

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico

Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Investigação de polimorfismos de base única (*SNPs*) relacionados à
pigmentação da pele e associação ao Melanoma em pacientes do Rio Grande
do Sul**

Larissa Brussa Reis

Pelotas, 2014

Larissa Brussa Reis

Investigação de polimorfismos de base única (SNPs) relacionados à pigmentação da pele e associação ao Melanoma em pacientes do Rio Grande do Sul

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Luciano da Silva Pinto

Co-orientadora: Patrícia Ashton Prolla

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

R375i Reis, Larissa Brussa

Investigação de polimorfismos de base única (SNPs) relacionados à pigmentação da pele e associação ao melanoma em pacientes do Rio Grande do Sul / Larissa Brussa Reis. – 59f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Luciano Pinto.

1.Biotecnologia. 2.Polimorfismo de base única. 3.SNP. 4.Melanoma maligno. 5.Rio Grande do Sul. I.Pinto, Luciano. II.Título.

CDD: 616.99477

Larissa Brussa Reis

Investigação de polimorfismos de base única (*SNPs*) relacionados à pigmentação da pele e associação com susceptibilidade ao Melanoma em pacientes do Rio Grande do Sul

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 05 de Dezembro de 2014.

Banca examinadora:

Professor Luciano da Silva Pinto (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Professor Vinicius Farias Campos

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Leonardo Garcia Monte

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho à minha mãe Juçara Brussa, fonte inesgotável de força para seguir adiante e inspiração para fazer da melhor maneira.

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a duas pessoas que foram fundamentais nessa trajetória, por terem sido os primeiros a me oferecer o subsídio real que alicerçou essa conquista. Aos meus primos Roberta Brussa e Luciano Soares, o meu profundo agradecimento por me abrigarem em sua casa e em seus corações durante esses quatro anos de graduação.

Aos meus orientadores Luciano Pinto e Luciana Dode, agradeço pelos valiosos ensinamentos que me foram dedicados, dentro e fora do laboratório. Espelho-me na conduta ética e na seriedade com que desenvolvem suas pesquisas, inspiro-me no olhar humano que ambos direcionam aos assuntos científicos e sou grata por terem sido meus mentores durante toda minha caminhada acadêmica na UFPel.

Aos doutores Caroline Rizzi e Leonardo Garcia Monte agradeço pela amizade, confiança e ensinamentos compartilhados, que resultaram na obtenção do prêmio Jovem Pesquisador e na minha primeira publicação científica relevante. Ambos me serviram de exemplo, me incentivando a manter a chama acesa e a cabeça erguida.

À minha orientadora de estágio final e futura orientadora de mestrado, Patricia Ashton-Prolla, agradeço pela confiança depositada desde o primeiro momento. Meu coração se enche de esperança e honra por ter a oportunidade de trabalhar com pessoa de tal gabarito, e a ela agradeço a chance de realizar mais este sonho.

Ao amigo e futuro colega de pesquisa, Gabriel Macedo, agradeço por identificar em mim qualidades que lhe fizeram apostar em minha permanência no grupo de pesquisa do Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e por ter sido o primeiro a me abrir as portas para tal oportunidade.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Genômica do HCPA, Igor, Gustavo, Cleandra, Clévia, Pati Silva, Bárbara, Nayê, Rudi, Vanessa e Facundo agradeço profundamente pelo acolhimento imediato, pela empatia e por toda a força nos assuntos de cunho pessoal e pela ajuda para desenvolver este trabalho de conclusão e o meu estágio final.

À minha família sou grata por todo o apoio incondicional durante esses vinte e sete anos de existência. À minha mãe Juçara, meu pai Paulo e meus irmãos Paula e Rafael, agradeço pelo amor, carinho e compreensão. Muito obrigada por todas as palavras de incentivo e reconhecimento que me mantiveram firme na busca por esse objetivo. Sem vocês, eu nada seria.

Por fim, agradeço especialmente ao meu companheiro Vinicius Lucietto, por ter entrado e transformado a minha vida de uma maneira tão maravilhosa. Obrigada por segurar a minha mão e atravessar comigo a tempestade, na busca pelo arco-íris. Por me inflar de motivação e amor. Nenhuma vitória teria sentido sem você na minha vida, portanto, muito obrigada por estares nela.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida”. (Carl Sagan)

Resumo

REIS, Larissa Brussa. **Investigação de polimorfismos de base única (SNPs) relacionados à pigmentação da pele e associação ao Melanoma em pacientes do Rio Grande do Sul.** 2014. 61f. Trabalho de Conclusão – Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

