

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GENOTIPAGEM DO GENE *KRAS* EM INDIVÍDUOS TATUADOS

Trabalho submetido por
Catarina de Sá Figueiredo Peixoto Alves
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

julho de 2025

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GENOTIPAGEM DO GENE *KRAS* EM INDIVÍDUOS TATUADOS

Trabalho submetido por
Catarina de Sá Figueiredo Peixoto Alves
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Clara Guerreiro de Oliveira Ribeiro

julho de 2025

Dedicatória

Ao meu Avô, que dizia sempre:

“Para construir uma casa, é preciso começar pelos tijolos, um a um.”

Pois bem, Vuvu... acho que o telhado já está colocado.

Espero que te orgulhes e, se tudo correr bem, o melhor desta obra ainda está por vir.

Agradecimentos

Ao chegar ao fim deste percurso, é impossível não olhar para trás com gratidão por todas as pessoas que me acompanharam, apoiaram e inspiraram ao longo do caminho.

À Prof. Doutora Ana Clara Guerreiro de Oliveira Ribeiro, a minha Orientadora. Obrigada pela paciência nos dias mais caóticos, pelo rigor que me ensinou a ter e por nunca ter desistido deste projeto, mesmo quando parecia ambicioso demais para um simples estudo piloto. O meu sincero e sentido obrigada.

À Egas Moniz School of Health and Science, pelo apoio institucional e pela cedência dos recursos laboratoriais que tornaram este trabalho possível.

Aos voluntários que aceitaram participar nesta aventura científica, obrigada pela disponibilidade, pela boa disposição e por se tornarem parte de algo que, espero, venha a fazer a diferença.

Às minhas amigas, Mariana D., Mariana C., Beatriz e Rita. Obrigada por ouvirem as minhas ideias mais mirabolantes, pelas crises partilhadas e, acima de tudo, por não fugirem... ou, pelo menos, por voltarem sempre.

À minha Mãe, ao meu Irmão, à minha Avó e ao meu Padrasto, obrigada por estarem sempre lá, em tudo, sem nunca falhar.

Resumo

Introdução: Mutações na família RAS de proto-oncogenes, particularmente no gene *KRAS*, foram identificadas como fator-chave no desenvolvimento de vários tipos de cancro de pele, incluindo melanomas e carcinomas de células escamosas. A mutação mais comum ocorre no codão 12, alterando a funcionalidade da proteína GTPase, que está envolvida na transdução de sinais celulares. Também foram relatados casos de neoplasias cutâneas em indivíduos tatuados, levantando questões sobre se a tinta, o trauma mecânico da agulha ou o fotoenvelhecimento da pele poderiam ser fatores desencadeantes. No entanto, apesar dessas observações, ainda há uma falta de evidências científicas robustas que relacionem diretamente as tatuagens a mutações genéticas específicas.

Objetivos: Verificar a presença no ADN de mutações no codão 12 do gene *KRAS* em estudantes tatuados da Egas Moniz School of Health and Science.

Metodologia: Realizou-se um estudo piloto experimental com 16 estudantes tatuados, selecionados com base nos seguintes critérios de inclusão: indivíduos saudáveis, sem doenças dérmicas, com tatuagens pretas e localizadas nos membros superiores, cada tatuagem tinha pelo menos dois centímetros de diâmetro e tinha sido feita há mais de dois anos. O ADN foi recolhido através da raspagem da pele com swab húmida e extraído utilizando colunas de centrifugação revestidas com sílica (kit NZYtech). O gene *KRAS* foi amplificado utilizando Nested PCR. A análise da mutação consistiu na digestão do produto amplificado com a enzima de restrição BstNI, seguida de eletroforese em gel de agarose a 4%. A análise dos dados foi realizada com recurso a uma análise descritiva simples.

Resultados: Obteve-se 10 amostras viáveis de ADN com qualidade suficiente para interpretação molecular, correspondentes a 5 participantes. Quatro deles apresentaram um padrão de fragmentação correspondente ao genótipo selvagem (111 pb), indicando a ausência de mutações no codão 12 do gene *KRAS*. Uma amostra apresentou uma banda de 140 pb, o que é consistente com um genótipo mutante homocigótico. No entanto, os resultados também destacam limitações importantes da metodologia utilizada, particularmente no que diz respeito à qualidade do ADN, que pode ter comprometido a eficiência do processo de amplificação na maioria das amostras.

Conclusão: Os resultados limitados deste estudo reforçam a necessidade de otimizar a metodologia de recolha. Abordagens alternativas poderiam incluir a limpeza prévia da pele com uma solução alcoólica para remover células mortas ou a extração de ADN dos folículos capilares em vez da raspagem da pele. São necessárias mais pesquisas envolvendo uma amostra maior e técnicas laboratoriais mais robustas para validar a viabilidade da genotipagem do gene KRAS em indivíduos tatuados.

Palavras-chave: Gene *KRAS*; Mutações; Tatuagens; Variabilidade genética

Abstract

Introduction: Mutations in the RAS family of proto-oncogenes, particularly in the KRAS gene, are a key factor in the development of various skin cancers, including melanoma and squamous cell carcinoma. The most common mutation occurs in codon 12, altering the functionality of the GTPase protein, which plays a role in cell signalling. There have also been reports of skin neoplasms in tattooed individuals, raising questions as to whether the ink, the mechanical trauma of the needle or photoaging could be triggering factors. However, despite these observations, there is still a lack of robust scientific evidence directly linking tattoos to specific genetic mutations.

Objectives: To verify the presence of mutations in codon 12 of the KRAS gene in the DNA of tattooed students at the Egas Moniz School of Health and Science.

Methodology: An experimental pilot study was conducted with 16 tattooed students who met the following inclusion criteria: they were healthy individuals without skin diseases; their tattoos were black; they were located on the upper limbs; and each tattoo was at least two centimetres in diameter and had been completed more than two years ago. DNA was collected by scraping the skin with a wet swab and extracted using silica-coated centrifugation columns (NZYtech kit). The KRAS gene was amplified using nested PCR. Mutation analysis consisted of digesting the amplified product with the BstNI restriction enzyme, followed by electrophoresis on a 4% agarose gel. Data analysis was performed using simple descriptive statistics.

Results: Ten viable DNA samples of sufficient quality for molecular interpretation were obtained, corresponding to five participants. Four of these samples exhibited a fragmentation pattern indicative of the wild-type genotype (111 bp), suggesting an absence of mutations in codon 12 of the KRAS gene. One sample exhibited a 140 bp band, consistent with a homozygous mutant genotype. However, the results also highlight important limitations of the methodology used, particularly with regard to DNA quality, which may have compromised the efficiency of the amplification process in most samples.

Conclusion: The limited results of this study reinforce the need to optimise the collection methodology. Alternative approaches could include cleaning the skin with an alcoholic solution prior to sampling to remove dead cells, or extracting DNA from hair follicles instead of scraping the skin. Further research involving a larger sample size and more robust laboratory techniques is needed to validate the feasibility of KRAS gene genotyping in tattooed individuals.

Keywords: *KRAS* gene; Mutations; Tattoos; Genetic variability

Índice

Resumo	1
Abstract	3
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas.....	9
Lista de Abreviaturas.....	11
Glossário	13
1. Introdução.....	17
1.1 Estrutura e Funções da Pele	17
1.1.1 Camadas da pele	17
1.1.2 Funções dos queratinócitos na epiderme.....	20
1.1.3 Mecanismos de defesa celular e regeneração cutânea	21
1.1.4 Lesões induzidas por agentes externos	22
1.2 Tatuagens: Composição e Efeitos Cutâneos.....	23
1.2.1 Composição das tintas de tatuagem.....	23
1.2.2 Comportamento da tinta nas diferentes camadas da pele.....	27
1.2.3 Reações inflamatórias e resposta imunológica.....	29
1.3 O gene <i>KRAS</i> e a sua relevância oncológica	32
1.3.1 A família RAS: <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> e <i>HRAS</i>	32
1.3.2 O papel do gene <i>KRAS</i> na sinalização celular e regulação de vias de proliferação.....	33
1.3.3 Mutações relevantes no gene <i>KRAS</i> : codões 12, 13 e 61	36
1.3.4 Alterações no <i>KRAS</i> : neoplasias cutâneas e influência ambiental	38
1.3.5 Lacunas na literatura e justificação do presente estudo	39
2. Objetivos	41
2.1 Objetivo principal	41
2.2 Objetivos secundários.....	41
3. Materiais e Métodos.....	43

3.1 Desenho de Estudo	43
3.2 População e Amostra	43
3.2.1 Cálculo da dimensão amostral	43
3.2.2 Critérios de elegibilidade	44
3.3 Registo e documentação das tatuagens	44
3.4 Recolha de Informação	44
3.5 Certificado de Originalidade.....	45
3.6 Ética e confidencialidade.....	45
3.7 Fluxograma do estudo.....	46
3.8 Extração de ADN	47
3.9 Adaptações metodológicas	50
3.10 Protocolo de amplificação por Nested PCR.....	51
3.10.1 Descrição do protocolo de Nested PCR	51
3.10.2 Definição do programa de Nested PCR.....	53
3.11 Protocolo da restrição enzimática - método de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	55
3.12 Protocolo da eletroforese gel.....	55
3.13 Análise estatística de dados	56
4. <i>Compreensão e expectativas da genotipagem do KRAS</i>	57
5. <i>Resultados</i>.....	59
6. <i>Discussão</i>.....	61
7. <i>Conclusão</i>	65
8. <i>Bibliografia</i>.....	67
9. <i>Anexos</i>.....	75

Índice de Figuras

- Figura 1** - Representação anatômica da estrutura da pele humana, destacando-se de fora para dentro a epiderme, derme e hipoderme (Figura elaborada pela autora, com adaptações feitas na plataforma BioRender)..... 17
- Figura 2** - Representação anatômica da epiderme e da derme, destacando-se as respectivas células (Figura elaborada pela autora, com adaptações feitas na plataforma BioRender).
..... 19
- Figura 3** - Dispersão e transporte dos pigmentos de tatuagem no organismo através dos fluidos linfáticos, sanguíneos e células imunes. (Adaptado de [Schreiver et al., 2017] com modificações feitas pela autora).....27
- Figura 4** - Estrutura da proteína KRAS, com destaque do domínio G, da região hipervariável e da extremidade farnesilação. (Figura elaborada pela autora na plataforma BioRender e com adaptações feitas com auxílio de inteligência artificial)33
- Figura 5** - As vias de sinalização intracelular (Adaptado de [BPS Bioscience, n.d.], com modificações feitas pela autora através da plataforma BioRender)34
- Figura 6** - Fluxograma do desenho do estudo (Figura elaborada pela autora, com adaptações feitas na plataforma Napkin AI)46
- Figura 7** - Padrão de bandas observadas na eletroforese para a identificação dos genótipos. 1- Marcador de peso molecular (NZYDNA Ladder VI); 2- Genótipo wild type (selvagem) sem mutação; 3- Genótipo homozigótico mutado; 4- Genótipo heterozigótico mutado. (Figura elaborada pela autora, com adaptações feitas na plataforma BioRender)
.....58
- Figura 8** - Representação esquemática da NZYDNA Ladder VI (50–1500 pb), utilizada como marcador de peso molecular para estimar o tamanho dos fragmentos de ADN obtidos por PCR. (Figura retirada de NZYtech, s.d.).....58
- Figura 9** - Visualização da região do codão 12 do gene KRAS num gel de agarose a 4% (p/v). 1- Marcador de peso molecular (NZYDNA Ladder VI); 2- Controlo negativo; 3- Amostra 1; 4- Amostra 1T; 5- Amostra 5; 6- Amostra 5T; 7- Amostra 6; 8- Amostra 6T;

9- Amostra 7; 10- Amostra 7T; 11- Amostra 8; 12- Amostra 8T. (Fotografia obtida pela autora)60

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Pigmentos de tatuagem e seus constituintes químicos (adaptado de [Bäumler, 2020 ; Islam et al., 2016 ; Santos, 2020], com modificações feitas pela autora)	25
Tabela 2 - As principais complicações associadas à tatuagem (adaptado de [Islam et al. , 2016], com modificações feitas pela autora).....	31
Tabela 3 - As mutações mais frequentes por codão (G12, G13 e Q61) em diferentes tipos de cancro, destacando a sua prevalência relativa em cada contexto oncológico (adaptado de [Huang et al., 2021], com modificações feitas pela autora)	37
Tabela 4 - Distribuição volumétrica dos componentes utilizados nas reações experimentais para a amostra e para o controlo negativo (Tabela elaborada pela autora)	52
Tabela 5 - Parâmetros e condições dos dois protocolos distintos de PCR implementados, detalhando as etapas e respectivas diferenças entre os primers F1/R1 (tampa azul) e F2/R2 (tampa transparente) (Tabela elaborada pela autora)	53
Tabela 6 - Concentrações de ADN das amostras 1,5 e 6 obtidas pelo NanoDrop One com absorvância a 260nm. “T” corresponde à amostra recolhida no braço tatuado.	59

Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

BstNI - Enzima de restrição de *Bacillus stearothermophilus*

DNase - Desoxirribonuclease

ECHA - Agência Europeia de Produtos Químicos

FDA - Food and Drug Administration

GDP - Guanosina Difosfato

GTP - Trifosfato de Guanosina

HRAS - Harvey Rat sarcoma viral oncogene homolog

KRAS - Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog

NRAS - Neuroblastoma RAS viral homolog

UV - Ultravioleta

PAHs - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Pb - Pares de bases

PCR - Polymerase Chain Reaction

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

RAS - Rat Sarcoma vírus

s.d. - Sem Data

Glossário

ADN (Ácido Desoxirribonucleico) – Molécula que contém a informação genética dos seres vivos.

Agarose – Polissacarídeo utilizado para preparar géis em eletroforese, permitindo separar fragmentos de ADN conforme o seu tamanho.

Amplificação (PCR) – Processo de replicação de segmentos específicos de ADN para obtenção de uma quantidade suficiente para análise.

Amostragem por conveniência – Tipo de amostragem em que os participantes são selecionados com base na facilidade de acesso, sem aleatorização.

Apoptose – Morte celular programada, essencial para manter o equilíbrio celular e eliminar células danificadas.

Banda (em gel de eletroforese) – Faixa visível que representa fragmentos de ADN separados por tamanho.

BstNI – Enzima de restrição usada para cortar o ADN num local específico, permitindo distinguir genótipos com base nos fragmentos gerados.

Codão – Sequência de três nucleótidos no ADN ou ARN que codifica um aminoácido específico ou sinal de paragem na síntese proteica.

Controlo negativo – Amostra sem ADN usada para garantir que não há contaminação durante as reações de PCR.

Desnaturação (PCR) – Etapa em que o ADN é separado em duas cadeias simples por aumento de temperatura.

DNase – Enzima que degrada o ADN.

Eletroforese – Técnica que separa fragmentos de ADN num gel de agarose, com corrente elétrica.

Enzima de restrição – Proteína que hidrolisa o ADN em locais específicos, usada para identificar alterações genéticas.

Epiderme – Camada mais externa da pele, composta por queratinócitos e outras células, responsável pela proteção contra agentes externos.

Exão 2 (do gene *KRAS*) – Região codificadora onde se localiza o codão 12, alvo da análise neste estudo.

Farnesilação – Modificação pós-traducional que permite a ancoragem da proteína KRAS à membrana celular.

Fibroblasto – Célula da derme responsável pela produção de colagénio e elastina, fundamentais para a estrutura da pele.

Genótipo – Conjunto de genes de um indivíduo. Pode ser wild type (sem mutação), heterozigótico ou homozigótico mutado.

GTPases – Enzimas que hidrolisam GTP em GDP, atuando como interruptores moleculares em vias de sinalização celular.

Hibridação (PCR) – Etapa em que os primers se ligam ao ADN alvo, permitindo o início da amplificação.

Hotte (câmara de fluxo laminar) – Equipamento que fornece um ambiente estéril, utilizado para evitar contaminações em laboratório.

