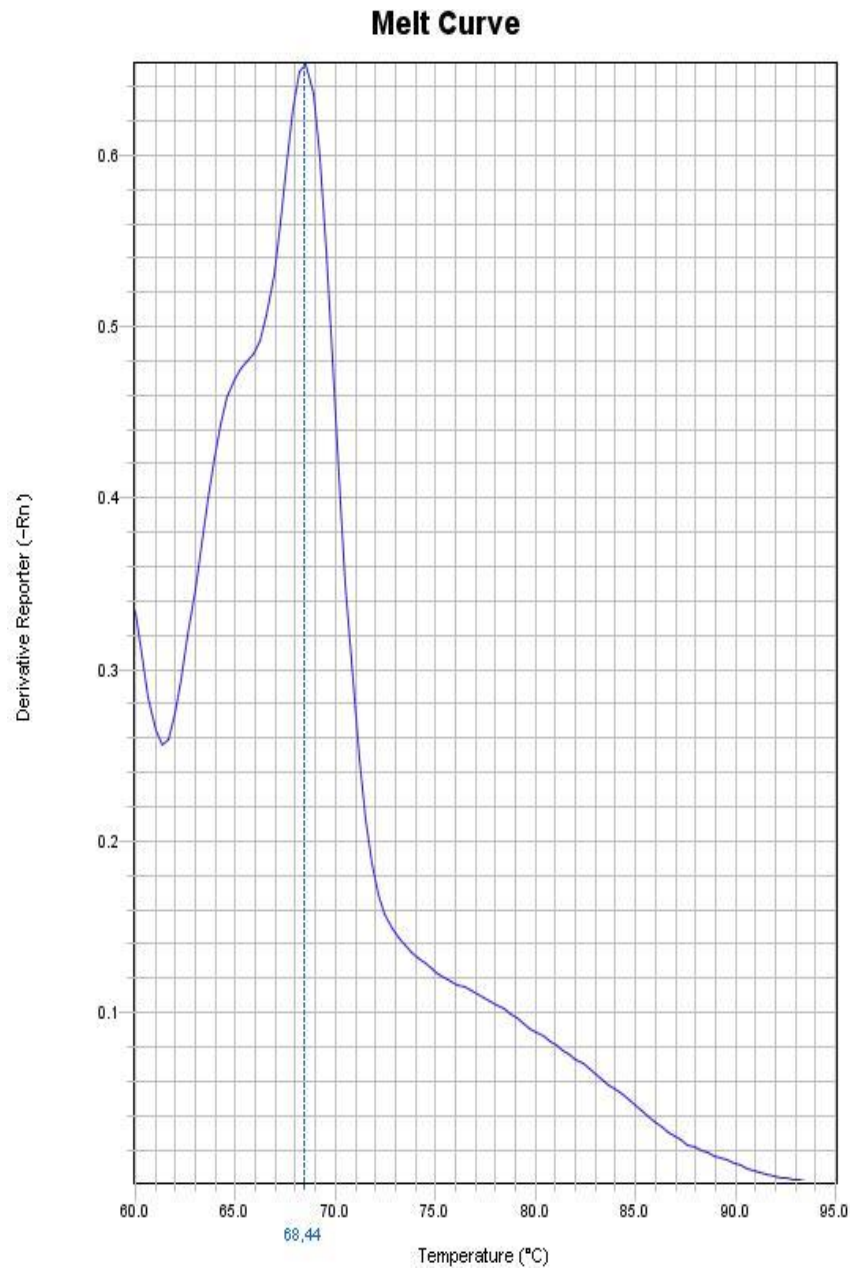
A frequência alélica do SNP rs560246973 no gene MSH2 obtido pelo DSASP foi de 0,78 e 0,22 para o alelo T e C, respectivamente. Com a seguinte distribuição genotípica: 78% (n=78) T/T, 22% (n=22) CC e 0% (n=0) CT. Observou-se uma temperatura de Melting de 70,64 °C para o alelo T (Figura 11) e 68,44 °C para o alelo C (Figura 12).

Figura 11- Curva de melting representando o genótipo T/T do SNP rs560246973 do gene *MSH2*.



Fonte: Equipamento de PCR em real tempo- 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies - Carlsbad, CA).

Figura 12- Curva de melting representando o genótipo C/C do SNP rs560246973 do gene MSH2.