O Melanoma Maligno (MM) é hoje o câncer de pele mais agressivo e mais resistente a tratamentos. Esta neoplasia origina-se nos melanócitos e seu risco está associado a diversos fatores, como histórico familiar, exposição solar e características de pigmentação da pele. Já foram descritos polimorfismos de base única (SNPs) em diversos genes envolvidos na pigmentação humana e relacionados com risco baixo a moderado para susceptibilidade ao MM em várias populações, porém, existem poucos dados na literatura referentes a investigações em populações latino-americanas. Recentemente foram encontrados três SNPs - *rs1129038*, *rs1426654* e *rs16891982* - relacionados à pigmentação da pele na população oriunda do Rio Grande do Sul, Brasil, que apresenta heranças altamente miscigenadas. Objetivando investigar a presença desses SNPs em amostras de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre foram recrutados 255 participantes, sendo 120 diagnosticados com MM e 135 participantes saudáveis. Foi realizado um estudo experimental caso-controle, com análises de genotipagem por discriminação alélica através de ensaio *Taqman* em amostras de DNA extraído a partir de leucócitos de sangue periférico dos indivíduos recrutados. O objetivo foi identificar possíveis biomarcadores relacionados ao melanoma. Como resultado, foi obtido um painel característico dos participantes do estudo, com distribuição homogênea da média das idades entre os grupos (56,31 anos nos casos e 58,28 nos controles), e os fenótipos de fototipos, cor de olhos e cabelos. Os fototipos mais prevalentes foram o fototipo II (53,3%) e III (39,2%); cor de olhos preto-acastanhados (51,4%) e cabelos pretos (34,9%). As frequências genótípicas e gênicas foram avaliadas e verificada a associação dessas frequências com a presença de MM, e com os fototipos dos participantes. Este foi o primeiro estudo relatando a investigação desses SNPs em indivíduos enfermos pela neoplasia. Concluiu-se que os genótipos homocigotos dos SNPs investigados (85,8% GG no *rs16891982*; 97,5% AA no *rs1426654* e 42,5% GG no *rs1129038*) ocorrem com frequência significativamente maior nos pacientes com MM do que no grupo controle. Os genótipos mais frequentes nos casos com MM também se mostraram mais frequentes nos indivíduos que possuem fototipo I e II (88,3% de GG no *rs16891982*; 94,5% de AA no *rs1426654*; 51% de GG no *rs1129038*). Além disso, outros fatores de risco para MM, como olhos e cabelos claros também tiveram maior frequência dos genótipos associados aos casos de MM, sugerindo uma possível associação entre fator de risco de pigmentação e genótipos contendo os alelos variantes.

Palavras chave: polimorfismos de base única; melanoma cutâneo maligno; populações miscigenadas; susceptibilidade.

Abstract

REIS, Larissa Brussa. **Investigation of single nucleotide polymorphism (SNPs) related to skin pigmentation and association with susceptibility to melanoma in patients of Rio Grande do Sul.** 2014. 61f. Conclusion Work - Graduation in Biotechnology, Technology Development Centre, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2014.

The malignant melanoma (MM) is today the skin cancer more aggressive and resistant to treatment. This neoplasia originates in melanocytes and their risk is associated with several factors, such as family history, sun exposure and skin pigmentation characteristics. Single nucleotide polymorphisms have been described in several genes involved in human pigmentation and associated with low to moderate susceptibility to MM risk in various populations, but there are few data in the literature regarding investigations in Latin American populations. Recently, three SNPs - *rs1129038*, *rs1426654*, *rs16891982* and *rs1126809*- related to skin pigmentation in population originate of Rio Grande do Sul, Brazil, which has racially mixed heritages were found. Aiming to investigate the presence of these polymorphisms in samples of patients from Hospital de Clinicas de Porto Alegre - 255 participants were recruited, and 120 diagnosed with MM and 135 healthy participants. An experimental case-control study was conducted with genotyping analysis for allelic discrimination using Taqman assay on DNA samples extracted from peripheral blood leukocytes of enrolled subjects, to identify biomarkers related to melanoma. As a result, we obtained a characteristic panel of study participants, with homogeneous distribution of mean age between groups (56.31 years in the cases and the controls 58.28), and the phenotypes of skin types, color eyes and hair. The most prevalent phototypes were phototype II (53.3%) and III (39.2%); color black-brown eyes (51.4%) and black hair (34.9%). It was also evaluated the genotype and gene frequencies in cases and controls, association of frequencies in the presence of MM, and the phototypes of the participants. It is concluded from this study that the homozygous genotypes of the investigated SNPs (85.8% in *rs16891982* GG; 97.5% AA at *rs1426654* and *rs1129038* in GG 42.5%) occur with significantly greater frequency in patients with MM than in the control group. The most common genotypes in cases with MM were also more frequent in individuals with skin type I and II (88.3% of the *rs16891982* GG; 94.5% of the *rs1426654* AA, 51% of the *rs1129038* GG). In addition, other risk factors for MM, as eyes and light hair also had a higher frequency of genotypes associated with cases of MM, suggesting a possible association between pigmentation risk factor and genotypes containing the variant alleles.