Inflamação crónica – Estado de inflamação persistente que pode levar a lesões tecidulares e predispor ao aparecimento de mutações.

Instabilidade genómica – Acumulação de alterações no ADN que afeta a integridade genética da célula e pode levar à formação de tumores.

KRAS – Gene da família *RAS* que codifica uma proteína GTPase. Mutações neste gene estão associadas a diversos tipos de cancro.

Ladder (DNA Ladder) – Marcador de peso molecular usado como referência para estimar o tamanho dos fragmentos de ADN no gel.

Lise – Etapa de rutura celular que liberta o ADN para posterior purificação.

Macrófagos – Células do sistema imunitário que fagocitam partículas estranhas e participam na resposta inflamatória.

Melanina – Pigmento natural produzido pelos melanócitos, que confere cor à pele e protege contra a radiação UV.

Melanócitos – Células epidérmicas responsáveis pela síntese de melanina.

Mistura-mãe (Master Mix) – Solução que contém todos os reagentes essenciais para uma reação de PCR.

Mutação heterozigótica – Situação em que apenas uma das duas cópias de um gene apresenta mutação.

Mutação homozigótica – Situação em que ambas as cópias de um gene apresentam a mesma mutação.

Mutação somática – Alteração genética adquirida durante a vida, que afeta apenas determinadas células e não é herdada.

Nested PCR – Técnica que envolve duas rondas de PCR para aumentar a sensibilidade e especificidade da amplificação.

Neoplasia – Crescimento anormal e descontrolado de células, podendo ser benigno ou maligno.

NZY Tissue DNA Isolation Kit – Conjunto de reagentes da marca NZYtech utilizado para extrair ADN de tecidos biológicos.

Oncogene – Gene mutado ou ativado de forma anormal que contribui para o desenvolvimento de cancro.

PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) – Técnica de biologia molecular usada para amplificar regiões específicas do ADN.

Pigmento azo – Tipo de corante orgânico utilizado em tintas de tatuagem, com potencial cancerígeno quando degradado.

Pigmentos de tatuagem – Substâncias químicas presentes nas tintas, potencialmente mutagénicas devido à presença de metais pesados e compostos aromáticos.

Primers – Sequências curtas de ADN que delimitam o início e o fim da síntese de ADN durante a PCR.

Produto de PCR – Fragmento de ADN resultante da amplificação, que será analisado posteriormente.

Queratina – Proteína fibrosa produzida pelos queratinócitos, essencial para a impermeabilidade e proteção da epiderme.

Queratinócitos – Células predominantes da epiderme, envolvidas na proteção, regeneração e resposta imunológica cutânea.

Radicais livres (ROS) – Espécies reativas de oxigénio que podem danificar o ADN e outras estruturas celulares.

RAS (Rat Sarcoma) – Família de genes que codificam proteínas GTPases envolvidas na sinalização celular. Inclui KRAS, HRAS e NRAS.

Raspagem cutânea – Técnica de recolha de células da pele através de fricção com uma swab, usada para obter ADN.

Região codificante – Parte do gene que contém a informação traduzida em proteína. No estudo, corresponde ao exão 2.

Restrição enzimática – Processo de corte do ADN por enzimas de restrição para análise de mutações.

Senescência celular – Estado em que a célula interrompe a sua divisão, como mecanismo de defesa contra mutações.

Sequenciação genómica – Técnica que permite identificar a sequência exata de nucleótidos no ADN, usada para confirmação de mutações.

Sistema linfático – Rede de vasos e órgãos que transporta linfa, participa na defesa imunitária e no transporte de pigmentos.

Swab – Cotonete estéril utilizado para recolher amostras biológicas.

Taq polimerase – Enzima resistente ao calor utilizada na PCR para sintetizar novas cadeias de ADN.

Termociclador – Equipamento que automatiza os ciclos de temperatura necessários para a PCR.

Tipo selvagem (Wild Type) – Genótipo sem mutações na região analisada do gene.

Transdução de sinal – Processo pelo qual as células respondem a estímulos externos através de cascatas moleculares intracelulares.

Ultravioleta (UV) – Tipo de radiação solar que pode danificar o ADN e contribuir para o desenvolvimento de cancro de pele.

Validação – Processo de confirmação da eficácia e fiabilidade de uma metodologia científica.

1. Introdução

1.1 Estrutura e Funções da Pele

1.1.1 Camadas da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, apresenta várias camadas com diferentes estruturas e funções, responsável por servir de barreira protetora contra o meio ambiente quer seja por agentes patogénicos ou por lesões causadas pela luz ultravioleta (Lowe & Anderson, 2015).

Também apresenta outras funções como: defesa imunológica, regulação da homeostase pela manutenção da temperatura corporal e do equilíbrio hídrico, sensoriais, entre outras (Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia, s.d.).

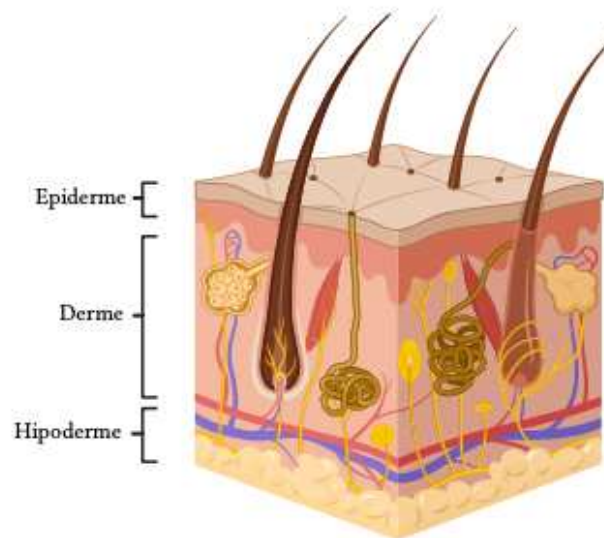


Figura 1 - Representação anatómica da estrutura da pele humana, destacando-se de fora para dentro a epiderme, derme e hipoderme (Figura elaborada pela autora, com adaptações feitas na plataforma *BioRender*).

– Epiderme

A epiderme é a camada mais externa da pele e na sua superfície (membrana apical), encontra-se o estrato córneo. O estrato córneo é composto essencialmente por células mortas, designadas corneócitos, que contêm grandes quantidades de queratina e desempenham um papel fundamental na resistência da pele, atuando como barreira protetora contra agressões externas (Tortora & Derrickson, 2016). À medida que as células epidérmicas se diferenciam, migram progressivamente para a superfície, perdendo o núcleo e a viabilidade celular num processo conhecido como queratinização, seguido de descamação (Oakley & Krishnamurthy, 2023).

Entre as principais células que compõem a epiderme encontram-se os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel (Figura 2) (Wong et al., 2022). Os queratinócitos, que representam a maioria das células desta camada, serão abordados com mais detalhe no subcapítulo seguinte (1.1.2 - Funções dos queratinócitos na epiderme), dada a sua relevância nos mecanismos celulares associados a lesões e potenciais mutações genéticas.

Os melanócitos são responsáveis pela produção de melanina, o pigmento que confere cor à pele. As células de Langerhans têm uma função importante na resposta imunitária, enquanto as células de Merkel possuem uma função sensorial, estabelecendo contacto com as terminações nervosas cutâneas (Bataille et al., 2022; Matejuk, 2017).

Importa ainda referir que é na epiderme que se originam os anexos cutâneos, como as unhas, os pelos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas (Lowe & Anderson, 2015).

– Derme

A derme é a camada intermédia da pele e tem um papel fundamental na sua resistência e elasticidade, graças à presença de fibras de colagénio e elastina produzidas pelos fibroblastos, que são as principais células desta camada (SPDV, s.d.).

Para além dos fibroblastos, a derme é rica em vasos sanguíneos e linfáticos, recetores sensoriais e contém ainda as raízes dos folículos pilosos. Desempenha também funções

importantes na resposta inflamatória e na cicatrização de feridas, sendo essencial na manutenção da integridade e saúde da pele (Lowe & Anderson, 2015).

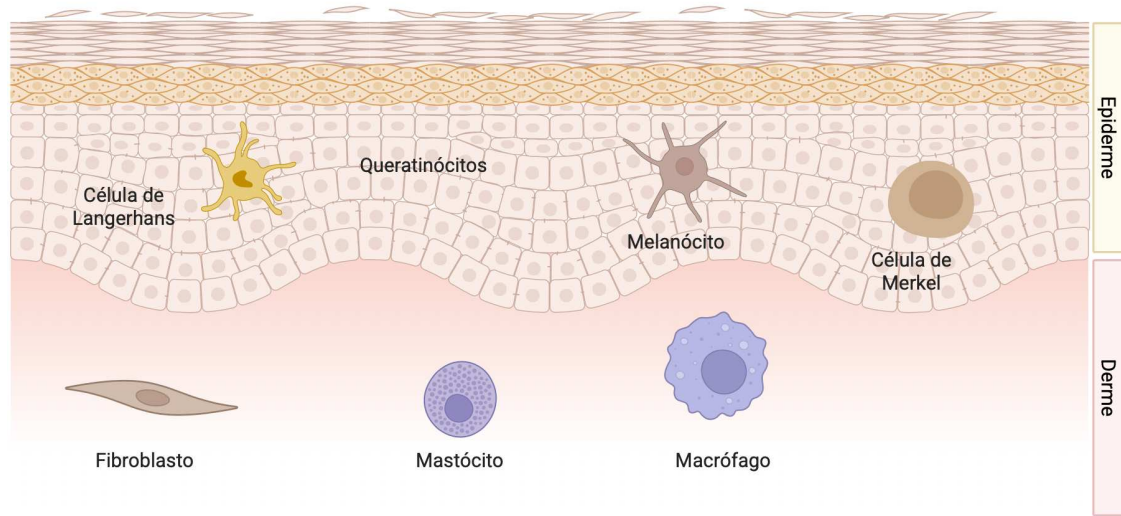


Figura 2 - Representação anômica da epiderme e da derme, destacando-se as respectivas células (Figura elaborada pela autora, com adaptações feitas na plataforma *BioRender*).

– Hipoderme

A hipoderme, ou tecido subcutâneo, é a camada mais profunda da pele. É constituída maioritariamente por tecido adiposo (adipócitos) que desempenham um papel importante na regulação térmica, ajudando a manter a temperatura corporal estável, e na reserva de energia, através do armazenamento de gordura (SPDV, s.d.).

1.1.2 Funções dos queratinócitos na epiderme

Os queratinócitos são as células predominantes da epiderme, representando aproximadamente 90% das suas células (Than et al., 2019). O seu ciclo de vida tem início na camada basal da epiderme, onde são formados. Nesta fase, são células ativas, com capacidade de divisão e metabolicamente funcionais. À medida que amadurecem, migram lentamente em direção à superfície da pele, onde iniciam a síntese de queratina, uma proteína essencial que protege o organismo contra agressões externas (Yousef et al., 2024).

Durante este percurso, os queratinócitos sofrem alterações estruturais: perdem progressivamente o núcleo e tornam-se em células mortas, metabolicamente inativas e altamente queratinizadas ao atingirem o estrato córneo, a camada mais superficial da pele. Este processo, conhecido como queratinização, é fundamental para garantir a integridade e impermeabilidade da epiderme (Murphrey et al., 2022).

Além da sua função estrutural, participam ativamente na defesa imunológica da pele. São capazes de reconhecer agentes patogénicos e responder através da produção de citocinas, quimiocinas e péptidos antimicrobianos, desencadeando respostas imunitárias e evitar possíveis infeções (Than et al., 2019). Têm ainda um papel importante na resposta inflamatória, intervindo nos processos de cicatrização e regeneração cutânea (Piipponen et al., 2020).

No entanto, quando expostos de forma prolongada a certos agentes patogénicos podem sofrer lesões no ADN. Esta modificação na sua estrutura e a acumulação destas lesões, leva a uma instabilidade genómica que pode, possibilitar ao aparecimento de mutações oncogénicas e, em casos mais graves, contribui para o desenvolvimento de neoplasias cutâneas, como o melanoma (Negrini et al., 2010).

1.1.3 Mecanismos de defesa celular e regeneração cutânea

A pele tem capacidade de se proteger e regenerar após agressões físicas, químicas ou biológicas. Esta resposta a lesões resulta de uma interação entre as células da epiderme, da derme e do sistema imunitário inato que atuam em conjunto através de um processo dividido em três fases: inflamação, proliferação e maturação (Carlos et al., 2007 ; Yousef et al., 2024).

– Inflamação

Numa primeira abordagem, as células da epiderme, os queratinócitos e as células de Langerhans, juntamente com as células da derme, os mastócitos e macrófagos reconhecem sinais moleculares associados a lesões e infecções. Este reconhecimento, provoca a libertação de citocinas pró-inflamatórias (Interleucina-1, Interleucina-6 e Fatores de Necrose Tumoral- α) e quimiocinas que desencadeiam as células de defesa para o local da lesão (Pastar et al., 2014).

– Proliferação

Na periferia da ferida, os queratinócitos iniciam a sua migração e proliferação enquanto os fibroblastos atuam na matriz extracelular, sintetizando o colagénio e a fibronectina, fundamentais para o suporte estrutural da pele. Por sua vez, as células do endotélio asseguram o aporte de oxigénio e nutrientes ao tecido regenerado, através do processo de Angiogénese (Eming et al., 2007 ; Yousef et al., 2024).

– Maturação

As alterações estruturais do colagénio e a maturação do tecido recém-formado conferem à área regenerada a resistência de que necessita. Na maturação, estabelece-se um equilíbrio entre a síntese e a degradação dos componentes de tecido, crucial para prevenir a formação de cicatrizes hipertróficas ou fibroses (acumulação excessiva de tecido conjuntivo) (Carlos et al., 2007).

Para além do seu papel na reparação tecidular, as células epidérmicas também ajudam a prevenir mutações, através de mecanismos de reparação do ADN, a produção de antioxidantes e a renovação constante da epiderme. Estes processos são fundamentais

para limitar as lesões causadas por agentes externos, como os raios ultravioleta (Montagner & Costa, 2009).

1.1.4 Lesões induzidas por agentes externos

Apesar de ter uma barreira protetora eficaz, a pele está em contacto constante com fatores ambientais que podem comprometer a sua integridade. Entre os principais agentes destacam-se a radiação ultravioleta (UV), a poluição, os produtos químicos e os microrganismos (Baumann, Rieder, & Sun, 2022).

A radiação UV, em particular os raios ultravioleta tipo B (UVB), é uma das principais causas de lesões diretas no ADN das células da epiderme, como os queratinócitos. Estes raios podem induzir alterações na sequência nucleotídica, como a formação de dímeros de pirimidina, que, se não forem corrigidas pelos mecanismos naturais de reparação da célula, podem resultar em mutações permanentes (Balogh et al., 2011). Algumas destas mutações, como as que ocorrem nos genes da família *RAS*, incluindo o *KRAS*, estão associadas ao desenvolvimento de doenças de cancro da pele (Emmert et al., 2014).

A poluição atmosférica é outro fator com impacto significativo na saúde. Compostos com partículas finas, metais pesados e hidrocarbonetos libertados por indústrias ou pelo trânsito automóvel, também têm sido associados ao stress oxidativo, à inflamação cutânea e ao envelhecimento precoce da pele. Estes poluentes podem penetrar na epiderme, interagir com os lípidos da membrana celular e desencadear a formação de radicais livres, que danificam as estruturas celulares (Baumann, Rieder, & Sun, 2022).

A exposição frequente a produtos químicos como os conservantes, os cosméticos ou os pigmentos de tatuagem, pode causar reações alérgicas, inflamatórias ou mesmo tóxicas. Este tipo de reações podem interferir com a capacidade natural de regeneração da pele e alterar o seu funcionamento celular (Laux et al., 2016).

Além disso, as infeções provocadas por bactérias, vírus ou fungos também representam uma ameaça à integridade cutânea. Quando repetidas ou persistentes, podem agravar lesões preexistentes e enfraquecer as defesas naturais da pele (Yousef et al., 2024).