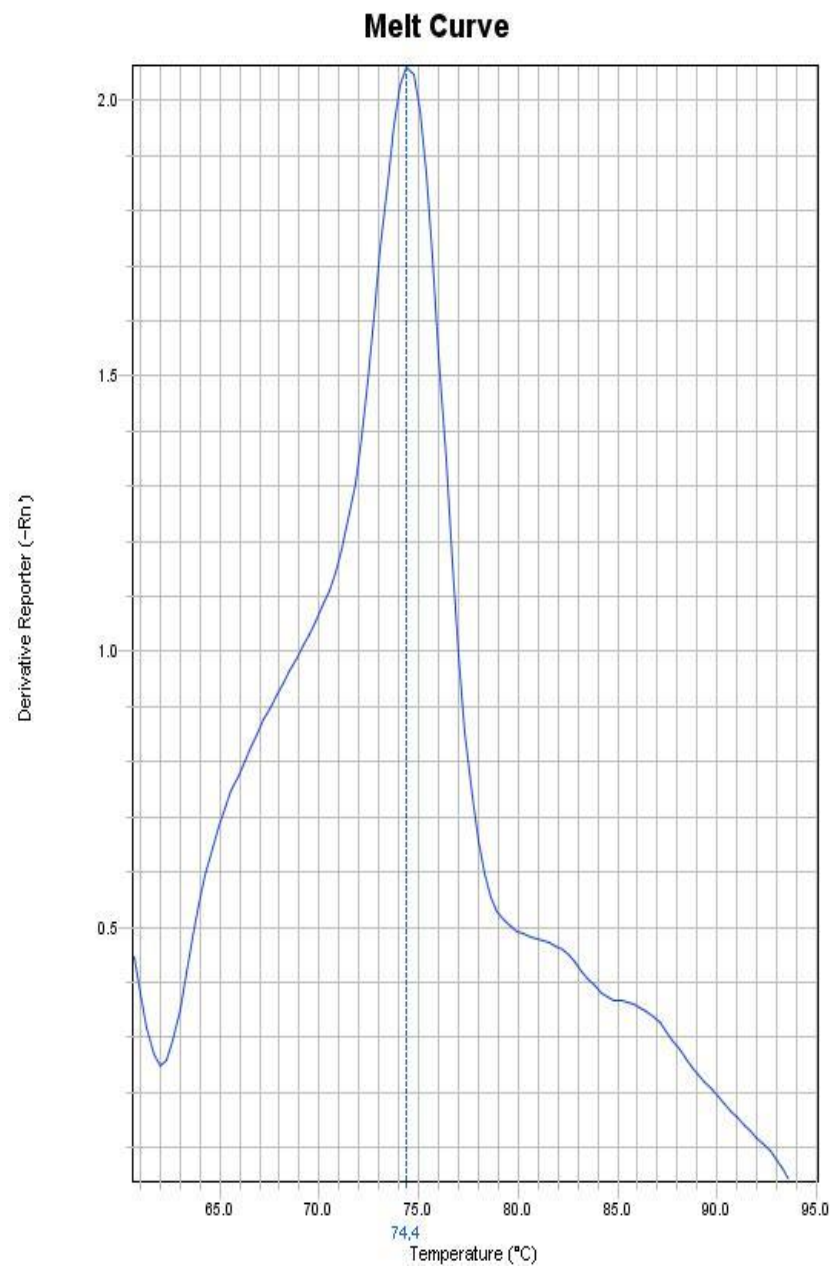


Fonte: Equipamento de PCR em real tempo- 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies - Carlsbad, CA).

Comparando as frequências genótípicas observadas e esperadas para o SNP rs560246973 (T>C), foi observado que a nossa população amostral não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo $\chi^2 = 96,16$ apresentando $P \leq 0,0001$. Assim, o resultado sugere que o referido SNP no gene MSH2 está associado com a susceptibilidade ao risco desenvolver CBC.

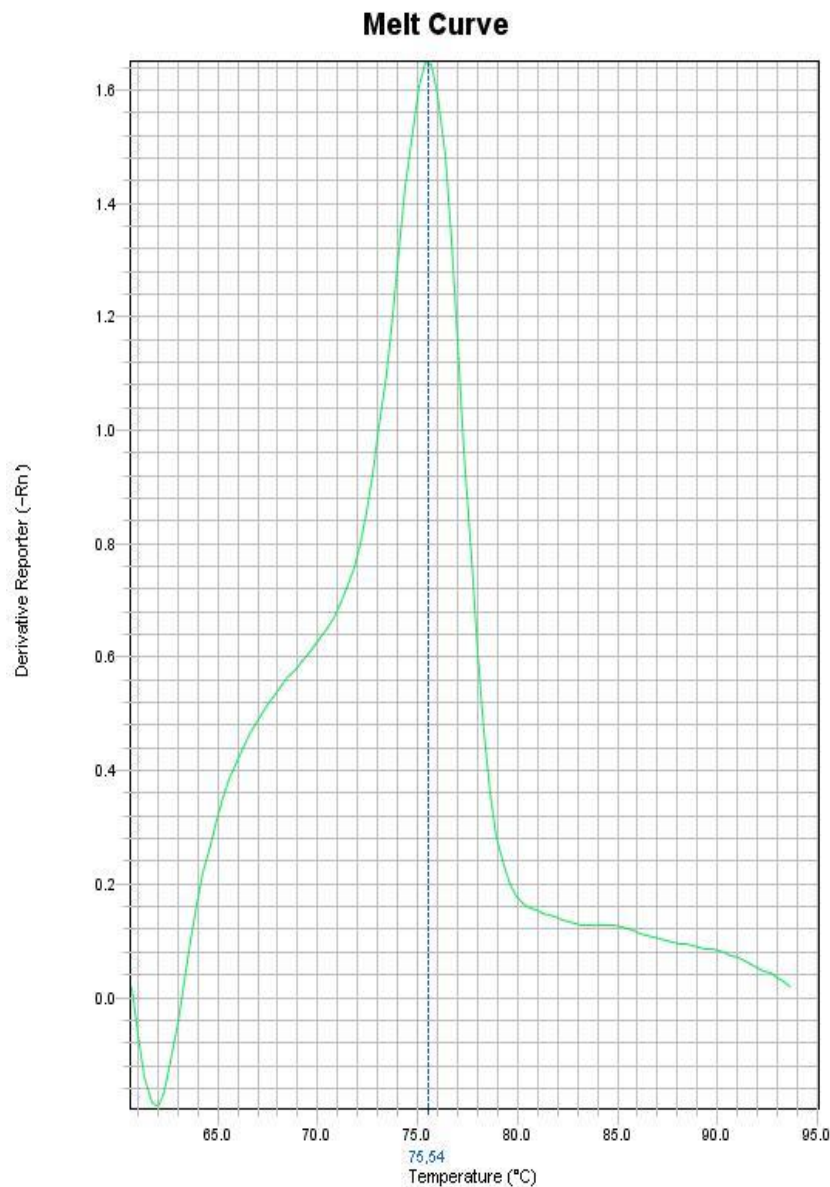
Na genotipagem do SNP rs565410865 no gene MLH1, obtendo-se frequências alélicas de 0,84 para o alelo G e 0,16 para o alelo T, com a seguinte distribuição genotípica: 84% (n=84) G/G, 16% (n=16) T/T e 0% (n=0) G/T. Quanto a análise da curva de melting, observou-se temperaturas de 74,4 °C (Figura 13) para o alelo G e 75,54 °C para o alelo T (Figura 14).

Figura 13- Curva de melting representando o genótipo G/G do SNP rs565410865 do gene MLH1.



Fonte: Equipamento de PCR em real tempo- 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies - Carlsbad, CA).