Em suma, todos estes fatores externos afetam diretamente a estrutura e a função das células da epiderme e da derme. Quando os mecanismos naturais de proteção e reparação falham, as lesões acumulam-se, o que pode resultar no desenvolvimento de doenças

inflamatórias, envelhecimento precoce da pele e até alterações genéticas com risco de evolução para cancro cutâneo (Piipponen et al., 2020).

1.2 Tatuagens: Composição e Efeitos Cutâneos

1.2.1 Composição das tintas de tatuagem

De acordo com a Agência Europeia de Produtos Químicos (ECHA), cerca de 54 milhões de pessoas na União Europeia têm tatuagens (Expresso, s.d.).

Nos Estados Unidos da América, a Food and Drug Administration (FDA) não regulamentou nem aprovou oficialmente qualquer tinta de tatuagem como segura para aplicação no corpo humano (Kluger & Koljonen, 2012).

A maioria das tatuagens utiliza pigmento preto, geralmente adquirido pelos tatuadores através de fornecedores especializados ou pela internet. A produção desta cor requer a combustão térmica de óleos derivados da matéria-prima, processo que origina compostos como o carbono preto e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), ambos classificados como potencialmente cancerígenos para o ser humano (Regensburger et al., 2010).

Os pigmentos utilizados nas tintas de tatuagens consistem em suspensões de partículas sólidas dispersas em solventes aquosos (Bäumler, 2020). Estas partículas podem incluir metais coloridos de origem orgânica ou inorgânica, respetivos óxidos e compostos poliaromáticos. Com exceção dos compostos orgânicos, a maioria destes materiais é considerada biologicamente inerte (Regensburger et al., 2010). Estima-se que cerca de 80% dos pigmentos utilizados sejam compostos orgânicos, os quais podem ser classificados com base na sua estrutura química em dois grandes grupos: pigmentos azo e pigmentos policíclicos. Os pigmentos azo, em particular, libertam grupos amina aromáticos, substâncias potencialmente cancerígena, quando expostos à radiação ultravioleta ou ao laser (Piccinini et al., 2015).

O pigmento mais utilizado nas tatuagens é o carbono preto, seguido pelo dióxido de titânio (TiO₂), um pigmento branco frequentemente adicionado a outras tintas com o objetivo de aclarar a tonalidade da cor. No entanto, por ser um dióxido, o TiO₂ pode

originar espécies reativas de oxigénio (ROS) tóxicas quando exposto à luz solar (Schreiver et al., 2017).

Além disso, os pigmentos podem conter metais reconhecidos como alergénicos, tais como o cromo, o níquel e o cobalto, frequentemente em concentrações superiores aos limites de segurança. Outros elementos encontrados incluem compostos de cádmio, classificados como cancerígenos para humanos (Grupo 1 da lista nacional de agentes cancerígenos para humanos), bem como sais solúveis de cobalto, mercúrio e o próprio carbono preto, classificados como possivelmente cancerígenos para humanos, pertencendo ao Grupo 2B dessa mesma classificação (Kluger & Koljonen, 2012).

Idealmente, a composição das tintas de tatuagem deveria constar no rótulo, incluindo a descrição dos componentes, conservantes, data de validade e o número de Color Index. Esta informação permitiria que tanto o tatuador como o cliente tivessem pleno conhecimento dos produtos utilizados. Contudo, na prática, as embalagens apresentam frequentemente informação limitada ou incompleta, e a farmacocinética destes compostos no organismo humano, bem como os seus potenciais riscos, permanecem desconhecidos (Santos, 2020).

Como forma de evitar a degradação das tatuagens provocada pela radiação solar, passou-se a utilizar pigmentos originalmente desenvolvidos para aplicação em automóveis e materiais plásticos. Apesar de estes pigmentos terem sido testados quanto à sensibilidade à luz solar, os seus efeitos toxicológicos não foram devidamente avaliados (Hauri & Hohl, 2015).

A Tabela 1 apresenta os principais constituintes químicos encontrados nos pigmentos utilizados em tintas de tatuagem, organizados por cor. Esses componentes incluem metais e compostos que podem ter implicações toxicológicas.

Tabela 1- Pigmentos de tatuagem e seus constituintes químicos (adaptado de [Bäumler, 2020 ; Islam et al., 2016 ; Santos, 2020], com modificações feitas pela autora)

Pigmento	Constituintes químicos
Amarelo	Bário Bromo Cádmio sulfeto (CdS) Estrôncio Hidróxido de ferro (FeHO ₂) Sulfureto de cádmio Titânio
Azul	Bromo Cobalto espinélio (CoAl ₂ O ₄) Cobre Ferrocianeto férrico Titânio Zircónio
Branco	Chumbo Nióbio Titânio Zinco Zircónio
Castanho	Bário Estrôncio Ferro Titânio
Preto	Bromo Carbono Chumbo Óxido de ferro (II, III) (Fe ₃ O ₄) Titânio Zinco Zircónio
Rosa	Bromo Titânio

	Vanádio Zinco Zircônio
Roxo	Bromo Cobre Ferro Titânio Zircônio
Verde	Bromo Cianeto ferroférico Cobre Corantes de ftalocianinas Cromato de chumbo Ferrocianeto ferroférico Óxido de cromo (Cr_2O_3) Zinco
Vermelho	Cádmio Óxido férrico (Fe_2O_3) Pigmento de cádmio Sulfato férrico Sulfeto de mercúrio (HgS) Seleneto de cádmio Quinacridona
Violeta	Indigoide Manganês amônio Pirofosfato Sais de alumínio

1.2.2 Comportamento da tinta nas diferentes camadas da pele

A introdução do pigmento insolúvel na pele ocorre através da inserção da agulha até à camada dérmica, onde é responsável pela coloração preta da tatuagem. Este processo provoca a destruição da membrana basal da epiderme, bem como das células epidérmicas e dérmicas envolventes (Islam et al., 2016). As partículas do pigmento apresentam uma ampla variação de tamanhos, variando entre 100 nm (nanopartículas) e 1 µm (micropartículas). Devido às suas dimensões reduzidas, estas partículas possuem maior capacidade de dispersão, podendo atingir locais distantes do ponto de aplicação da tatuagem e atravessar barreiras biológicas (Figura 3) (Schreiver et al., 2017).

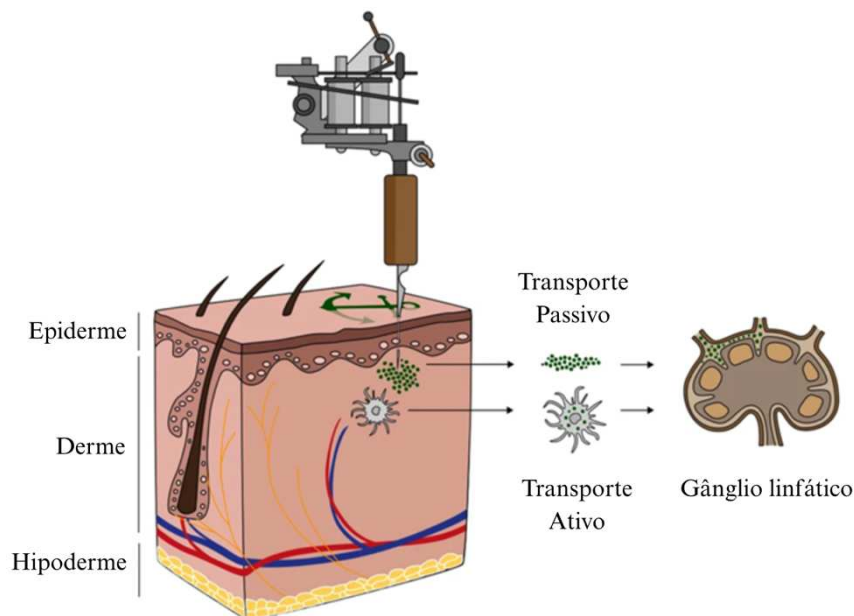


Figura 3 - Dispersão e transporte dos pigmentos de tatuagem no organismo através dos fluidos linfáticos, sanguíneos e células imunes. (Adaptado de [Schreiver et al., 2017] com modificações feitas pela autora)

O pigmento não permanece exclusivamente na derme. Conforme evidenciado por Regensburger et al. (2010), os pigmentos introduzidos na derme podem ser transportados passivamente através dos fluidos linfáticos e sanguíneos, ou captados por transporte ativo pelas células do sistema imunitário, como os macrófagos. Além disso, uma fração das partículas, incluindo o carbono preto e os PAHs, é libertada por exsudação através da epiderme danificada, enquanto outra parte é transportada para diversos órgãos, como os gânglios linfáticos, as células de Kupffer no fígado e as células de Langerhans na epiderme.

Por sua vez, Bäumlér (2020) indica a presença de pigmentos nos gânglios linfáticos e em estruturas intracelulares, como o citoplasma de fibroblastos e macrófagos.

A migração dos pigmentos e a sua degradação intracelular podem contribuir para a redução gradual da sua presença na pele ao longo do tempo. Além disso, há evidências de que parte desses pigmentos pode ser metabolizada por enzimas presentes do próprio organismo. A migração dos pigmentos para além do local de aplicação levanta preocupações relevantes do ponto de vista toxicológico, sobretudo no que diz respeito à exposição sistémica a compostos potencialmente nocivos (Hauri & Hohl, 2015).

Do ponto de vista temporal, o processo inflamatório inicia-se nas primeiras duas horas após a tatuagem, altura em que leucócitos polimorfonucleares fagocitam parte do pigmento, desencadeando uma resposta imunológica local. Passadas 24 horas, as partículas de pigmento são detetadas em diferentes tipos celulares, incluindo queratinócitos, macrófagos, mastócitos e fibroblastos. A eliminação transdérmica dos componentes do pigmento pode prolongar-se até à completa cicatrização da membrana basal da epiderme, processo que pode demorar, no mínimo, cerca de um mês (Islam et al., 2016).

1.2.3 Reações inflamatórias e resposta imunológica

Assim que ocorre a lesão da membrana basal cutânea, a pele torna-se suscetível à invasão por agentes externos. Em resposta, o organismo desencadeia uma reação imunológica de agressão microbiológica, iniciando a translocação de células apresentadoras de antígenos para os gânglios linfáticos locais, o que dá origem a uma resposta imunitária sistêmica (Nielsen et al., 2024).

Atualmente, não existe uma classificação específica para as complicações cutâneas associadas à tatuagem. Na literatura, estas complicações são descritas de forma variável, seja por base na patologia clínica (infecção ou hipersensibilidade), seja quanto ao carácter agudo ou crónico, o que pode dificultar o diagnóstico e originar confusões clínicas. Neste trabalho, a revisão da literatura será analisada de acordo com a classificação clínica proposta por Temiz & Özlü (2021).

Edema e prurido são as queixas mais frequentemente relatadas após a realização de uma tatuagem. No entanto, outras manifestações também podem ocorrer, nomeadamente:

- **Cicatrizes hipertróficas/queloide:** resultante do trauma mecânico provocado pela agulha durante o processo de tatuagem.
- **Distúrbios alérgicos:** reações de hipersensibilidade ou alergias aos pigmentos utilizados são das complicações mais prevalentes.
- **Dermatoses localizadas:** lesões desencadeadas por traumas físicos ou químicos, como psoríase ou vitiligo. Em indivíduos com historial de doenças cutâneas, estas condições podem ser exacerbadas pela tatuagem.
- **Granulomas:** os granulomas de corpo estranho caracterizam-se pela presença de células gigantes contendo o pigmento. Os granulomas sarcóides, de natureza autoinflamatória, podem surgir a partir de cicatrizes (sarcóides) e afetar a pele ou órgãos internos. Apresentam-se sob a forma de pápulas, nódulos ou placas, habitualmente confinadas à zona tatuada. Estes podem surgir semanas ou até décadas após a tatuagem, sendo o pigmento vermelho o principal responsável.

- **Infeções cutâneas micobacterianas:** a tinta utilizada pode ser um meio propício ao crescimento de micobactérias. Já foram descritos casos de tuberculose cutânea e infecções por micobacterianas associados a tatuagens.
- **Infeções cutâneas piogênicas:** a ausência de desinfecção adequada durante o procedimento aumenta significativamente o risco de infecções bacterianas. Entre as mais comuns encontram-se a foliculite, acne, impetigo, erisipelas e celulite. Os agentes etiológicos mais frequentemente identificados incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium spp*, *Pseudomonas spp*, *Clostridium spp* e *Klebsiella spp*.
- **Infeções fúngicas e virais da pele:** durante o processo de tatuagem, pode ocorrer contaminação por fungos ou vírus presentes na agulha ou na tinta. Foram reportados casos de zigomicose, dermatofitoses e *tinea*, bem como infecções por vírus do papiloma humano (HPV), herpes simples e até vírus da varíola.
- **Neoplasias:** existem diversos relatos de desenvolvimento de carcinoma basocelular (BCC) e melanoma (MM) em tatuagens de pigmentação preta e azul. Em tatuagens vermelhas, foi descrito o aparecimento de carcinoma de células escamosas (SCC) e de hiperplasia pseudoepiteliomatosa benigna.
- **Reações fotoalérgicas/fotodermatoses:** as tatuagens amarelas, que contêm sulfeto de cádmio, são as mais associadas a este tipo de reação. Este composto também pode estar presente, embora em menor quantidade, em pigmentos vermelhos.

Com base na revisão realizada por Islam et al. (2016), estas complicações estão organizadas por categorias clínicas e pelo tempo expectável para o aparecimento dos sintomas (Tabela 2). Esta sistematização contribui para uma melhor compreensão da diversidade de reações adversas que podem surgir após a tatuagem, facilitando a vigilância clínica e o diagnóstico diferencial.

Tabela 2 - As principais complicações associadas à tatuagem (adaptado de [Islam et al. , 2016], com modificações feitas pela autora)

Complicações após tatuagens	Clínica	Início dos sintomas
Imunológicas	Dermatite alérgica	Imediato a dias
	Imunohipersensibilidade (tipo IV retardada, hipersensibilidade)	Dias, semanas ou anos
	Reações fotossensíveis após exposição solar	—
Infeções bacterianas localizadas	Abcesso Erisipela Gangrena Impetigo	Poucos dias
Infeções bacterianas sistêmicas	Celulite	Poucos dias
	Sepse, Endocardite	Dias a meses
Infeções virais	Molusco contagioso	Semanas a meses
	Verruga vulgar	Meses a anos
	Hepatite B, C VIH	Semanas a meses
Fúngicas	Tinha	Semanas a meses
	Zigomicose	
Reações inflamatórias localizadas/sistêmicas	Psoríase Líquen plano Pseudolinfoma Hiperplasia pseudoepiteliomatosa	Semanas a anos
	Sarcoidose sistêmica	Meses a anos
Tumores	Linfoma Melanoma maligno Carcinoma basocelular	Anos

1.3 O gene *KRAS* e a sua relevância oncológica

1.3.1 A família RAS: *KRAS*, *NRAS* e *HRAS*

A família *RAS* é o grupo de oncogenes mais frequentemente mutado, estando presente em cerca de 20% dos doentes com cancro (Burge & Hobbs, 2022). No genoma humano, existem 36 genes que codificam 39 proteínas da família *RAS*, cuja principal função é regular processos celulares como o crescimento e a diferenciação (Karnoub & Weinberg, 2008).

Os proto-oncogenes são genes normais que são ativados em oncogenes por um processo de tradução, estando presentes nos retrovírus de transformação aguda. No caso dos mamíferos, o oncogene relacionado com o vírus do sarcoma Harvey deu origem ao *Ha-ras*, enquanto o do vírus Kirsten originou o *Ki-ras*, sendo estes designados em humanos como *H-RAS* (Harvey Rat sarcoma viral oncogene homolog) e *K-RAS* (Kirsten Rat sarcoma viral oncogene homolog) (Karnoub & Weinberg, 2008). Por sua vez, o *NRAS* (Neuroblastoma RAS homolog) é outro membro da família *RAS*, mas não é codificado por um vírus, tendo sido identificado numa linha celular de neuroblastoma (Holderfield, 2018).

A maioria das mutações (cerca de 85%) ocorre no gene *KRAS*, estando associadas nomeadamente a tumores do pulmão, pâncreas e cólon. As mutações no gene *NRAS* representam aproximadamente 11%, sendo mais comuns no sangue e tiróide. Já as mutações no *HRAS* são as mais raras (cerca de 4%) e observam-se sobretudo no sistema urinário e também na tiróide (Burge & Hobbs, 2022).

O gene *KRAS* quando está mutado, contribui para a progressão tumoral pois a sua proteína mutada desencadeia o descontrolo na cascata de sinalização celular (Hobbs et al., 2016). Tendo isto em conta, este trabalho irá centrar-se no gene *KRAS*, dada a sua importância clínica e elevada taxa de mutações em várias neoplasias, incluindo casos de melanoma.

1.3.2 O papel do gene *KRAS* na sinalização celular e regulação de vias de proliferação

O gene *KRAS* desempenha um papel fundamental na transdução de sinal, participando na regulação de processos celulares essenciais como o crescimento, diferenciação, sobrevivência e metabolismo (Stephen et al., 2014). A proteína codificada por este gene, *KRAS*, pertence à família de pequenas GTPases (enzimas que hidrolisam GTP), atuando como um interruptor que alterna entre um estado ativo, ligado ao GTP (trifosfato de guanosina), e um estado inativo, ligado ao GDP (guanossina difosfato). Esta alternância depende da ação do EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), que é ativado por recetores tirosina cinase em resposta à presença de fatores de crescimento (Pylayeva-Gupta et al., 2011 ; Cox et al., 2014).

A proteína *KRAS* contém dois domínios principais: o domínio G, responsável pela ligação aos nucleótidos de guanina, e a região hipervariável na extremidade C-terminal, essencial para a sua localização na membrana plasmática. Esta extremidade inclui uma modificação pós-traducional, a farnesilação, que atua como uma âncora entre a proteína e a membrana celular, permitindo a ancoragem da proteína à membrana celular e assim realizar a ativação eficiente das vias de sinalização (Figura 4) (Zhou et al. 2017 ; Burge & Hobbs, 2022).

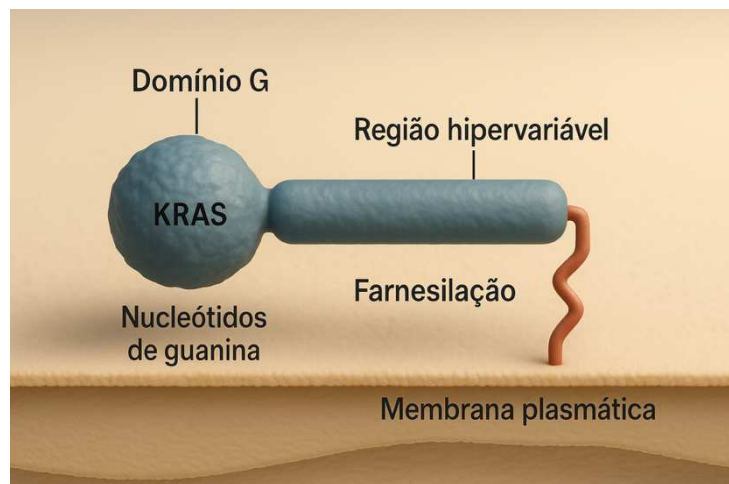


Figura 4 - Estrutura da proteína *KRAS*, com destaque do domínio G, da região hipervariável e da extremidade farnesilação. (Figura elaborada pela autora na plataforma *BioRender* e com adaptações feitas com auxílio de inteligência artificial)

A regulação da atividade de *KRAS* depende ainda da ação das proteínas GAPs (GTPase, proteínas ativadoras), que aceleram a hidrólise do GTP para GDP, promovendo o retorno da proteína ao seu estado inativo. Este mecanismo de retroalimentação negativo é o alvo de muitas mutações somáticas mais comuns nos genes da família *RAS*, uma vez que impede a desconexão adequada da sinalização (Ferreira et al., 2022).

KRAS participa na ativação de várias vias de sinalização intracelular associadas à proliferação celular, diferenciação, inibição da apoptose e reprogramação metabólica. Entre estas destacam-se as vias PI3K/AKT/mTOR, RAF/MERK/ERK e RalGDS/NF- κ B (Figura 5). Estas vias contribuem para uma homeostasia celular, contudo a presença de mutações em *KRAS* pode conduzir a uma sinalização exacerbada, criando um ambiente tumoral favorável (Mendoza et al., 2011; Prior et al., 2012).

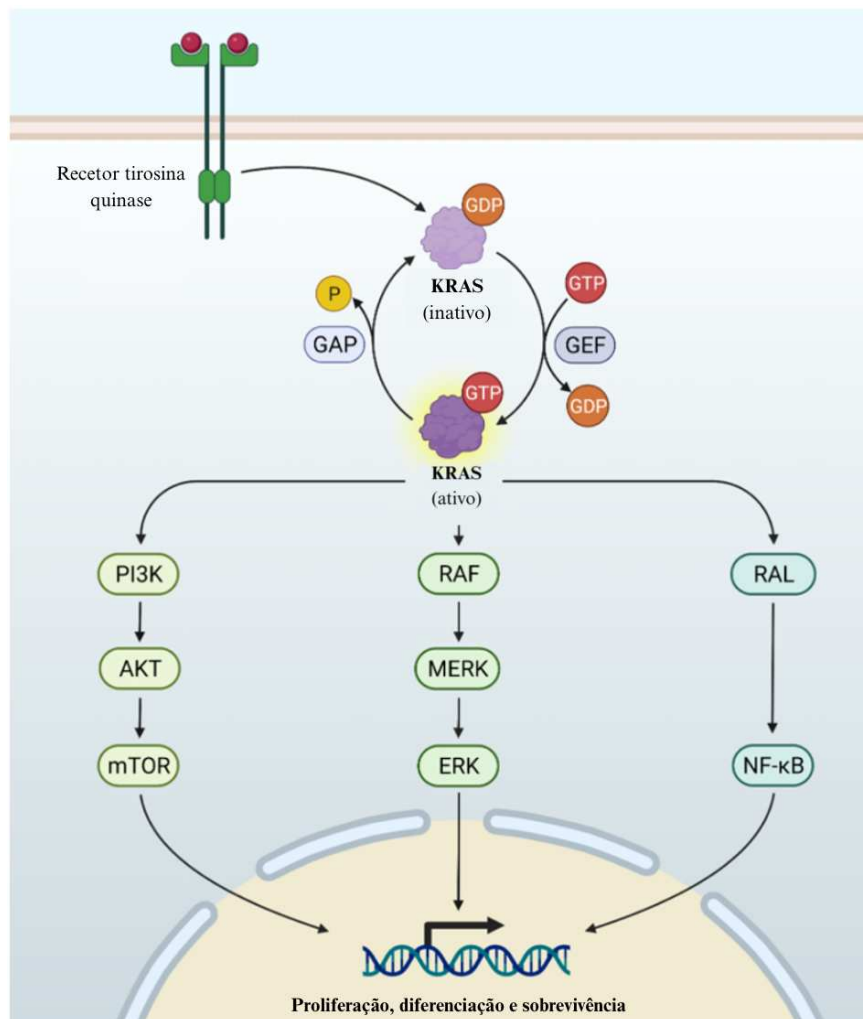


Figura 5 - As vias de sinalização intracelular (Adaptado de [BPS Bioscience, n.d.], com modificações feitas pela autora através da plataforma *BioRender*)

A ativação de *KRAS* promove a independência celular aos sinais de controlo do crescimento. A célula mutada pode assim progredir autonomamente no ciclo celular, passando da fase de repouso (G0) para a fase de crescimento (G1) e, posteriormente, para a fase de síntese de ADN (S). Este avanço é regulado por proteínas como a ciclina D, que em contexto com as cinases dependentes de ciclina CDK4 e CDK6, fosforila a proteína de retinoblastoma (Rb), liberta o fator de transição E2F entrando a célula em fase S. O ciclo celular progride com a ativação de outros complexos ciclinas e cinases dependentes de ciclina. A proteína *KRAS* pode aumentar os níveis da ciclina D e inibir a ação de p27, um inibidor desta ciclina, favorecendo a proliferação (Ash et al., 2024).

Por outro lado, a proteína *KRAS* interfere com a ação do TGF- β (Transforming Growth Factor beta), um potente inibidor da proliferação e supressão tumoral. A *KRAS* pode reduzir a expressão deste fator ou inibir a sua via de sinalização, comprometendo os mecanismos naturais de controlo da divisão celular (Kubiczkova et al., 2012).

A ativação de *KRAS* causa replicação descontrolada do ADN, resultando em instabilidade genómica. Para lidar com esses erros, a célula pode entrar em senescência celular (um estado de paragem do ciclo celular) ou iniciar a apoptose (morte celular programada), muitas vezes mediada pela via RAF-p53. Para além disso, esta via pode ativar proteínas da família BCL-2 pró-apoptóticas como a BAX, BAD e BAK, que promovem a ativação de caspases (como a caspase-3) (Ferreira et al., 2022).

Por outro lado, a *KRAS* ativa vias com efeito anti-apoptótico, a via RAS-PI3K, que regula os níveis inibidores da apoptose (IAPs) e da proteína BAX, e a via RAS-RAF, que reduz a atividade da proteína PAR4 (pró-apoptótica) e aumenta a expressão de ARC (um inibidor da apoptose mediada por caspase). Ambas as vias contribuem ainda para a inativação de BAD. Caso os mecanismos de reparação falhem, as lesões acumuladas no genoma poderão originar mutações e contribuir para a transformação celular maligna de ADN (Ash et al., 2024).

1.3.3 Mutações relevantes no gene *KRAS*: codões 12, 13 e 61

De acordo com a investigação de Burge & Hobbs (2022), já foram identificadas mais de 150 mutações no gene *KRAS*, com especial destaque para as posições 12 e 13, onde se encontra o aminoácido glicina, e para a posição 61, correspondente à glutamina. Dados epidemiológicos mostram que cerca de 90% das mutações em *KRAS* ocorrem no codão 12, aproximadamente 5% no codão 13 e entre 1% a 2% no codão 61. Esta última é a mais frequente noutros membros da família *RAS*, como o *NRAS*, nomeadamente em casos de melanoma.

Estas mutações comprometem a ligação entre a proteína *RAS* e a GAP (proteína ativadora de GTPase), que tem como função acelerar a hidrólise de GTP. Ao interferirem com o posicionamento correto da glutamina, aminoácido essencial para essa função catalítica, essas alterações impedem a *RAS* de se desligar do GTP. Como resultado, a *RAS* permanece ativa durante mais tempo, ativando de forma mais prolongada as vias de sinalização associadas (Holderfield, 2018 ; Ash et al., 2024).

Estas mutações variam conforme a forma da proteína, o tipo de cancro e a exposição de certos tecidos a agentes cancerígenos (Prior et al., 2012). A distribuição mais comum por codão é a seguinte:

- Codão 12: a mutação mais frequente é a G12D, comum no adenocarcinoma do pâncreas, seguida de G12V
- Codão 13: a mutação G13D
- Codão 61: a mutação Q61H

A Tabela 3 apresenta as mutações mais frequentes por codão (G12, G13 e Q61) em diferentes tipos de cancro, destacando a sua prevalência relativa em cada contexto oncológico (Huang et al., 2021).

Tabela 3 - As mutações mais frequentes por codão (G12, G13 e Q61) em diferentes tipos de cancro, destacando a sua prevalência relativa em cada contexto oncológico (adaptado de [Huang et al., 2021], com modificações feitas pela autora)

Tipos de Tumor	G12D	G13D	Q61H	Taxa Total
Adenocarcinoma do pâncreas	62,30%	0,83%	4,23%	67,61%
Adenocarcinoma colorretal	22,82%	6,68%	1,67%	35,77%
Carcinoma pulmonar de não pequenas células	17,39%	0,85%	0,31%	20,42%
Cancro da via biliar	8,96%	1,12%	1,12%	12,69%
Carcinoma endometrial uterino	10,38%	1,78%	0,63%	14,11%
Cancro de células germinativas testiculares	6,92%	0,00%	1,98%	11,66%
Carcinoma de células escamosas do colo do útero	2,47%	0,99%	0,00%	4,28%

1.3.4 Alterações no *KRAS*: neoplasias cutâneas e influência ambiental

Como já foi referido, as mutações no gene *KRAS* mantêm a proteína numa forma constantemente ativa, o que leva a uma sinalização celular contínua, mesmo na ausência de estímulos externos. Esta atividade desregulada contribui para a formação e progressão do cancro, ao promover a proliferação celular descontrolada, a evasão dos mecanismos de morte celular (apoptose) e a transformação maligna das células (Hayward et al., 2017).

Embora estas mutações sejam mais frequentes em tumores pancreáticos, pulmonares e colorretais, também têm sido identificadas em neoplasias cutâneas, como o melanoma.

O melanoma com mutações em *KRAS* tende a apresentar uma elevada carga mutacional total, isto é um marcador quantitativo de instabilidade genómica, correspondente ao número de mutações somáticas numa amostra tumoral e está associado a maior agressividade tumoral e resistência aos tratamentos convencionais (Akbari et al., 2015 ; Rabbie et al., 2020; Xu et al., 2024).

A instabilidade genómica pode ser desencadeada por fatores ambientais, como a radiação UV que induz a produção de ROS. Estas espécies provocam lesões oxidativas no ADN e podem levar à transformação maligna dos melanócitos. Tanto a radiação UVA como UVB são capazes de gerar ROS e, se estas lesões não forem reparadas adequadamente, podem surgir mutações com potencial oncogénico (Garcia-Mouronte et al., 2024; Venza et al., 2015).

Para além da radiação UV, a exposição a agentes químicos e a lesões cutâneas repetidas, como acontece com tatuagens, também são fatores relevantes devido ao seu potencial genotóxico (Schreiver et al., 2017).

Importa destacar que estes fatores externos não atuam de forma isolada. A predisposição genética, a suscetibilidade individual e o estado do sistema imunitário são igualmente determinantes. Por exemplo, uma inflamação crónica da pele, como pode ocorrer em zonas tatuadas, cria um ambiente favorável a erros na replicação do ADN e falhas nos mecanismos de reparação, o que pode aumentar o risco de mutações e contribuir para o desenvolvimento de tumores cutâneos (Kay et al., 2019).

1.3.5 Lacunas na literatura e justificação do presente estudo

Tem-se debatido a possível relação entre tatuagens e o desenvolvimento de cancro de pele, sobretudo devido à presença de substâncias potencialmente cancerígenas nas tintas, como sais metálicos e corantes orgânicos. No entanto, até ao momento, não existem evidências científicas robustas que estabeleçam uma ligação causal direta. Os casos de cancro identificados em zonas tatuadas são, na maioria das vezes, considerados coincidência, sendo necessária mais investigação para esclarecer esta possível associação (Kluger & Koljonen, 2012).

Apesar da crescente popularidade das tatuagens, continuam a faltar estudos científicos que investiguem diretamente a sua relação com o cancro de pele. Em particular, são escassos os estudos em grande escala, especialmente *in vivo*, que avaliem a presença de pigmentos na pele, os seus subprodutos e os possíveis efeitos mutagénicos associados.

Outro ponto importante é a ausência de dados consistentes sobre os hábitos de exposição solar das pessoas tatuadas. A radiação UV, sendo um agente carcinogénico, pode interagir com os pigmentos das tatuagens e potencialmente aumentar o risco de desenvolvimento de tumores cutâneos (Garcia-Mouronte et al., 2024).

Além disso, atualmente não existem dados sobre tatuagens no Registo Oncológico Nacional (RON). A inclusão desta informação seria relevante para se obter uma visão mais clara da sua prevalência e do seu impacto na saúde pública (Registo Oncológico Nacional, 2023).