Figura 14- Curva de melting representando o genótipo T/T do SNP rs565410865 do gene MLH1.

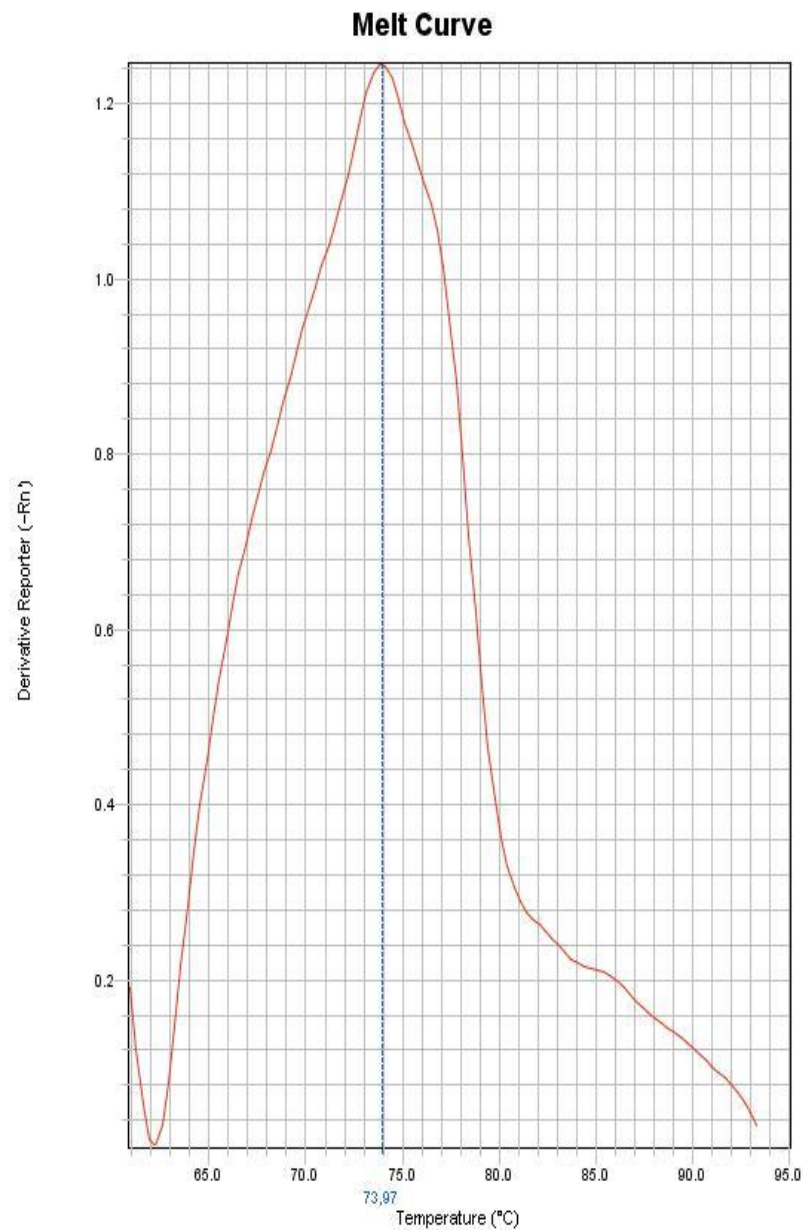


Fonte: Equipamento de PCR em real tempo- 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies - Carlsbad, CA).

Ao analisar as frequências genotípicas observadas e esperadas para o SNP rs565410865, foi demonstrado que a nossa população amostral não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), pois o resultado foi estatisticamente significativo, uma vez que $\chi^2 = 97,44$ apresentando $P \leq 0,05$, ou seja, a variante alélica no gene MLH1, pode estar associada com o aumento do risco para o desenvolvimento de CBC.

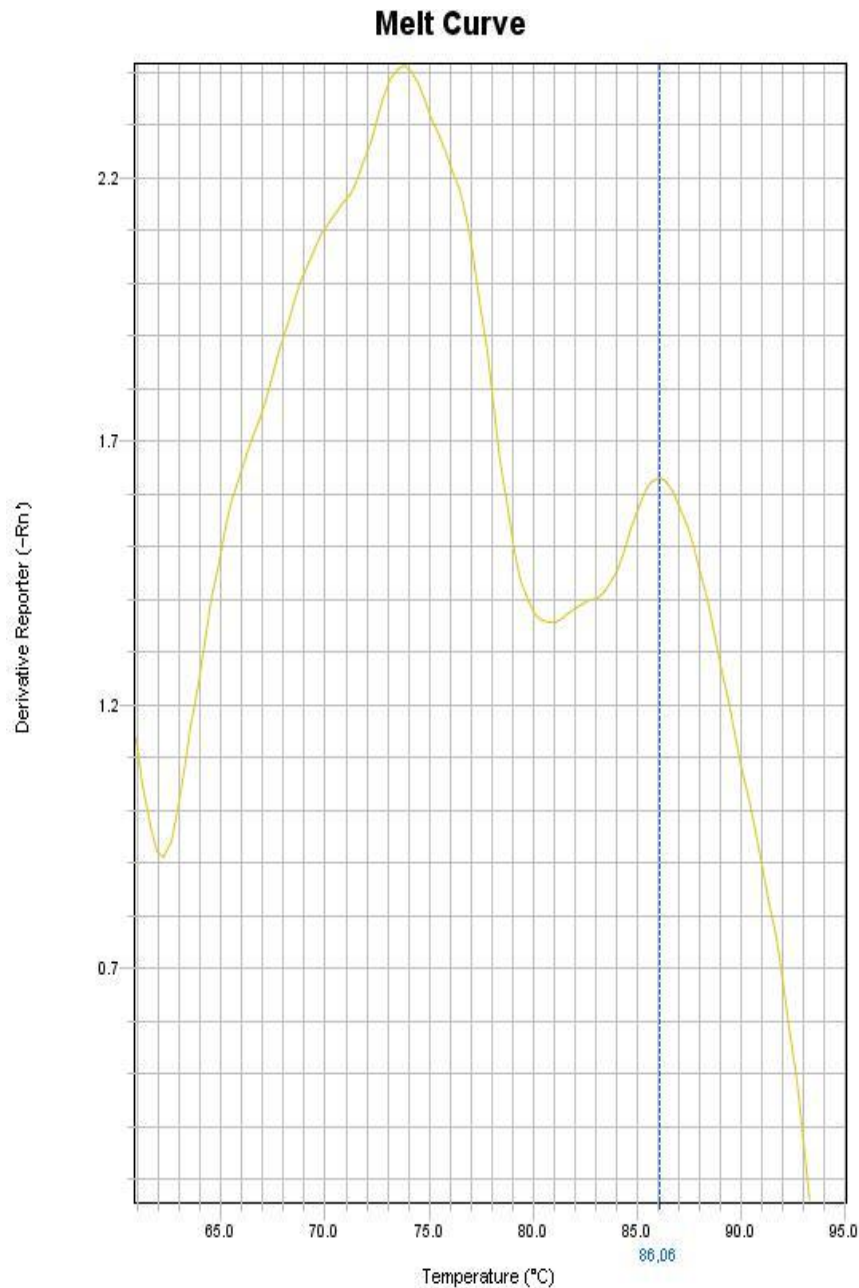
Assim como os SNPs citados acima, a genotipagem do SNP rs2303425 (-118T>C) presente no gene MSH2, foi realizada pelo o método DSASP, na qual obteve-se frequência alélica de 0,91 e 0,09 para o alelo C e T respectivamente, com a seguinte distribuição genotípica: 82% (n=82) C/C, 18 % (n=18) C/T e 0,0% (n=0) T/T. Observou-se uma temperatura de melting de 73,97 °C para o alelo C (Figura 15) e 86,06 °C para o alelo T (Figura 16).

Figura 15- Curva de melting representando o genótipo C/C do SNP rs2303425 do gene MSH2.



Fonte: Equipamento de PCR em real tempo- 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies - Carlsbad, CA)

Figura 16- Curva de melting representando o genótipo C/T do SNP rs2303425 do gene MSH2.



Fonte: Equipamento de PCR em real tempo- 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies - Carlsbad, CA).

O polimorfismo rs2303425 (-118 T>C), segundo análises estatísticas da população amostral, o mesmo se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), uma vez que o qui-quadrado foi de $\chi^2 = 0,97$ e $P > 0,05$, portanto a variante alélica no gene *MSH2* de acordo com o presente resultado, não está associada com o aumento do risco para o desenvolvimento de CBC nas amostras analisadas.

5 DISCUSSÃO

O reparo do material genético é primordial para a manutenção e estabilidade do genoma, contribuindo para manter a homeostase celular. A mais comum variação genética são os SNPs com prevalência de aproximadamente 4,5 milhões, distribuídos por todo o genoma, tanto em regiões codificantes como não codificantes do gene, podendo causar efeitos silenciosos, inofensivos ou nocivos (MAHDI; NASSIRI; NASIRI, 2013).

Alterações na sequência do DNA como a substituição de um único nucleotídeo dentro de sequências de genes que codificam proteínas que participam na via MMR ou até mesmo em regiões de íntron, principalmente de genes *MLH1* e *MSH2* pode ter um importante papel patogênico, com um possível fenótipo tumoral uma vez que pode afetar a função normal da proteína (BIANCHI et al., 2011; SMOLARZ et al., 2014).

A realização de estudos para analisar associação de SNPs à susceptibilidade ao CBC é de grande relevância em genes de reparo da via MMR, uma vez que não há estudos anteriores com a população brasileira, principalmente na região nordeste onde ocorre incidência de RUV elevada. O presente estudo analisou os SNPs rs565410865 no gene *MLH1* e rs560246973, rs2303425 no gene *MSH2* que estão envolvidos com a susceptibilidade do CBC.

Estudos indicam uma discreta prevalência de CBC em homens (WU et al., 2013). No presente estudo, a diferença entre os gêneros não foi tão relevante, no entanto houve um maior número de casos do sexo feminino, corroborando com estudo realizado por Benedet et al. (2007). É provável que este fato esteja relacionado com a influência de cuidados com a beleza como a utilização de câmaras de bronzeamento artificial e a exposição exagerada a radiação solar em períodos de lazer (BONIO et al., 2012).

Com relação à associação dos SNPs rs560246973 e rs565410865 do gene *MSH2* à susceptibilidade ao CBC em relação ao gênero, não foi estatisticamente significativa, sugerindo que outros fatores como a localização geográfica da Paraíba contribuem para um nível elevado e uniforme de RUV, portanto, um fator de risco semelhante tanto para homens como mulheres.

A faixa etária mais acometida foi entre 50 a 70 anos de idade, apoiando estudos anteriores (CUSTÓDIO et al., 2010; ZARGARAN et al., 2013). Este fato pode ser explicado pelo o

envelhecimento que resulta em maior tempo de exposição à radiação solar e outros fatores de riscos como substâncias carcinogênicas, que podem diminuir a eficiência do sistema de reparo do DNA ao longo do tempo e consequentemente contribuir para o desenvolvimento do CBC (PAN et al., 2016). De acordo com Cahoon et al. (2015) o risco de desenvolver CBC entre mulheres com esta faixa etária pode estar associado a menopausa e consequentemente o uso de terapia hormonal.

Considerando a associação dos genótipos encontrados para o SNP rs565410865 (G>T) com a faixa etária, foi observado que indivíduos homozigotos para o alelo G e com faixa etária entre 50 a 90 anos, tinham maior risco de desenvolver CBC, portanto mais uma evidência do que foi discutido.

Segundo Puig e Berrocal (2015), as lesões na cabeça e pescoço são mais frequentes, o mesmo resultado obtido no presente estudo, no qual verificou-se que 84% tinham localização anatômica na cabeça e pescoço, sendo o genótipo G/G para o SNP rs565410865 (G>T) significativamente associadas com a susceptibilidade ao CBC. Sugere-se que além da influência do genótipo ser o mais frequente na população, estas são áreas mais expostas do corpo e consequentemente recebem uma maior intensidade de RUV.