Neste contexto, o presente estudo surge da necessidade de explorar uma possível associação entre tatuagens e mutações genéticas, com especial destaque na genotipagem do oncogene *KRAS*, contribuindo assim para colmatar uma lacuna existente na literatura científica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

O objetivo principal deste estudo é verificar a presença no ADN de mutações no codão 12 do gene *KRAS* em estudantes tatuados da Egas Moniz School of Health and Science.

2.2 Objetivos secundários

Este estudo tem como objetivos secundários:

- Avaliar a viabilidade da genotipagem do gene *KRAS* em amostras biológicas de indivíduos tatuados;
- Identificar possíveis limitações metodológicas, como a qualidade do ADN ou eficiência dos primers;
- Estimar a prevalência da mutação no codão 12 do gene *KRAS* na amostra selecionada.

3. Materiais e Métodos

3.1 Desenho de Estudo

Foi realizado um estudo piloto experimental, com metodologia mista (quantitativa e qualificativa), em pequena escala.

Esta abordagem foi escolhida por se tratar de uma primeira investigação nesta população específica (estudantes tatuados da Egas Moniz School of Health and Science) e por possibilitar uma análise preliminar de eventuais correlações entre tatuagens e mutações genéticas, um tema ainda pouco estudado.

O estudo decorreu nas instalações da Egas Moniz School of Health and Science entre os meses de janeiro e abril de 2025.

3.2 População e Amostra

A população-alvo constituída por estudantes universitários da instituição Egas Moniz School of Health and Science de ambos os sexos.

3.2.1 Cálculo da dimensão amostral

A amostra-alvo como objetivo 20 estudantes, número que se enquadra nas recomendações metodológicas para estudos piloto com componente laboratorial. Esta dimensão amostral foi alcançada com base na literatura científica, que frequentemente indica um mínimo de 20 participantes para garantir a validade dos resultados obtidos em estudos com técnicas moleculares.

Esta amostra é um tipo de amostragem não probabilística, por conveniência, uma vez que os participantes que foram selecionados entre os estudantes da Egas Moniz School of Health and Science apresentavam tatuagens e manifestaram interesse em participar. Esta abordagem foi considerada adequada para os objetivos de um estudo piloto, de carácter exploratório.

3.2.2 Critérios de elegibilidade

Os critérios de elegibilidade são:

1. Estudantes saudáveis sem doenças dérmicas;
2. Tatuagem de tinta preta;
3. Tatuagem localizada nos membros superiores (ombro, braço, antebraço ou mão);
4. Tatuagem com diâmetro mínimo de 2 centímetros;
5. Tatuagem realizada no mínimo há 2 anos.

3.3 Registo e documentação das tatuagens

Após a aplicação dos critérios de elegibilidade, foi realizado o registo fotográfico das tatuagens dos participantes incluídos no estudo com o objetivo de proceder à sua caracterização visual. Foram considerados aspetos como a localização anatómica e a dimensão aproximada.

As fotografias foram obtidas em ambiente controlado, utilizando luz natural, de modo a garantir a uniformidade e qualidade das imagens. Para assegurar a fiabilidade das medições e permitir a comparação entre participantes, foi construída uma régua forense plastificada especificamente para este estudo. Esta régua foi posicionada junto à tatuagem no momento da captura da imagem, permitindo uma estimativa precisa da sua dimensão real.

As imagens foram posteriormente codificadas e armazenadas de forma segura, sendo utilizadas exclusivamente como suporte à análise descritiva e científica dos dados recolhidos, sem qualquer finalidade de identificação pessoal.

Alguns exemplos das imagens recolhidas encontram-se disponíveis no Anexo III (Registo fotográfico padronizado das tatuagens dos participantes com escala forense). Importa referir que, por razões metodológicas e éticas, estas imagens incidem exclusivamente sobre a zona de raspagem.

3.4 Recolha de Informação

Os dados de elegibilidade foram obtidos presencialmente, através de uma breve entrevista oral, conduzida pelo investigador. Durante este contacto, foram colocadas questões

específicas relacionadas com os critérios de inclusão e exclusão previamente definidos, em formato de questionário, de forma a assegurar a conformidade de cada participante com os requisitos do estudo.

O questionário apresenta duas secções de metodologia de resposta aberta e fechada com uma duração média de 1 a 2 minutos, criado a partir da ferramenta Microsoft Forms.

Na primeira secção do questionário, abordou-se a caracterização sociodemográfica tendo em conta o género e a idade.

Na segunda secção do questionário, caracterizou-se a informação relativa à tatuagem de modo a estar de acordo com os critérios pré-estabelecidos.

O questionário foi preenchido, *a posteriori* pelo investigador, com base nas respostas fornecidas pelo inquirido (Anexo II) .

3.5 Certificado de Originalidade

Declaro que sou responsável pelo trabalho submetido neste projeto e que o trabalho é original, não sendo plagiado de outra fonte, excetuando o especificado nas referências. Informo ainda que apenas recorri a inteligência artificial para a criação de ilustrações e esquemas, não tendo sido utilizada para o desenvolvimento do conteúdo escrito.

3.6 Ética e confidencialidade

Este estudo foi submetido pela Comissão de Ética da Egas Moniz School of Health and Science, com o número PT-413/23, tendo sido aprovado no dia 26 de Janeiro de 2024.

No decorrer da realização do questionário foi respeitada a ética e a confidencialidade dos resultados da população, de modo a garantir a privacidade dos participantes e a fidedignidade dos dados recolhidos.

Foi entregue e assinado um termo de consentimento informado, garantindo a participação voluntária e consciente no estudo.

3.7 Fluxograma do estudo

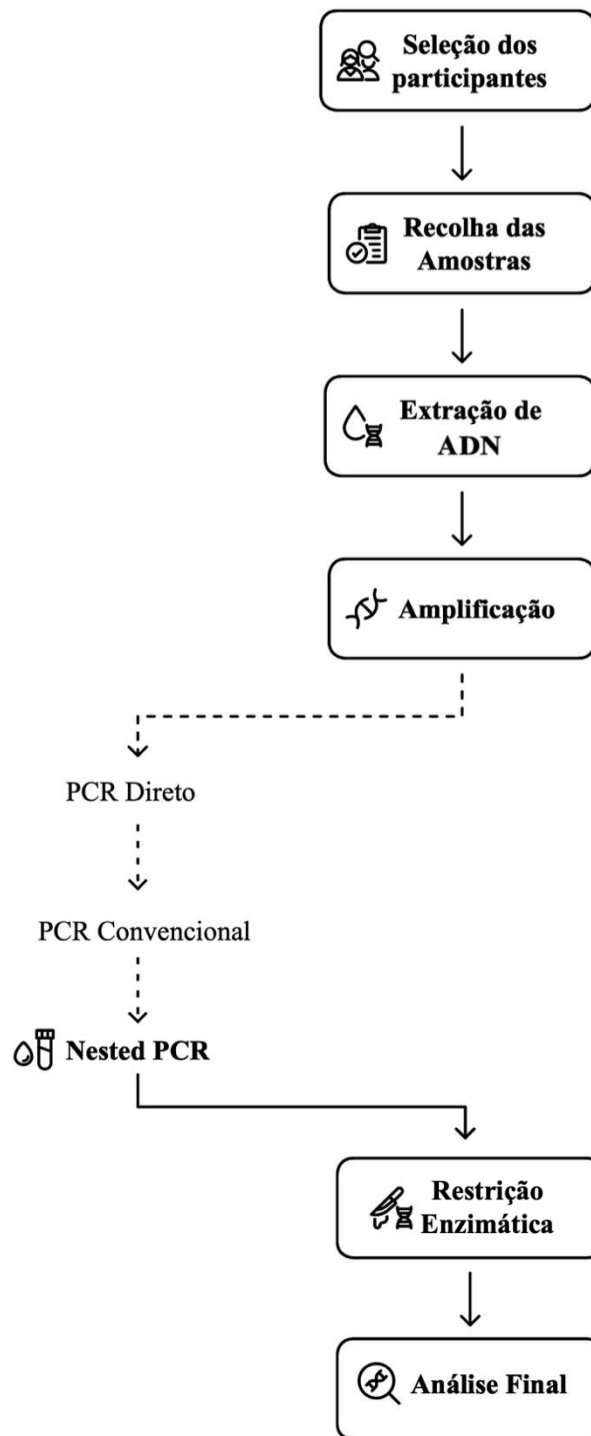


Figura 6 - Fluxograma do desenho do estudo (Figura elaborada pela autora, com adaptações feitas na plataforma *Napkin AI*)

3.8 Extração de ADN

Com o objetivo de se extrair uma amostra pura de ADN foi necessário recorrer a um kit de isolamento de tecidos de ADN do fabricante NZYtech (NZY Tissue DNA Isolation Kit), cuja metodologia se baseia em colunas de centrifugação revestidas com sílica.

Os componentes disponibilizados estão discriminados na lista subseqüente:

- Buffer NT1;
- Buffer NL;
- Buffer NW1;
- Buffer NW2 (concentrado);
- Buffer NE;
- Proteinase K (liofilizada);
- Buffer Proteinase;
- Colunas de tecido NZYSpin;
- Tubos de colheita.

Para além dos componentes fornecidos pelo kit foi necessário adquirir:

- Luvas látex;
- Micropipetas e Pontas de 10 μ l , 20 μ l e 1000 μ l;
- Suporte e Tubos de microcentrifugação 2mL;
- 96-100% Etanol;
- Cronómetro;
- Agitador vórtex;
- Máquina de centrífuga;
- Bloco seco de aquecimento.

A purificação das amostras envolve várias etapas, desde a preparação inicial até ao armazenamento final e foi realizada segundo as instruções do fabricante.

1. Colheita do ADN

Procedeu-se à raspagem das células epiteliais durante 30 segundos, utilizando-se uma swab de algodão com cabo de plástico descartável estéril. Em seguida, foi introduzida num tubo de microcentrifugação de 2mL.

2. Pré-lise

Ao tubo de microcentrifugação foi adicionado 400µl de NT1 e 25µl de solução de Proteinase K. A mistura foi homogeneizada por dois ciclos de 10 segundos num agitador vórtex e incubada a 56 °C durante 10 minutos no bloco seco de aquecimento.

Após a incubação, a swab foi descartada e o lisado foi transferido para um novo tubo de microcentrifugação de 2mL.

3. Lise

Adicionou-se 400µl de Buffer NL e homogeneizou-se no agitador vórtex. A mistura foi incubada a 70°C por 10 minutos.

4. Precipitação

Para garantir a separação da solução (contendo impurezas) da fase insolúvel (ADN), foi necessário adicionar 400µl de etanol a 96-100%, uma vez que o etanol facilita a precipitação e concentração do ADN, promovendo a remoção de contaminantes. Após a precipitação, o tubo de microcentrifugação foi colocado no agitador vórtex para homogeneização.

5. Ligação do ADN

Transferiu-se 600µl do tubo de microcentrifugação para a coluna de tecido NZYSpin. Procedeu-se à centrifugação a 11,000 xg durante 1 minuto, descartou-se o efluente e a coluna foi reposicionada num novo tubo de colheita. O ADN precipitado ficou aprisionado na membrana de sílica.

6. Lavagem da membrana de sílica

Foram adicionados 500 µL do Buffer NW1 à coluna de tecido NZYSpin, seguida de centrifugação a 11,000 xg durante 1 minuto. O efluente foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo de colheita.

Em seguida, adicionaram-se 600 μL do Buffer NW2, procedendo-se à centrifugação nas mesmas condições, com posterior descarte do efluente.

7. Secagem da membrana de sílica

Após reposição da coluna de tecido NZYSpin no tubo de colheita, procedeu-se à centrifugação a 11,000 xg por 2 minutos.

8. Eluição do ADN

A coluna de tecido NZYSpin foi transferida para um novo tubo de microcentrifugação, ao qual se adicionaram 50 μL do tampão NE previamente aquecido a 70 °C num bloco seco de aquecimento. A amostra foi incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos, seguida de centrifugação a 11,000 xg durante 2 minutos.

9. Quantificação do ADN por NanoDrop One

O NanoDrop One é um espectrofotómetro que permite a quantificação de ácidos nucleicos (DNA/RNA) e respetivos graus de pureza (A260/A280, A260/A230).

Todas as amostras (2 μL de cada) foram analisadas quantitativamente e qualitativamente.

10. Armazenamento

O ADN genómico foi conservado a -20°C.

3.9 Adaptações metodológicas

Durante o desenvolvimento do estudo, foi necessário efetuar diversas adaptações metodológicas. Foi testada a extração de ADN com uma Swab em condições secas e húmidas (passagem de um papel embebido em água sobre a superfície de teste), optando-se posteriormente, pela técnica húmida devido às melhores concentrações de ADN extraído reveladas pela espectrofotometria NanoDrop One.

Inicialmente, estava prevista a amplificação dos produtos de reação por PCR (Polymerase Chain Reaction) direto. Contudo, face aos resultados insatisfatórios, como a baixa nitidez das bandas na eletroforese em gel, que comprometeu a sua visualização e análise, procedeu-se à utilização da técnica de PCR convencional.

Face à limitação dos resultados obtidos, foi implementada uma estratégia de Nested PCR, baseada na repetição da reação de amplificação para potenciar a concentração do produto final.

3.10 Protocolo de amplificação por Nested PCR

3.10.1 Descrição do protocolo de Nested PCR

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite a amplificação de regiões específicas do ADN através de ciclos repetidos de desnaturação, hibridação de primers e extensão pela ADN polimerase. Para aumentar a especificidade e sensibilidade da amplificação, pode ser utilizado o método Nested PCR, que consiste em duas etapas sequenciais: uma primeira amplificação, seguida de uma segunda, com primers específicos direcionados a uma sequência interna do produto inicial. Este método reduz a amplificação de fragmentos inespecíficos e permite a deteção precisa de sequências-alvo, mesmo em amostras com baixo teor de ADN ou contaminadas (Mothershed & Whitney, 2006; Schanfield, 2003).

Todas as etapas do protocolo, foram realizadas integralmente sob condições assépticas numa câmara de fluxo laminar vertical (hotte), de forma a minimizar o risco de contaminação e garantir a fiabilidade dos resultados obtidos nas reações de PCR. Durante todo o processo, foram utilizadas pontas com filtro para evitar contaminações cruzadas.

Os dois pares de primers utilizados neste protocolo, partilham a mesma sequência e foram desenhados para amplificar a região do exão 2 do gene *KRAS*, onde se encontra o codão 12 (Gauthaman & Moorthy, 2021).

Primer Forward: 5'- ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT - 3'

Primer Reverse: 5'- TCAAAGAATGGTCCTGGACC-3'

1. Diluições

Para a preparação dos primers, foram efetuadas duas diluições distintas consoante a sua cor. Os primers azuis foram diluídos na proporção de 1:5, utilizando-se 2 μL de primer e 8 μL de água destilada. Os primers transparentes tiveram uma diluição de 1:1, sendo preparados com 5 μL de primer e 5 μL de água destilada. No final em todos os tubos obtivemos a concentração de 10 μM .

2. Mistura-Mãe (Master Mix) por reação

A mistura de reação foi preparada com os seguintes volumes: 12,5 μL de MyTaq, 1,0 μL de Primer Forward e 1,0 μL de Primer Reverse, totalizando 14,5 μL por reação. Utilizou-se o Kit Taq polimerase Green Master Mix (NZYTech).

3. Montagem das Reações de PCR

Foram realizadas reações de PCR para um total de 16 indivíduos, cada um com duas amostras, perfazendo 32 amostras no total. A estas juntou-se um controlo negativo, somando assim 33 reações. Como foram utilizados dois pares de primers distintos, cada amostra foi amplificada em duplicado, resultando num total de 66 tubos de PCR.