No Brasil há uma grande miscigenação entre ameríndios, europeus e africanos, sendo a população paraibana resultado dessa ancestralidade (PENA et al; 2011), que pode resultar em estratificação populacional, com possível deficiência de heterozigotos como é observado no presente estudo.

Gonçalves et al. (2011) em um estudo de caso-controle observaram uma associação significativa entre fatores como ancestralidade e fenótipo europeu com polimorfismo intrônico no gene XPC na susceptibilidade ao melanoma em regiões com alto índice de RUV no Brasil.

Quanto aos subtipos, os mais prevalentes foram o nodular 83% seguido do superficial 12%, corroborando com dados de Yap (2010). De acordo com Wu et al. (2014) a carcinogênese para o desenvolvimento de CBC nodular requer um maior tempo de exposição à radiação solar do que o CBC superficial.

Indivíduos portadores de mutações gênicas principalmente SNPs em genes de reparo por mal pareamento apresentam uma maior susceptibilidade a desenvolver cânceres, principalmente os de origem epitelial (PETERSEN et al; 2013). Isto foi evidente no estudo

realizado por Talseth-Palmer et al. (2016), no qual avaliaram variações genéticas em regiões de éxons e íntrons de genes envolvidos na via MMR, demonstrando que além de alguns pacientes apresentarem câncer endometrial, também foram diagnosticados com outros cânceres, como câncer de ovário, pele, mama e colorretal.

No presente estudo foi encontrada associação significativa para os SNPs rs565410865 no gene *MLH1* e SNP rs560246973 no gene *MSH2* com o risco de desenvolver CBC, ambos localizados no limite éxon íntron, enquanto que o SNP rs2303425 no promotor do gene *MSH2* não apresentou associação significativa.

Os resultados apresentados corroboram com Langerberg et al. (2010) em um estudo de base populacional, analisando 1.457 casos diagnosticados entre 1993 a 2005, demonstram significativa associação do SNP rs9852810 (G>A), localizado em uma região de íntron do gene *MLH1*, com o risco moderado no desenvolvimento de câncer de próstata.

Zahary et al. (2012) relataram uma significativa diminuição na expressão da proteína *MSH2*, consequentemente associada com uma mutação em um sítio de *splicing*, que pode resultar no comprometimento do éxon 13, região mais conservada do gene *MSH2*.

Apesar dos SNPs rs560246973 no gene *MSH2* e o SNP rs565410865 no gene *MLH1*, estarem associados com o desenvolvimento de CBC em nossa população amostral, estes não podem ser ainda considerados marcadores moleculares, pois são necessários mais estudos. Além disso, os SNPs em questão podem se correlacionar com outras variantes próximas e provavelmente estarem segregando em conjunto em eventos de recombinação durante a meiose.

Os SNPs são mutações que tanto podem afetar o processamento, como podem ser responsáveis por alterações na sequência de DNA, com consequências a nível do códon, modificando um aminoácido específico que talvez possa ser de extrema importância para a estabilização da estrutura proteica, como também interferir na regulação da transcrição do mRNA quando localizado na região promotora do gene.

O SNP rs2303425 (-118 T>C) não foi encontrado associação com o risco de desenvolver CBC, este resultado corrobora com um estudo realizado por Srivastava e Mitta (2010), que avaliaram a associação de polimorfismos em genes de reparo em 230 pacientes do norte da Índia com o desenvolvimento de carcinoma de vesícula biliar e demonstraram que não houve associação significativa do SNP rs2303425 com o desenvolvimento da carcinogênese.

Um outro estudo de caso-controle realizado por Xião et al. (2012), com 554 pacientes histopatologicamente confirmados com câncer gástrico e 592 controles na população chinesa, não foi observado a associação do SNP rs2303245 com o desenvolvimento de câncer gástrico.

Entretanto Hsieh et al. (2016) demonstraram que indivíduos com o genótipo C/C rs23032425 apresentaram um risco aumentado de câncer de mama, bem como diminuição da expressão de MSH2 em comparação com os genótipos T/T, sugerindo diminuição na atividade do promotor, ao ponto de o mesmo poder ser considerado um bom marcador genético de diagnóstico de câncer de mama para a população asiática.

Uma possível explicação para associação do SNP rs2303425 apenas com câncer de mama é o fato do mesmo estar localizado em um sítio de ligação do fator de transcrição NF-Y, este é um potente elemento regulador de estrógeno, onde o alelo C cria um sítio de ligação ao fator AP1 que é ativado por antiestrogênicos, que podem alterar a capacidade de resposta do promotor *MSH2* ao estrógeno e diminuir a atividade do MMR nas células endometriais (DAHLMAN-WRIGHT et al. 2012; LEE et al. 2006; MIYAMOTO et al. 2006; MRKONJIC et al., 2007).

Os resultados divergentes em relação ao SNP rs2303425 pode ser atribuídos a heterogeneidade étnica da população em estudo, uma vez que as frequências dos alelos polimórficos podem diferir em tumores de indivíduos com diferentes etnias, devido as interações gene-gene e interações gene-ambiente (TUNCA et al., 2010), como também é importante considerar que SNPs em outros genes que codificam proteínas essenciais envolvidas na via MMR, podem contribuir para a deficiência do reparo e consequentemente um fenótipo tumoral.

Talseth-Palmer et al. (2016), relata que variante intrônica no gene *Exo1*, localizada na extremidade 3' do intron 14, pode afetar o processamento do pré-mRNA, a proteína é de extrema importância, pois interage com MSH2, MSH3 e MLH1 estabilizando o complexo de proteínas do MMR. Bolderson et al. (2010) observaram que células deficientes de exonuclease 1 humana (*Exo1*) eram mais sensíveis a morte por radiação ionizante, ressaltando assim que a *Exo1* é necessária para o reparo do DNA.

Nogueira et al. (2015) analisou 450 amostras de pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, e demonstrou associação significativa da mutação c.1765G>A no EXO1 com o risco de desenvolver o câncer.

Portanto, outros estudos mais detalhados considerando genes chaves da via MMR e SNPs em proximidade aos que foram analisados, são necessários em diferentes populações para compreender melhor o papel dos SNPs nos genes *MLH1* e *MSH2* na susceptibilidade do carcinoma basocelular.

6 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que o SNPs rs565410865 (G>T) no gene *MLH1* está estatisticamente associado com o risco de desenvolver CBC, em indivíduos homozigotos para o alelo T com faixa etária entre 50 a 90 anos e com lesões na cabeça e pescoço. O SNP rs560246973 (T>C) está estatisticamente associado com o risco de desenvolver CBC em indivíduos homozigotos para o alelo C e o SNP rs2303425 (-118T>C) localizado na região promotora do gene *MSH2* não apresentou associação significativa.

Assim, o SNP rs565410865 (G>T) no gene *MLH1* e o SNP rs560246973 (C>T) no gene *MSH2* apresentaram associação estatisticamente significativa à susceptibilidade ao risco de desenvolver CBC, nas amostras analisadas obtidas no Estado da Paraíba. Sugerindo assim seu possível uso como marcadores moleculares envolvidos na carcinogênese do CBC.

REFERÊNCIAS

- BANSIDHAR, B. J.; SILINSKY, J. History and pathogenesis of lynch syndrome. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, v. 25, n. 2, p. 63–66, 2012.
- BAYLIN, S. B. et al. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. **Cancer research**, v. 46, n. 6, p. 2917-2922, 1986.
- BENEDET, L. et al. Avaliação clínica e histopatológica dos pacientes portadores de carcinoma basocelular diagnosticados no instituto de diagnóstico anátomo-patológico em Florianópolis – SC de janeiro a fevereiro de 2004. **Medicina**, v. 36, p. 37–44, 2007.
- BERGER, M. F. E GERRAWAY, L. A Application of Genomics in Melanoma Oncogene Discovery. **Hemetol Oncol Cliin North Am**, v. 23 p.397-414, 2009.
- BIRCH-JOHANSEN, F. et al. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancer in Denmark 1978–2007: rapid incidence increase among young Danish women. **International journal of cancer**, v. 127, n. 9, p. 2190-2198, 2010.
- BONNIOL, M. et al. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis- Correction. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 345, n. jul24_2, p. e4757, 2012.
- BOLDERSON, E. et al. Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. **Nucleic Acids Research**, v. 38 n. 6. p. 1821-1831, 2010.
- BUDDEN, T.; BOWDEN, N. A. The role of altered nucleotide excision repair and UVB-induced DNA damage in melanomagenesis. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 1, p. 1132-1151, 2013.
- BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal stem cells of the skin. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 22, p. 339–373, 2006.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177–186, 1999.
- CAHOON, E. K. et al. Female estrogen-related factors and incidence of basal cell carcinoma in a nationwide us cohort. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 34, p. 4058–4065, 2015.
- CHANG, J.-M.; GAO, X.-M. Clinical and histopathological characteristics of basal cell carcinoma in Chinese patients. **Chinese medical journal**, v. 126, n. 2, p. 211–4, 2013.
- DAHLMAN-WRIGHT. et al. Interplay between AP-1 and estrogen receptor α in regulating

gene expression and proliferation networks in breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 9, p. 1684-1691, 2012.

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

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

DHERIN, C. et al. Characterization of a highly conserved binding site of Mlh1 required for exonuclease I-dependent mismatch repair. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 3, p. 907-918, 2009.

DESMET, F-O. et al. Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 9, p. 1–14, 2009.

DIZDAROGLU, M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in câncer. **Mutation Research**, v. 763, p. 212-245, 2015.

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

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

EDELBROCK, M. A.; KALIYAPERUMAL, S.; WILLIAMS, K. J. Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 743, p. 53-66, 2013.

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

ERIE, D. A.; WENINGER, K. R. Single molecule studies of DNA mismatch repair. **DNA Repair**, v. 20, p. 71-81, 2014.

FISHEL, R. et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 1027-1038, 1993.

FUKUHARA, S. et al. DNA mismatch repair gene MLH1 induces apoptosis in prostate cancer cells. **Oncotarget**, v. 5, n. 22, p. 11297, 2014.

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

GE, J. et al. The GSTP1 105Val Allele Increases Breast Cancer Risk and Aggressiveness but Enhances Response to Cyclophosphamide Chemotherapy in North China. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–9, 2013.

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

GONÇALVES, F. T. et al. European ancestry and polymorphisms in DNA repair genes modify the risk of melanoma: A case-control study in a high UV index region in Brazil. **Journal of Dermatological Science**, v. 64, n. 1, p. 59–66, 2011.

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

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

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

HAN, H-J. et al. Genomic structure of human mismatch repair gene, hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). **Human Molecular Genetics**, v. 4, n. 2, p. 237-242, 1995.

HINRICHSSEN, I. et al. Reduced migration of MLH1 deficient colon cancer cells depends on SPTAN1. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2014.

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

HSIEH, Y-C. et al. MSH2 rs2303425 Polymorphism is Associated with Early-Onset Breast Cancer in Taiwan. **Society of Surgical Oncology**, v.24 n.2 p.603-610, 2016.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

IWAHASHI, Y. et al. Promoter analysis of the human mismatch repair gene hMSH2. **Gene**, v. 213, n. 1–2, p. 141–147, 1998.

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

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

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

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

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

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

KOLODNER, R. D. et al. Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for msh2 mutations. **Genomics**, v. 24, n. 3, p. 516-526, 1994.

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

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

LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LANGEBERG, W. J. et al. Population-based study of the association of variants in mismatch repair genes with prostate cancer risk and outcomes. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 1, p. 258-264, 2010.