4. Distribuição Volumétrica por Reação

Tabela 4 - Distribuição volumétrica dos componentes utilizados nas reações experimentais para a amostra e para o controlo negativo (Tabela elaborada pela autora)

	Amostra	Controlo negativo
Mistura-Mãe (μL)	14,5	14,5
ADN (μL)	10,5	-
Água (μL)	-	10,5
Volume Final (μL)	25,0	25,0

Uma vez concluído o primeiro ciclo de PCR, procedeu-se à realização de um segundo PCR com as mesmas condições e reagentes, utilizando como molde o produto amplificado da primeira reação. Este segundo passo, característico de um protocolo de Nested PCR, permite aumentar a especificidade e sensibilidade da amplificação, reduzindo a probabilidade de amplificação inespecífica e garantindo maior fidelidade nos resultados.

3.10.2 Definição do programa de Nested PCR

Após a preparação das reações segundo o protocolo descrito, os produtos de PCR foram introduzidos num termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad). As diferenças observadas, nomeadamente a cor distinta das tampas (azul e transparente), sugeriram a possibilidade de haver variações nos lotes. Esta abordagem permitiu comparar diferentes condições, uma vez que após várias tentativas com distintos programas, este conjunto de parâmetros revelou-se o mais eficaz.

Assim, procedeu-se à implementação de dois protocolos distintos de PCR, com respetiva análise das diferenças de cada etapa:

Tabela 5 - Parâmetros e condições dos dois protocolos distintos de PCR implementados, detalhando as etapas e respectivas diferenças entre os primers F1/R1 (tampa azul) e F2/R2 (tampa transparente) (Tabela elaborada pela autora)

Etapa	Primer F1/R1 (Tampa azul)	Primer F2/R2 (Tampa transparente)
Desnaturação inicial	95 °C durante 5 minutos	96 °C durante 10 minutos
Número de ciclos	35 ciclos	30 ciclos
Desnaturação (por ciclo)	95 °C durante 40 segundos	96 °C durante 1 minuto
Hibridação (por ciclo)	65 °C durante 45 segundos	57 °C durante 1 minuto
Extensão (por ciclo)	72 °C durante 50 segundos	73 °C durante 30 segundos
Extensão final	72 °C durante 10 minutos	73 °C durante 7 minutos

- **Desnaturação inicial e desnaturação por ciclo:**

No primer F2/R2 garantiu-se uma amplificação mais eficaz do ADN, em regiões com estrutura secundária ou alto conteúdo guanina-citosina, através da temperatura e do tempo mais elevados.

- **Hibridação:**

No Primer F1/R1 foi utilizado uma temperatura mais elevada (65 °C) para promover uma maior especificidade na ligação.

No primer F2/R2 valorizou-se condições mais abrangentes de ligação, através da menor temperatura (57°C).

- **Extensão:**

72°C e 73°C são as temperaturas ideais para a atividade da Taq polimerase (Saraswathy & Ramalingam, 2011).

A diferença no tempo permitiu analisar se o prolongamento da extensão impactava positivamente o rendimento da reação.

- **Número de ciclos e extensão final:**

Um maior número de ciclos e uma extensão prolongada são estratégias para garantir uma amplificação suficiente, especialmente em casos de baixa concentração inicial de ADN ou baixa eficiência de reação.

Esta duplicação experimental assumiu um papel crucial para garantir a reprodutibilidade e fiabilidade dos resultados, verificando que ambos os pares de primers originavam um padrão de bandas idêntico.

3.11 Protocolo da restrição enzimática - método de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

A técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) baseia-se na utilização de enzimas de restrição para identificar variações na sequência de ADN. Estas enzimas reconhecem sequências específicas e hidrolisam o ADN nesses locais. Quando ocorrem mutações nos locais de reconhecimento, o padrão de fragmentação do ADN é alterado, originando fragmentos de diferentes comprimentos. A análise destes padrões, obtidos após eletroforese em gel de agarose, permite a detecção indireta de mutações específicas, sendo uma metodologia amplamente utilizada na genotipagem e em estudos de variabilidade genética (Kumar et al., 2023).

A reação de restrição enzimática foi preparada em bancada, seguindo rigorosamente boas práticas laboratoriais para evitar contaminações. Para cada reação, foi preparada uma mistura-mãe composta por 3 μL de tampão de restrição (Buffer), 1 μL da enzima BstNI (*Bacillus stearothermophilus* NI) e 1 μL de água ultrapura, totalizando 5 μL por reação. Esta mistura foi distribuída em alíquotas individuais até atingir um volume final de 30 μL por tubo.

3.12 Protocolo da eletroforese gel

Após a restrição enzimática, os produtos foram submetidos a análise por eletroforese em gel de agarose a 4% (p/v). Para cada amostra, foi preparada uma mistura composta por 5 μL de azul de bromofenol (Loading dye blue) e 5 μL de ADN, totalizando 10 μL , volume que foi carregado diretamente em cada poço do gel. Este tampão de carga contém glicerol ou sacarose, que aumenta a densidade da solução, facilitando a deposição da amostra no fundo dos poços e evitando a sua dispersão. Adicionalmente, o azul de bromofenol atua como referência visual, deslocando-se à frente dos fragmentos de ADN e permitindo acompanhar em tempo real o progresso da eletroforese (Scientific, 2012). Para permitir a estimativa do tamanho dos fragmentos obtidos, foi aplicado 7 μL de marcador de peso molecular (Ladder VI da NZYTech).

3.13 Análise estatística de dados

Inicialmente, estava previsto realizar uma análise estatística inferencial utilizando o software R (versão 4.0), recorrendo ao teste do qui-quadrado (χ^2) com um nível de significância de 5% e um intervalo de confiança de 95%. O objetivo era verificar se existiam associações estatisticamente significativas entre as variáveis genéticas e as características das tatuagens.

Contudo, o número reduzido de amostras viáveis ($n=5$) impediu o cumprimento dos pressupostos necessários para uma análise estatística robusta. Diante disso, optou-se por uma análise descritiva simples, baseada na distribuição percentual dos resultados. Esta abordagem permitiu apresentar uma visão inicial sobre a presença ou ausência de mutações no codão 12 do gene *KRAS* nos indivíduos analisados.

4. Compreensão e expectativas da genotipagem do *KRAS*

Antes da restrição com a enzima de restrição BstNI, o produto de PCR amplificado intacto do gene *KRAS* tem um tamanho de 157 pares de bases (pb).

Depois da restrição com a enzima, este produto pode ser hidrolisado em diferentes fragmentos, dependendo de existir ou não uma mutação no codão 12. A interpretação baseia-se no padrão de bandas observado após a eletroforese em gel de agarose a 4%:

- Tipo Selvagem (Wild Type - sem mutação)

A sequência amplificada contém o local de restrição reconhecido pela enzima BstNI, o que resulta no corte em três fragmentos: 111 pb, 29 pb e 17 pb.

Apenas a banda de 111 pb costuma ser visível no gel, pois os fragmentos mais pequenos (29 pb e 17 pb) migram rapidamente e podem não ser detetáveis.

- Mutação Heterozigótica (uma cópia normal e uma cópia mutada)

A enzima BstNI atua sobre a cópia normal do gene, hidrolisando-a. No entanto, a sequência mutada não é reconhecida pela enzima e permanece quase intacta, como um fragmento de 140 pb.

Na eletroforese, isto traduz-se na visualização de duas bandas: uma de 111 pb (proveniente da cópia normal) e outra de 140 pb (indicando a presença de mutação). A banda de 17 pb pode estar presente, mas provavelmente não será visível devido ao seu tamanho pequeno.

- Mutação Homozigótica (para ambas as cópias mutadas)

Quando ambas as cópias do gene estão mutadas, o sítio de corte da enzima é perdido e não há restrição do produto de PCR pela BstNI. Como resultado, a sequência permanece quase intacta, resultando numa banda de 140 pb.

Desta forma, o padrão de bandas observado na eletroforese permite distinguir os diferentes genótipos, conforme detalhado nas Figuras 7 e 8.

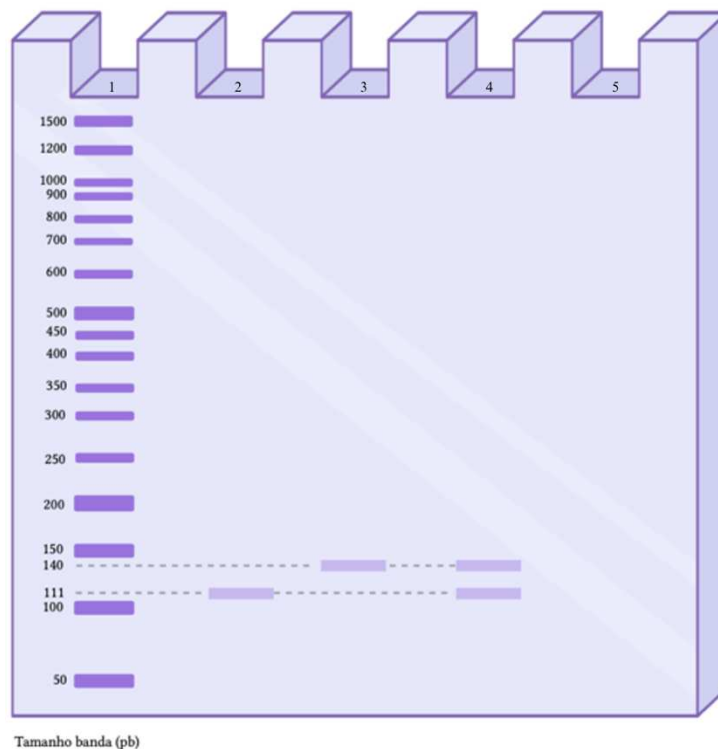


Figura 7 - Padrão de bandas observadas na eletroforese para a identificação dos genótipos. 1- Marcador de peso molecular (NZYDNA Ladder VI); 2- Genótipo wild type (selvagem) sem mutação; 3- Genótipo homozigótico mutado; 4- Genótipo heterozigótico mutado. (Figura elaborada pela autora, com adaptações feitas na plataforma *BioRender*)

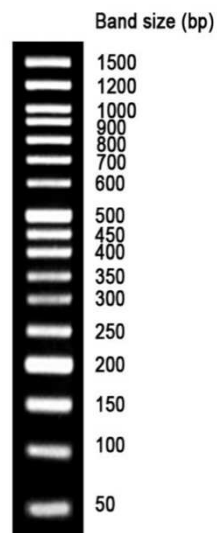


Figura 8 - Representação esquemática da NZYDNA Ladder VI (50–1500 pb), utilizada como marcador de peso molecular para estimar o tamanho dos fragmentos de ADN obtidos por PCR. (Figura retirada de NZYtech, s.d.)

5. Resultados

Todas as amostras de ADN foram extraídas utilizando o NZY Tissue DNA Isolation Kit (NZYtech). No total, foram consideradas dez amostras viáveis, cujo ADN foi analisado tanto quantitativamente como qualitativamente. Verificou-se que, na maioria dos casos, as concentrações de ADN obtidas foram baixas. A tabela abaixo apresenta, a título de exemplo, os valores de concentração das amostras 1,5 e 6, extraídas através de uma zaragatoa húmida.

Tabela 6 - Concentrações de ADN das amostras 1,5 e 6 obtidas pelo NanoDrop One com absorvância a 260nm. “T” corresponde à amostra recolhida no braço tatuado.

Amostra	ng/ μ L
1	102.6
1T	177.1
5	233.4
5T	247.3
6	63.1
6T	38.1

De 16 participantes, apenas cinco (1, 5, 6, 7 e 8) apresentaram ADN com qualidade suficiente para a realização da análise molecular. De um total de dez amostras válidas (duas por participante), oito exibiram um padrão de fragmentação de restrição de bandas caracterizado por uma banda única de 111 pb. As amostras do participante número 1 (A1) destacaram-se das restantes por apresentarem uma única banda de 140 pb, tanto no braço sem a tatuagem como no braço com tatuagem.

As 22 amostras restantes, correspondentes a 11 participantes, foram excluídas devido à baixa concentração, degradação, ausência de material genético ou de amplificação, o que impossibilitou a interpretação dos resultados.

A Figura 9 apresenta os perfis de bandas obtidos por eletroforese em gel de agarose, organizados por número de participante, sendo que “T” indica a amostra recolhida no braço tatuado. Os resultados permitem distinguir visualmente os diferentes genótipos identificados. O controlo negativo, correspondente ao poço número 2 no gel de agarose,

não revelou nenhuma banda visível após a amplificação e a restrição enzimática como seria esperado.

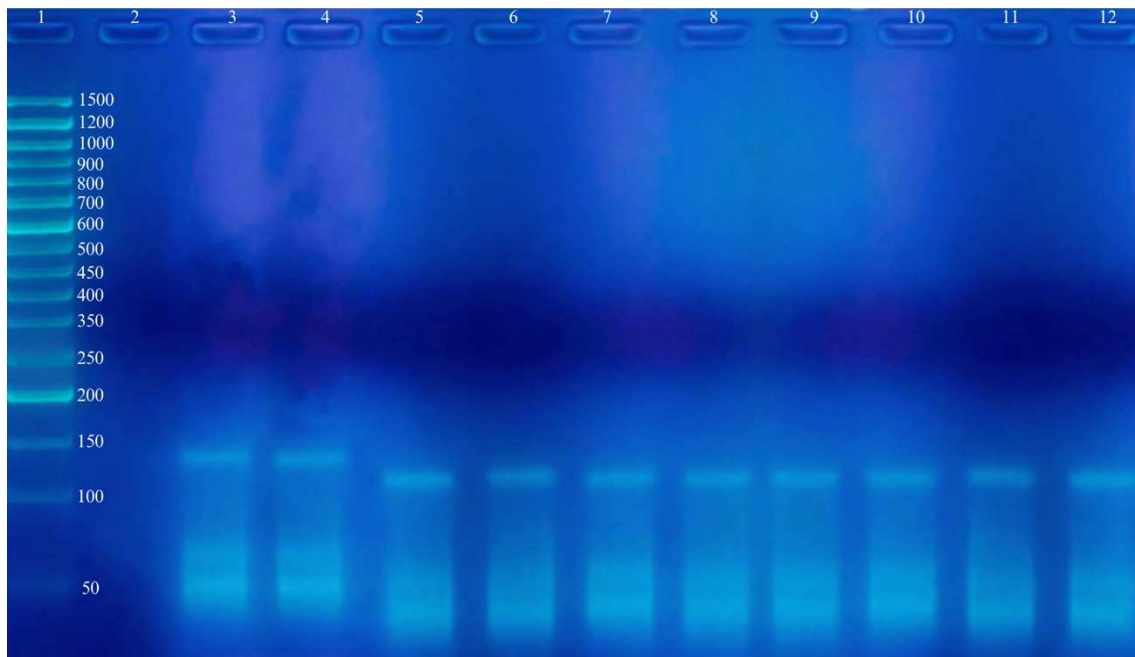


Figura 9 - Visualização da região do codão 12 do gene *KRAS* num gel de agarose a 4% (p/v). 1- Marcador de peso molecular (NZYDNA Ladder VI); 2- Controlo negativo; 3- Amostra 1; 4- Amostra 1T; 5- Amostra 5; 6- Amostra 5T; 7- Amostra 6; 8- Amostra 6T; 9- Amostra 7; 10- Amostra 7T; 11- Amostra 8; 12- Amostra 8T. (Fotografia obtida pela autora)

6. Discussão

As oito amostras, correspondentes aos quatro participantes, apresentaram todas um fragmento de 111pb, tanto nas amostras dos braços sem tatuagem como nas dos braços tatuados. Este resultado é compatível com o genótipo de tipo selvagem no exão 2 do gene *KRAS*, indicando a ausência de mutações no códon 12.

Por outro lado, o participante 1 apresentou um perfil distinto. Ambas as suas amostras, uma do braço tatuado e outra do braço sem tatuagem, revelaram um genótipo mutante homozigótico, com uma única banda na região dos 140 pb. Este padrão é sugestivo da presença de uma mutação no códon 12 do gene *KRAS*, região frequentemente associada a alterações oncogénicas em diversos tipos de cancro, nomeadamente carcinomas colorretais e pulmonares.