- LEANDRO, G. S.; SYKORA, P.; BOHR, V. A. The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 776, p. 31-39, 2015.
- LEWIN, J. M.; CARUCCI, J. A. Advances in the management of basal cell carcinoma. **F1000prime Reports**, v. 7, P.1-8, 2015.
- LI, G-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell research**, v. 18, n. 1, p. 85-98, 2008
- LIMA, E. M. et al. Dideoxy single allele-specific PCR-DSASP new method to discrimination allelic. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 3, p. 414-420, 2015.
- LICHTER, M. D. et al. Therapeutic ionizing radiation and the incidence of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. **Archives of Dermatology**, v. 136, n. 8, p. 1007-1011, 2000.
- LEE, R. W. et al. 17b-Estradiol (E2) Induces cdc25A Gene Expression in Breast Cancer Cells by Genomic and Non-Genomic Pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 1, p. 209-220, 2006.
- LOMAS, A.; LEONARDI-BEE, J.; BATH-HEXTALL, F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 5, p. 1069-1080, 2012.
- MARTIN, M. T.; VULIN, A.; HENDRY, J. H. Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 349-368, 2016.
- MADAN, V.; LEAR, J. T.; SZEIMIES, R-M. Non-melanoma skin cancer. **The Lancet**, v. 375, n. 9715, p. 673-685, 2010.
- MAHDI, K. M.; NASSIRI, M. R.; NASIRI, K. Hereditary Genes and SNPs Associated with Breast Cancer. **Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention**. Asia, p. 3.403-3.409. jun. 2013. Disponível em:
<[www.researchgate.net/publication/252323436_Hereditary_Genes_and_SNPs_Associated_w
ith_Breast_Cancer](http://www.researchgate.net/publication/252323436_Hereditary_Genes_and_SNPs_Associated_with_Breast_Cancer)>. Acesso em: 18 nov. 2016.
- MCDALD, J. R. et al. MLH1 mediates PARP-dependent cell death in response to the methylating agent N-methyl-N-nitrosourea. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 3, p. 441-451, 2009.

- MENDACOLLI, P. J. et al. Nuclear morphometry and chromatin textural characteristics of basal cell carcinoma. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 90, n. 6, p. 874-878, Dec. 2015. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036505962015000600874&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 25 julho de 2016.
- MENG, E. et al. The Impact of Hedgehog Signaling Pathway on DNA Repair Mechanisms in Human Cancer. **Cancers**, v. 7, n. 3, p. 1333-1348, 2015.
- MJELLE, R. et al. Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes. **DNA repair**, v. 30, p. 53-67, 2015.
- MIYAMOTO, T. et al. Estrogen up-regulates mismatch repair activity in normal and malignant endometrial glandular cells. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4863-4870, 2006.
- MODRICH, P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30305-30309, 2006.
- MOHAMMAD, E-A. et al. Assessment of clinical diagnostic accuracy compared with pathological diagnosis of basal cell carcinoma. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 6, n. 4, p. 258, 2015.
- MOHAN, S. V.; CHANG, A. L. S. Advanced basal cell carcinoma: epidemiology and therapeutic innovations. **Current dermatology reports**, v. 3, n. 1, p. 40-45, 2014.
- MRKONJIC, M. et al. MSH2– 118T> C and MSH6– 159C> T promoter polymorphisms and the risk of colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 12, p. 2575-2580, 2007.
- NIKOLAOU, V.; STRATIGOS, A. J.; TSAO, H. Hereditary Nonmelanoma Skin Cancer. **Semin Cutan Med Surg.**, v. 31, n. 4, p. 204–210, 2012.
- NOUBISSI, F. K. et al. Role of CRD-BP in the growth of human basal cell carcinoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 6, p. 1718-1724, 2014.
- OZGEDIZ, D. et al. Basal cell carcinoma does metastasize. **Dermatology online journal**, v. 14, n. 8, 2008.
- PAN, M.-R. et al. Connecting the Dots: From DNA Damage and Repair to Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 685, 2016.
- PAPADOPOULOS, N. et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. **Science**, v. 263, n. 5153, p. 1625-1629, 1994.

PENA, Sérgio D. J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

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

PEREIRA, C. S. et al. Low expression of MSH2 DNA repair protein is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 5, p. 416-421, 2013.

PETERSEN, S. M. et al. Functional examination of MLH1, MSH2, and MSH6 intronic mutations identified in Danish colorectal cancer patients. **BMC Medical Genetics**, v. 14, n. 1, p. 103, 2013.

PIERCE, B. A. **Genética um Enfoque Conceitual**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.a., 2004. 758 p.

PUIG, S.; BERROCAL, A. Management of high-risk and advanced basal cell carcinoma. **Clinical and Translational Oncology**, v. 17, n. 7, p. 497-503, 2015.

QUAN, T.; FISHER, G. J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: A mini-review. **Gerontology**, v. 61, n. 5, p. 427-434, 2015.

REYES, G. X. et al. New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. **Chromosoma**, v. 124, n. 4, p. 443-462, 2015.

SANTUCCI-DARMANIN, S. et al. MSH4 acts in conjunction with MLH1 during mammalian meiosis. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 11, p. 1539-1547, 2000.

SACHIDANANDAM, R. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 928-933, 2001.

SCHNEIDER, N. B. **Análise do gene MSH6 em pacientes com Síndrome de Lynch**. 2015. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