As bandas observadas abaixo da marca dos 100 pb poderão corresponder a fragmentos de 17 pb ou 29 pb, resultantes da restrição enzimática do gene *KRAS*. Contudo, devido à sua dimensão reduzida, estas bandas podem migrar rapidamente no gel de agarose, sobrepondo-se a produtos inespecíficos gerados durante a PCR, como é o caso de dímeros de primers ou fragmentos amplificados fora da região-alvo.

A ausência de amplificação no controlo negativo mostra que o protocolo laboratorial que se seguiu foi bem conseguido, o que é especialmente importante porque se usou a técnica de Nested PCR. Esta técnica envolve muitos ciclos e manipulações, o que aumenta o risco de contaminação. Portanto, este resultado confirma que as medidas de boas práticas no laboratório funcionaram bem para evitar qualquer contaminação, garantindo que as mutações que detetámos são reais e não erros do processo.

Para consolidar os resultados obtidos, é importante a utilização de outra técnica de genotipagem, diferente da PCR-RFLP seguida de eletroforese em gel de agarose, para a confirmação de resultados obtidos. A utilização da técnica de sequenciação genómica permite a confirmação inequívoca da mutação e assim ultrapassar esta limitação.

O número reduzido de amostras viáveis (n=5) impossibilitou o cumprimento dos pressupostos necessários para uma análise estatística robusta. Face a esta limitação, optou-se por uma análise descritiva simples, baseada na distribuição percentual dos resultados. De um total de cinco amostras viáveis, uma apresentou mutação no codão 12 do gene *KRAS*, enquanto as restantes quatro não apresentaram alterações genéticas detetáveis. Assim, 20% das amostras analisadas revelaram a presença de mutação, e 80% mantiveram o genótipo wild type. Esta distribuição percentual permite uma visão preliminar dos resultados obtidos, sem recorrer a análises estatísticas mais complexas, devido ao reduzido número de amostras válidas.

Este estudo como referido anteriormente, foi condicionado por limitações logísticas e temporais, nomeadamente a impossibilidade de repetir a colheita ou o procedimento laboratorial, e a ausência de protocolos validados especificamente para amostras recolhidas em pele tatuada versus não tatuada.

A deteção da mutação tanto na amostra do braço tatuado como na do braço sem tatuagem sugere fortemente uma alteração de origem hereditária, ou seja, presente desde o nascimento e germinativa, existente em todas as células do organismo. Sugere-se que dado o potencial impacto clínico de uma mutação no gene *KRAS*, o participante deveria ser encaminhado para uma consulta de genética médica para esclarecê-lo da relevância clínica e decisões futuras.

Este trabalho, por ser de natureza piloto, apresenta algumas limitações e hipóteses importantes de serem consideradas.

– **Ausência de literatura científica**

A inexistência de literatura científica específica dificultou a definição de um protocolo experimental previamente testado e validado, o que se traduziu na construção metodológica a partir do zero. Esta limitação aumentou o grau de incerteza quanto à fiabilidade, reprodutibilidade e aplicabilidade dos procedimentos adotados.

– **Amostra reduzida**

Embora o objetivo inicial do estudo fosse incluir 20 participantes, apenas 16 foram efetivamente integrados, devido a dificuldades no recrutamento e à elegibilidade dos

voluntários. Destes, apenas 5 apresentaram resultados laboratoriais válidos. Este baixo rendimento compromete substancialmente a robustez dos dados, limitando a capacidade de análise estatística e a fiabilidade das conclusões obtidas. No entanto, o número reduzido de amostras válidas limita a capacidade de tirar conclusões mais gerais. Por isso, é fundamental que futuros estudos incluam mais participantes para validar estes resultados.

– **Recolha superficial**

Como a amostra foi recolhida por raspagem à superfície da pele, é provável que tenha atingido apenas o estrato córneo da pele, uma camada composta por células mortas e portanto sem ADN viável. Isto pode ter impedido o acesso às estruturas mais profundas, como a camada basal da epiderme ou da derme, onde os queratinócitos ainda estão vivos e seriam mais adequados para a análise.

– **Contaminação com DNase**

A DNase é uma enzima que pode degradar o ADN, comprometendo tanto a integridade como a quantidade do material genético extraído. A sua presença ubíqua pode resultar em contaminações acidentais, nomeadamente através do contacto com superfícies não esterilizadas, reagentes ou materiais contaminados, ou ainda por manipulações inadequadas, como a ausência de luvas estéreis.

– **Baixo rendimento de ADN**

Apesar das adaptações metodológicas aplicadas, como a utilização da técnica húmida, várias amostras apresentaram concentrações de ADN inferiores a 10 ng/μL, o que poderá ter comprometido a eficiência das reações de PCR e, conseqüentemente, a fiabilidade dos resultados.

– **Complexidade da técnica**

A realização de Nested PCR aumenta o risco de contaminação cruzada entre amostras, apesar das boas práticas laboratoriais adotadas.

– **Ausência de confirmação por sequenciação genómica**

A análise genética realizada teve por base a técnica de PCR-RFLP, seguida da visualização dos fragmentos de ADN em gel de agarose. Este método permite detetar alterações no ADN com base no padrão de bandas obtido, sugerindo a presença de uma mutação. É necessário uma segunda validação dos resultados através de outra metodologia de genotipagem como por exemplo a sequenciação genómica.

7. Conclusão

Este estudo piloto teve como objetivo principal explorar a presença de mutações no codão 12 do gene *KRAS* em estudantes tatuados da Egas Moniz School of Health and Science, utilizando técnicas laboratoriais que incluíram extração de ADN, Nested PCR e restrição enzimática (PCR-RFLP). Embora tenha sido identificada uma mutação de origem homocigota num dos participantes, evidenciada pela banda de 140pb tanto na amostra do braço tatuado como no não tatuado, esta poderá não estar diretamente relacionada com a exposição à tinta de tatuagem, pois há evidência germinativa. Ainda assim, a presença de compostos como pigmentos azo e metais pesados nas tintas levanta hipóteses plausíveis sobre potenciais efeitos mutagénicos, que justificam investigação mais aprofundada. O objetivo principal foi parcialmente cumprido, pois embora não se tenha identificado uma mutação na amostra tatuada estudada, a técnica possibilitou identificar a mutação nas amostras analisadas.

Relativamente aos objetivos secundários, os resultados demonstraram, de forma preliminar, a viabilidade da genotipagem do gene *KRAS* em algumas amostras, o que permitiu identificar obstáculos e oportunidades relevantes para investigações futuras. Foram identificadas limitações metodológicas significativas, como o número reduzido de amostras viáveis, a baixa concentração do ADN, e a ausência de confirmação por sequenciação genómica, o que impactou a eficiência da amplificação e a interpretação dos resultados. Ainda assim, foi possível realizar uma estimativa preliminar da prevalência da mutação no codão 12 do gene *KRAS*, embora esta esteja condicionada pelo reduzido número de amostras válidas.

Para otimizar a qualidade das amostras, poderão ser exploradas alternativas como a colheita de folículos pilosos, ou a raspagem da pele com solução alcoólica, com o objetivo de remover células mortas e aumentar a pureza e eficiência do ADN obtido.

Adicionalmente, a implementação de métodos moleculares mais sensíveis, como o cobas® *KRAS* Mutation Test (Roche Diagnostics), um ensaio multiplex de PCR em tempo real que deteta mutações nos codões 12, 13 e 61 do gene *KRAS*, poderá ser considerada em estudos futuros. Embora este teste tenha sido originalmente concebido para ADN extraído de blocos de parafina de cancro colorretais, a sua adaptação à análise

de tecidos cutâneos, mediante validação laboratorial adequada, abre caminho a uma caracterização genética mais precisa e robusta.

Apesar de ainda não existir uma associação causal comprovada entre os pigmentos de tatuagem e mutações no gene *KRAS*, a composição destas substâncias, ricas em compostos aromáticos e metais pesados, levanta questões pertinentes sobre o seu potencial efeito na integridade do ADN cutâneo (Schreiver et al., 2017). A possível implicação clínica e os riscos para a saúde pública associados a estas alterações genéticas reforçam a necessidade de regulamentação mais rigorosa sobre a composição das tintas de tatuagem, de modo a mitigar os perigos de uma prática cada vez mais comum (Kluger & Koljonen, 2012).

Este trabalho com o seu contributo preliminar permite numa perspetiva futura estudar a compreensão da possível relação entre pigmentos de tatuagem e alterações genéticas na pele humana. Ao identificar fragilidades técnicas e levantar hipóteses pertinentes, sublinha-se a importância de desenvolver investigações mais abrangentes, fundamentais numa abordagem interdisciplinar que integre a dermatologia, a biologia molecular e a saúde pública.

8. Bibliografia

- Ash, L. J., Busia-Bourdain, O., Okpattah, D., Kamel, A., Liberchuk, A., & Wolfe, A. L. (2024). KRAS: Biology, inhibition, and mechanisms of inhibitor resistance. *Current Oncology*, 31(4), 2024–2046. <https://doi.org/10.3390/curroncol31040150>
- Balogh, T. S., Velasco, M. V. R., Pedriali, C. A., Kaneko, T. M., & Baby, A. R. (2011). Proteção à radiação ultravioleta: Recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(4), 732–742. <https://doi.org/10.1590/s0365-05962011000400016>
- Bataille, A., Le Gall, C., Misery, L., & Talagas, M. (2022). Merkel cells are multimodal sensory cells: A review of study methods. *Cells*, 11(23), 3827. <https://doi.org/10.3390/cells11233827>
- Baumann, L. S., Rieder, E. A., & Sun, M. D. (2022). *Baumann's cosmetic dermatology* (3.^a ed.). McGraw-Hill Education.
- Bäumler, W. (2020). Chemical hazard of tattoo colorants. *La Presse Médicale*, 49(4), 104046. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2020.104046>
- BPS Bioscience. (s.d.). *RAS signaling*. Obtido em 21 de maio de 2025. Disponível em: <https://bpsbioscience.com/research-areas/ras>
- Burge, R. A., & Hobbs, G. A. (2022). Not all RAS mutations are equal: A detailed review of the functional diversity of RAS hot spot mutations. *Advances in Cancer Research*, 153, 29–61. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2021.07.004>
- Cancer Genome Atlas Network (2015). Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell*, 161(7), 1681–1696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>
- Carlos, A., Campos, L., Borges-Branco, A., & Groth, A. K. (2007). Cicatrização de feridas. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 20(1), 51–58. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202007000100010>
- Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J., & Der, C. J. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(11), 828–851. <https://doi.org/10.1038/nrd4389>

- Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 514–525. <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700701>
- Ferreira, A., Pereira, F., Reis, C., Oliveira, M. J., Sousa, M. J., & Preto, A. (2022). Crucial role of oncogenic KRAS mutations in apoptosis and autophagy regulation: Therapeutic implications. *Cells*, 11(14), 2183. <https://doi.org/10.3390/cells11142183>
- Garcia-Mouronte, E., Pérez-González, L. A., Naharro-Rodríguez, J., & Fernández Guarino, M. (2024). Understanding active photoprotection: DNA-repair enzymes and antioxidants. *Life (Basel, Switzerland)*, 14(7), 822. <https://doi.org/10.3390/life14070822>
- Gauthaman, A., & Moorthy, A. (2021). Prevalence of K-ras codon 12 mutations in Indian patients with head and neck cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 36(3), 370–374. <https://doi.org/10.1007/s12291-020-00882-w>
- Hauri U, Hohl C. (2015). Photostability and breakdown products of pigments currently used in tattoo inks. *Current Problems in Dermatology*, 48, 164-169. <https://doi.org/10.1159/000369225>
- Hayward, N. K., Wilmott, J. S., Waddell, N., Johansson, P. A., Field, M. A., Nones, K., Patch, A. M., Kakavand, H., Alexandrov, L. B., Burke, H., Jakrot, V., Kazakoff, S., Holmes, O., Leonard, C., Sabarinathan, R., Mularoni, L., Wood, S., Xu, Q., Waddell, N., Tembe, V., ...Mann, G. J. (2017). Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*, 545(7653), 175–180. <https://doi.org/10.1038/nature22071>
- Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of cell science*, 129(7), 1287–1292. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>
- Holderfield, M. (2018). Efforts to develop KRAS inhibitors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(7), a031864. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031864>
- Huang, L., Guo, Z., Wang, F., & Fu, L. (2021). KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 386. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00780-4>

- Islam, P. S., Chang, C., Selmi, C., Generali, E., Huntley, A., Teuber, S. S., & Gershwin, M. E. (2016). Medical complications of tattoos: a comprehensive review. *Clinical reviews in Allergy & Immunology*, 50(2), 273–286. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8532-0>
- Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(7), 517–531. <https://doi.org/10.1038/nrm2438>
- Kay, J., Thadhani, E., Samson, L., & Engelward, B. (2019). Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. *DNA repair*, 83, 102673. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102673>
- Kluger, N., & Koljonen, V. (2012). Tattoos, inks, and cancer. *The Lancet Oncology*, 13(4), e161–e168. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70340-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70340-0)
- Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., & Sevcikova, S. (2012). TGF- β - an excellent servant but a bad master. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-183>
- Kumar, C., Kotra, V., Kumar, N., Singh, K., & Singh, A. K. (2023). Biodiversity and bioresources: Impact of biodiversity loss on agricultural sustainability. In *Biodiversity and Bioeconomy: Status Quo, Challenges, and Opportunities* (pp.165–198). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95482-2.00008-0>
- Lowe, J. S., & Anderson, P. G. (2015). *Stevens & Lowe's human histology* (4th ed.). Elsevier.
- Luo, A., Lan, H., Ling, C., Zhang, A., Shi, L., Ho, S. Y. W., & Zhu, C. (2015). A simulation study of sample size for DNA barcoding. *Ecology and Evolution*, 5(24), 5869–5879. <https://doi.org/10.1002/ece3.1846>
- Matejuk, A. (2017). Skin immunity. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66(1), 45. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0477-3>
- Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>

- Montagner, S., & Costa, A. (2009). Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 84(3), 263–269. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000300008>
- Mothershed, E. A., & Whitney, A. M. (2006). Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*, 363(1–2), 206–220. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.050>
- Murphrey, M. B., Miao, J. H., & Zito, P. M. (2022). Histology, stratum corneum. *StatPearls*. StatPearls Publishing. Obtido em 30 de maio de 2025. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513299/>
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability-an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), 220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Nielsen C, Jerkeman M, Jöud AS. (2024). Tattoos as a risk factor for malignant lymphoma: a population-based case-control study. *EClinicalMedicine*, 72, 102649. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2024.102649>
- Nzytech. (2025). *Nzytissue DNA Isolation kit: Technical brochure and user manual* (Versões 2.4.01 e 2.5.01). Obtido em 20 de janeiro de 2025. Disponível em: <https://www.nzytech.com/en/mb135-nzy-tissue-gdna-isolation-kit/>
- Nzytech. (s.d.). NZYDNA Ladder VI, 50–1500 bp. Lisboa: Nzytech. Obtido em 20 de janeiro de 2025. Disponível em: <https://www.nzytech.com/en/life-science-research/molecular-biology/ladders-markers/mb089-nzydna-ladder-vi/>
- Oakley, A., & Krishnamurthy, K. (2023). Histology, epidermis. *StatPearls*. StatPearls Publishing. Obtido em 29 de maio de 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N. C., Ramirez, H., Nusbaum, A. G., Sawaya, A., Patel, S. B., Khalid, L., Isseroff, R. R., & Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in wound healing: A comprehensive review. *Wound Repair and Regeneration*, 22(6), 445–464. <https://doi.org/10.1111/wrr.12134>