- SEIFERT, M. et al. The DNA-mismatch repair enzyme hMSH2 modulates UV-B-induced cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 1, p. 203-213, 2008.
- SHERRY, S. T. et al. dbSNP : the NCBI database of genetic variation. v. 29, n. 1, p. 308–311, 2001.
- SNG, J. et al. Skin cancer trends among Asians living in Singapore from 1968 to 2006. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 3, p. 426–432, 2009.
- SHI, S-R. et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1005-1011, 2002.
- SIQUEIRA, S. de. **Avaliação fotoquimiopreventiva do extrato de maçã e da rotina em modelos de pele in vitro e in vivo**. 2014. 61 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2014.
- SRIVASTAVA, K.; SRIVASTAVA, A.; MITTA, B. Polymorphisms in ERCC2, MSH2, and OGG1 DNA Repair Genes and Gallbladder Cancer Risk in a Population of Northern India. **Wiley Interscience**. Índia, p. 3.160-3.169. abr. 2010.
- SLOVÁKOVÁ, P. et al. Mismatch Repair Gene Polymorphisms and Association with Lung Cancer Development. In: **Lung Cancer and Autoimmune Disorders**. Springer International Publishing, p. 15-22, 2015.
- SHERRY, S. T. et al. dbSNP : the NCBI database of genetic variation. v. 29, n. 1, p. 308–311, 2001.
- SMOLARZ, B. et al. Gly322Asp and Asn127Ser single nucleotide polymorphisms (SNPs) of hMSH2 mismatch repair gene and the risk of triple-negative breast cancer in Polish women. **Familial Cancer**, v. 14, n. 1, p. 81–88, 2014.
- SMITH, C. E. et al. Dominant Mutations in *S. cerevisiae* PMS1 Identify the Mlh1-Pms1 Endonuclease Active Site and an Exonuclease 1-Independent Mismatch Repair Pathway. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 10, 2013.

- SMITH, T. R. et al. Polygenic model of DNA repair genetic polymorphisms in human breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 11, p. 2132-2138, 2008.
- SNG, J. et al. Skin cancer trends among Asians living in Singapore from 1968 to 2006. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, n. 3, p. 426–432, 2009.
- SONG, H. et al. Common variants in mismatch repair genes and risk of invasive ovarian cancer. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 11, p. 2235-2242, 2006.
- STANDRING, S. et al. **Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice**. 41. ed. London: Elsevier, 2016.
- STOJIC, L.; BRUN, R.; JIRICNY, J. Mismatch repair and DNA damage signalling. **DNA Repair**, v. 3, n. 8-9, p. 1091–1101, 2004.
- SRIVASTAVA, Kshitij; SRIVASTAVA, Anvesha; MITTAL, Balraj. Polymorphisms in ERCC2, MSH2, and OGG1 DNA repair genes and gallbladder cancer risk in a population of Northern India. **Cancer**, v. 116, n. 13, p. 3160-3169, 2010.
- SVETLANOV, A. et al. Distinct functions of MLH3 at recombination hot spots in the mouse. **Genetics**, v. 178, n. 4, p. 1937-1945, 2008.
- SUN, M-Z. et al. Single nucleotide polymorphisms of DNA mismatch repair genes MSH2 and MLH1 confer susceptibility to esophageal cancer. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 7, n. 8, p. 2329, 2014.
- SURDU, S. et al. Occupational exposure to arsenic and risk of nonmelanoma skin cancer in a multinational European study. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 9, p. 2182-2191, 2013.
- TAN, E. S. T. et al. Basal cell carcinoma in Singapore: A prospective study on epidemiology and clinicopathological characteristics with a secondary comparative analysis between Singaporean Chinese and Caucasian patients. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 175–179, 2015.
- TALSETH-PALMER, B. A. et al. Targeted next-generation sequencing of 22 mismatch repair genes identifies Lynch syndrome families. **Cancer Medicine**, USA, v. 5, n. 5, p.929-941, 25 jan. 2016.
- TOMAZ, P. R. X.; SANTOS, J. da R. dos; SANTOS, P. C. J. de L. Aspectos da aplicabilidade da análise da curva de melting. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio

- de Janeiro, v. 48, n. 1, p.19-23, abr. 2015. Disponível em:
<<http://sbac.org.br/rbac/artigos/aspectos-da-aplicabilidade-da-analise-da-curva-de-melting/>>.
Acesso em: 28 nov. 2016.
- TUNCA, B. et al. Analysis of mismatch repair gene mutations in Turkish HNPCC patients. **Familial Cancer**, v. 9, n. 3, p. 365–376, 2010.
- VAN DER KLIFT, H. M. et al. Splicing analysis for exonic and intronic mismatch repair gene variants associated with Lynch syndrome confirms high concordance between minigene assays and patient RNA analyses. **Molecular genetics & genomic medicine**, v. 3, n. 4, p. 327–45, 2015.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The multistep nature of cancer. **Trends in genetics**, v. 9, n. 4, p. 138-141, 1993.
- WANG, T. et al. Association between MLH1 -93G>a polymorphism and risk of colorectal cancer. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. 2012.
- WARD, A. J.; COOPER, T. A. NIH Public Access. **Journal of Pathology**, v. 220, n. 2, p. 152–163, 2010.
- WATSON, J. D. et al. **Biologia Molecular do Gene**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 760 p., 2006.
- WOOD, R. D.; MITCHELL, Michael; LINDAHL, Tomas. Human DNA repair genes, 2005. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 577, n. 1, p. 275-283, 2005.
- WIBOM, C. et al. DNA-repair gene variants are associated with glioblastoma survival. **Acta oncologica (Stockholm, Sweden)**, v. 51, n. 3, p. 325–332, 2012.
- WU, S. et al. Basal-Cell Carcinoma Incidence and Associated Risk Factors in US Women and Men. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 6, p. 890–897, 2013.
- WU, A. et al. Histological subtypes of periocular basal cell carcinoma. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 42, n. 7, p. 603–607, 2014.
- WU, H. et al. Structure of the human MLH1 N-terminus: implications for predisposition to Lynch syndrome. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 71, n. 8, p. 981-985, 2015.

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

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

XIAO, X-Q. et al. Polymorphisms of mismatch repair gene hMLH1 and hMSH2 and risk of gastric cancer in a Chinese population. **Oncology letters**, v. 3, n. 3, p. 591-598, 2012.

YAP, B.; BOON, F. Clinical characteristics of basal cell carcinoma in a tertiary hospital in Sarawak, Malaysia. **Int J Dermatol**, v. 49, n. 2, p. 176–179, 2010.

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

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

ZARGARAN, M. et al. A clinicopathological survey of Basal cell carcinoma in an Iranian population. **Journal of dentistry (Shīrāz, Iran)**, v. 14, n. 4, p. 170–7, 2013.

ZHANG, T. et al. Mismatch repair gone awry: Management of Lynch syndrome. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 93, n. 3, p. 170-179, 2015.

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

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