- Piccinini, M., Pakalin, S., Contor, L., Bianchi, I., & Senaldi, C. (2015). Safety of tattoos and permanent make-up: Final report. Publications Office of the European Union. <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC96808>
- Piipponen, M., Li, D., & Landén, N. X. (2020). The immune functions of keratinocytes in skin wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8790. <https://doi.org/10.3390/ijms21228790>
- Prior, I. A., Lewis, P. D., & Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research*, 72(10), 2457–2467. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2612>
- Pylyayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: Weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, 11(11), 761–774. <https://doi.org/10.1038/nrc3106>
- Rabbie, R., Ferguson, P., Wong, K., Couturier, D. L., Moran, U., Turner, C., Emanuel, P., Haas, K., Saunus, J. M., Davidson, M. R., Lakhani, S. R., Shivalingam, B., Long, G. V., Parkinson, C., Osman, I., Scolyer, R. A., Corrie, P., & Adams, D. J. (2021). The mutational landscape of melanoma brain metastases presenting as the first visceral site of recurrence. *British journal of cancer*, 124(1), 156–160. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01090-2>
- Regensburger, J., Lehner, K., Maisch, T., Vasold, R., Santarelli, F., Engel, E., Gollmer, A., König, B., Landthaler, M., & Bäuml, W. (2010). Tattoos contain polycyclic aromatic hydrocarbons that additionally generate deleterious singlet oxygen. *Experimental Dermatology*, 19(8), 740-742. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01068.x>
- Registo Oncológico Nacional. (2023). *Registo oncológico nacional de todos os tumores na população residente em Portugal, em 2020*. [Relatório técnico]. Obtido em 1 de junho de 2025. Disponível em: <https://ron.min-saude.pt/media/2223/ron-2020.pdf>
- Santos, M. (2020). Tatuadores: Principais fatores de risco e riscos laborais, doenças profissionais associadas e medidas de proteção recomendadas. *Revista Portuguesa de Saúde Ocupacional Online*, 10, S78–S107. <https://doi.org/10.31252/rpso.22.08.2020>

- Saraswathy, N., & Ramalingam, P. (2011). DNA sequencing methods. *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*, 57–76. <https://doi.org/10.1533/9781908818058.57>
- Schanfield, M. S. (2003). DNA testing in forensic science. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, 589–602. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00956-X>
- Schreiver, I., Hesse, B., Seim, C., Castillo-Michel, H., Villanova, J., Laux, P., Dreijack, N., Penning, R., Tucoulou, R., Cotte, M., & Luch, A. (2017). Synchrotron-based v-XRF mapping and μ -FTIR microscopy enable to look into the fate and effects of tattoo pigments in human skin. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11721-z>
- Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia. (s.d.). A pele. Obtido em 15 de maio de 2025. Disponível em: https://www.spdv.pt/_a_pele
- Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. K., & McCormick, F. (2014). Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell*, 25(3), 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.017>
- Temiz, S.A., Özlü, E. (2021). Medical complications of tattoos. *Journal of the Turkish Academy of Dermatology*, 15(1), 1-7. <https://doi.org/10.4274/jtad.galenos.2021.02486>
- Than, U. T. T., Leavesley, D. I., & Parker, T. J. (2019). Characteristics and roles of extracellular vesicles released by epidermal keratinocytes. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 33(12), 2264–2272. <https://doi.org/10.1111/jdv.15859>
- Thermo Fisher Scientific. (2012). Product information: 6X DNA Loading Dye, #R0611. Obtido em 30 de maio de 2025. Disponível em: www.thermoscientific.com/onebio
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2016). *Princípios de Anatomia e Fisiologia* (14th ed.). Guanabara Koogan.
- União Europeia regulou as tintas, mas em Portugal “a atividade do tatuador continua sem lei” - Expresso. (s.d.). Obtido em 21 de maio de 2025. Disponível em: <https://expresso.pt/sociedade/2022-09-14-Uniao-Europeia-regulou-as-tintas-mas-em-Portugal-a-atividade-do-tatuador-continua-sem-lei-720dd2d3>

- Venza, M., Visalli, M., Beninati, C., De Gaetano, G. V., Teti, D., & Venza, I. (2015). Cellular mechanisms of oxidative stress and action in melanoma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 481782. <https://doi.org/10.1155/2015/481782>
- Wang, Q. J., Yu, Z., Griffith, K., Hanada, K. I., Restifo, N. P., & Yang, J. C. (2016). Identification of T-cell receptors targeting KRAS-mutated human tumors. *Cancer Immunology Research*, 4(3), 204. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0188>
- Wong, Y. L., Okubo, T., Uno, E., Suda, K., & Ishii, T. (2022). Role of CD99 in regulating homeostasis and differentiation in normal human epidermal keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 606, 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.087>
- Xu, M., Zhao, X., Wen, T., & Qu, X. (2024). Unveiling the role of KRAS in tumor immune microenvironment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 171, 116058. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.116058>
- Yousef, H., Alhadj, M., Fakoya, A. O., & Sharma, S. (2024). Anatomy, skin (integument), epidermis. Statpearls. StatPearls Publishing. Obtido em 30 de maio de 2025. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- Zhou, Y., Prakash, P., Liang, H., Cho, K. J., Gorfe, A. A., & Hancock, J. F. (2017). Lipid-sorting specificity encoded in K-Ras membrane anchor regulates signal output. *Cell*, 168(1-2), 239–251.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.059>

9. Anexos

Anexo I- Consentimento informado aprovado pela Comissão de Ética da Egas Moniz School of Health and Science



EGAS MONIZ SCHOOL
of HEALTH & SCIENCE

Consentimento Informado

Código | IMP-EM-PE-17_03

Monte de Caparica, Janeiro de 2025

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na Unidade Curricular de Estágio do IUEM, sob a orientação da Professora Dr^a Ana Clara Ribeiro, solicita-se autorização para a participação no estudo “O impacto das mutações do gene *KRAS* em indivíduos tatuados” a Estudantes da Egas Moniz School of Health and Science com o objetivo de analisar e identificar a presença de mutações do gene *K-RAS em indivíduos tatuados* que consiste na seguinte participação: Preenchimento de um questionário e recolha de amostras de ADN nas células da pele usando uma zaragatoa.

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

Este estudo pode trazer benefícios tais como ter o conhecimento de parte do seu genoma e contribuir para o esclarecimento do processo de cancerização da pele a partir de tatuagens.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e publicação e será tratada pelo orientador e pela investigadora. A sua recolha é anónima e confidencial.

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)

Anexo II - Questionário aplicado aos participantes

1. Género:

Feminino

Masculino

2. Idade: _____

3. Tem tatuagem de tinta preta?






Sim

Não

4. Onde está localizada a tatuagem: _____

5. Há quanto tempo a realizou?

Anexo III- Registo fotográfico padronizado das tatuagens dos participantes com escala forense

Fotografia	Número do participante	Zona anatómica	Dimensão estimada total	Cor predominante
	P01	Braço posterior direito	14 cm	Preto
	P02	Antebraço anterior esquerdo	7 cm	Preto
	P03	Antebraço anterior esquerdo	4 cm	Preto
	P04	Antebraço anterior esquerdo	6 cm	Preto
	P05	Braço posterior direito	14 cm	Preto

Anexo IV - Resumo científico submetido no 7th CiiEM International Congress 2025

Abstract ID: 16 for 7th CiiEM International Congress 2025 - Empowering One Health to Reduce Social Vulnerabilities (Auto-Generated May 22, 2025 4:32 pm)

KRAS Gene Genotyping in Tattooed Individuals

Authors:

Catarina Alves, Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

Ana Clara Ribeiro, Molecular Biology Laboratory, Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research (CiiEM); Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

Abstract ID: 16

Event: 7th Congress of the Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research

Topic: P3. Clinical & Translational Research

Keywords: KRAS gene; Mutations; Tattoos; Genetic variability

Mutations in the RAS family of proto-oncogenes, particularly the KRAS gene, have been identified as key factor in the development of various skin cancers, including melanomas and squamous cell carcinomas. The most common mutation occurs in codon 12, altering the functionality of the GTPase protein, which is involved in cell signal transduction. Cases of skin neoplasms have also been reported in tattooed individuals, raising questions about whether the ink, the mechanical trauma of the needle or photoaging of the skin could be triggering factors. However, despite these observations, there is still a lack of robust scientific evidence directly linking tattoos to specific genetic mutations. This study aimed to investigate the presence of codon 12 mutations in the KRAS gene in tattooed students at the Egas Moniz School of Health and Science, and to assess the feasibility of detecting them in a laboratory setting. An experimental pilot study was carried out with sixteen tattooed students, who were selected based on the following inclusion criteria: they were healthy individuals without dermal diseases, their tattoos were black and located on their upper limbs, each tattoo was at least two centimetres in diameter and had been done more than two years ago. DNA was collected by scraping the skin with wet swabs and extracted using silica-coated centrifugation columns (NZYtech kit). The KRAS gene was amplified using Nested PCR. Mutation analysis consisted of digesting the amplified product with the BstNI restriction enzyme, followed by gel electrophoresis. This made it possible to distinguish between wild-type, heterozygous and homozygous genotypes based on the observed fragmentation patterns. Of the 16 samples collected, only five were of sufficient quality for molecular interpretation and were considered valid. Four of these showed a fragmentation pattern corresponding to the wild-type genotype (111 bp), indicating no mutations in codon 12 of the KRAS gene. One sample showed a 140 bp band, which is consistent with a homozygous mutant genotype. Despite the small number of valid samples, the detection of this mutation demonstrates the potential of this approach as a basis for future research. However, the results also highlight important limitations of the methodology used, particularly regarding the quality of the DNA, which may have compromised the efficiency of the amplification process in most of the samples. The limited results of this study reinforce the need to optimise the collection methodology. Alternative approaches could include cleaning the skin with an alcohol solution beforehand to remove dead cells or

Copyright 2025 7th CiiEM International Congress 2025 - Empowering One Health to Reduce Social Vulnerabilities powered by WPAbstracts Pro

Abstract ID: 16 for 7th CiEM International Congress 2025 - Empowering One Health to Reduce Social Vulnerabilities (Auto-Generated May 22, 2025 4:32 pm)

extracting DNA from hair follicles instead of scraping the skin. Further research involving a larger sample size and more robust laboratory techniques is essential to validate the feasibility of genotyping the KRAS gene in tattooed individuals.

Anexo V - Póster científico submetido no 7th CiiEM International Congress 2025



KRAS GENE GENOTYPING IN TATTOOED INDIVIDUALS

¹Catarina Alves, ^{1,2}Ana Clara Ribeiro

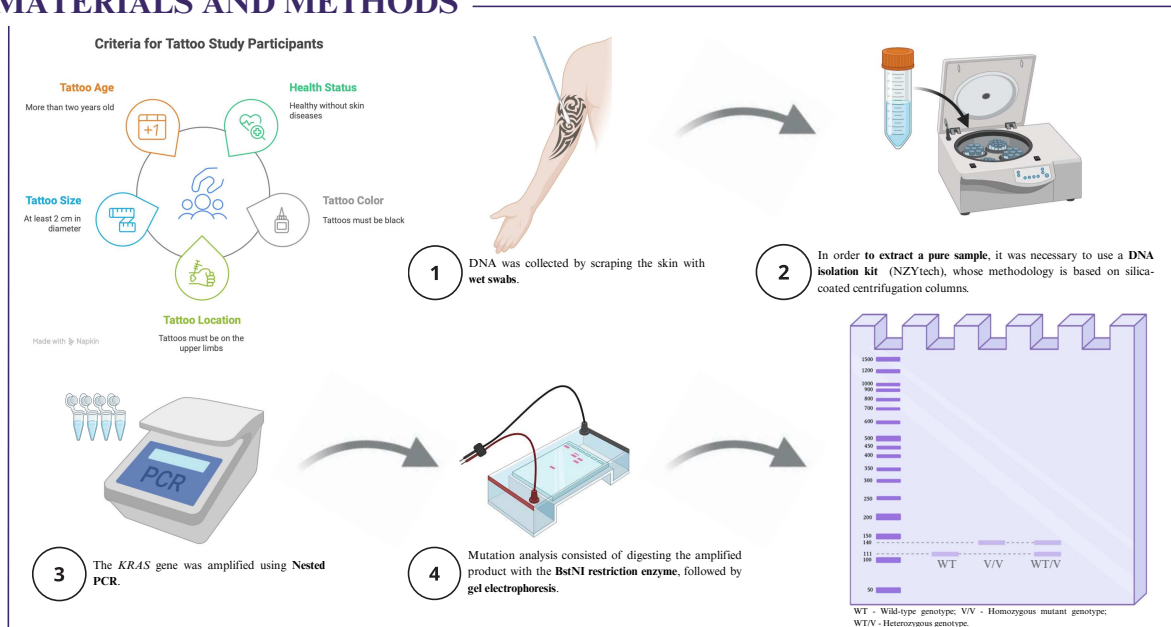
1.Instituto Universitário Egas Moniz (IUEM), Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

2.Molecular Biology Laboratory, Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research (CiEM); Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Almada, Portugal

INTRODUCTION AND AIMS

Mutations in the *RAS* family of proto-oncogenes, particularly the *KRAS* gene, have been identified as key factor in the development of various skin cancers, including melanomas and squamous cell carcinomas (1). The most common mutation occurs in **codon 12**, altering the functionality of the GTPase protein, which is involved in cell signal transduction. Cases of skin neoplasms have also been reported in **tattooed individuals**, raising questions about whether the ink, the mechanical trauma of the needle or photoaging of the skin could be triggering factors. However, despite these observations, there is still a lack of robust scientific evidence directly linking tattoos to specific genetic mutations (1)(2). This study aimed to investigate the presence of codon 12 mutations in the *KRAS* gene in tattooed students at the **Egas Moniz School of Health and Science**, and to assess the **feasibility of detecting them in a laboratory setting**.

MATERIALS AND METHODS



RESULTS

Only five of the 16 participants had DNA of sufficient quality for molecular analysis. Of the ten valid samples in total, two per participant (5, 6, 7 and 8), eight exhibited a fragmentation pattern characterised by a **single 111 bp band and a wild-type genotype (WT)**. This finding indicates an absence of mutations in codon 12 of the *KRAS* gene.

Samples from participant number 1 exhibited a distinctive pattern, characterised by the presence of a **single 140 bp band and a homozygous mutant genotype (V/V)** in both the arm bearing the tattoo and the non-tattooed arm.

The remaining 22 samples, corresponding to 11 participants, were excluded from the study due to the low concentration of genetic material, its degradation, or its absence, which impeded the interpretation of the results. The negative control, corresponding to well number 2 in the PCR reactions, exhibited no visible bands after amplification and enzymatic digestion.

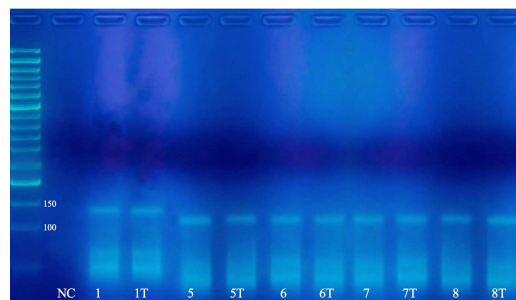


Figure 1 : Band profiles obtained by agarose gel electrophoresis (4%), organised by participant number. The 'T' indicates the sample taken from the tattooed arm and 'NC' indicates the negative control.

CONCLUSION

Although a **homozygous mutation** was identified in one of the participants, this may not be directly related to exposure to tattoo ink, but rather may have a hereditary origin. Notwithstanding the **inherent limitations** of the study, including the **limited number of viable samples** and the **absence of genetic sequencing confirmation**, the preliminary results indicated the **approach's promise as a foundation for subsequent research**. However, the data also demonstrates significant deficiencies in the methodology employed, particularly with regard to the **quality of the extracted DNA**, which may have compromised the efficiency of amplification in a substantial proportion of the samples. In order to overcome these constraints, **alternative approaches could be tested**, such as the use of an alcohol solution to clean the skin in advance in order to remove dead cells, or the collection of hair follicles as a source of DNA instead of skin scraping.

REFERENCES

(1) Eimerl, S., Schäfer, M. P., & Haemels, H. A. (2014). Molecular biology of basal and squamous cell carcinomas. *Advances in experimental medicine and biology*, 810, 234–252. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0437-2_13

(2) Wang, Q. J., Yu, Z., Griffith, K., Hamada, K. I., Restifo, N. P., & Yang, J. C. (2016). Identification of T-cell Receptors Targeting KRAS-mutated Human Tumors. *Cancer immunology research*, 4(3), 204. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CCR-15-0188>