Keywords: single nucleotide polymorphisms; cutaneous malignant melanoma; admixed populations; susceptibility.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da distribuição da luz ultravioleta no mapa mundi.....	21
--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1	Informações dos polimorfismos investigados neste estudo.....	27
Tabela 2	Classificação de fototipos, pigmentação de olhos e cabelos, de acordo com a tabela de Fitzpatrick.....	31
Tabela 3	Características dos indivíduos recrutados para o estudo.....	35
Tabela 4	Frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos <i>rs16891982</i> , <i>rs1426654</i> e <i>rs1129038</i> nos grupos casos e controles.....	36
Tabela 5	Frequências genóticas dos polimorfismos <i>rs16891982</i> , <i>rs 1426654</i> e <i>rs1129038</i> de acordo com fototipo, cor de olhos e cabelos.....	37

Sumário

1 Introdução	14
1.1 Justificativa	17
1.2 Objetivos	19
1.2.1 Objetivo Geral:	19
1.2.2 Objetivos específicos:	19
2 Revisão da Literatura	20
2.1 Pigmentação em humanos – Aspectos gerais	20
2.2 Polimorfismos de Base Única	22
2.2.1 Bases genéticas relacionadas à pigmentação da pele nos indivíduos do Rio Grande do Sul.....	23
2.2.2 <i>SLC45A2</i> (OMIM #606202) <i>rs16891982</i>	24
2.2.3 <i>SLC24A5</i> (OMIM #609802) <i>rs1426654</i>	25
2.2.4 <i>HERC2</i> (OMIM#605837) <i>rs1129038</i>	26
2.3 Melanoma Cutâneo Maligno	29
2.3.1 Fatores de risco associados e prevenção primária.....	29
2.3.2 Fototipos	30
3 Metodologia	33
3.1 População estudada	33
3.2 Extração DNA à partir de sangue periférico.....	33
3.3 Quantificação e diluição DNA	34
3.4 Genotipagem por discriminação alélica usando ensaios <i>TaqMan</i>	34
3.5 Análises estatísticas.....	34
4 Resultados	36
5 Discussão	40
6 Considerações Finais	44
Referências	45

1 Introdução

A pigmentação visível da pele, cabelos e olhos em humanos depende primariamente da presença de um pigmento chamado melanina. A melanina é produzida por células específicas chamadas de melanócitos, que podem absorver radiação ultravioleta (UVR) e sobreviver consideravelmente ao estresse genotóxico. Além de armazenar a melanina em vesículas chamadas melanossomos, os melanócitos promovem fotoproteção e termoregulação (LIN & FISHER, 2007). A distribuição de melanina nos tecidos afeta dramaticamente a cor visível, e as diferenças na pigmentação podem surgir pela variação em número, tamanho, composição e distribuição dos melanossomos, enquanto que o número de melanócitos mantém-se relativamente constante (YAMAGUCHI *et al*, 2007). Em adição às variações fisiológicas relacionadas com a síntese e distribuição da melanina, a pigmentação constitutiva é um traço poligênico e muitos *loci* já foram identificados em espécies de mamíferos, através da caracterização da ocorrência natural ou dos efeitos de mutações induzidas (STURM, 2009).

Alguns genes associados à pigmentação humana carregam Polimorfismos de Base Única – conhecidos como *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorfirsm*), que são associados na variabilidade de pigmentação de pele, cabelos e olhos. Diversos de genes já foram associados com a fisiologia da pigmentação em diversas populações (MCEVOY, 2006; HAN *et al*, 2008; QUILLEN *et al*, 2012; CERQUEIRA *et al*, 2012), porém, ainda é bastante limitado o conhecimento sobre a atuação deles na determinação de fenótipos. Particularmente, são escassos os estudos que focam em populações fora da Europa e América do Norte, e raramente são incluídas populações miscigenadas nesses estudos (CERQUEIRA *et al*, 2014).

O Consórcio para Análise da Diversidade e Evolução na América Latina – CANDELA – é um consórcio internacional multidisciplinar que envolve

pesquisadores focados em estudar a diversidade biológica dos latino-americanos. Objetivando reunir dados de populações altamente miscigenadas, o CANDELA analisa amostras oriundas do México, Colômbia, Peru, Chile e Brasil, permitindo pela primeira vez a abordagem de uma ampla gama de questões relevantes à pesquisa antropológica, biológica e médica nessas populações (CANDELA, 2014). Cerqueira *et al*, 2014, analisou uma possível associação entre 18 SNPs e o Índice de Melanina por marcadores de ancestralidade (*Melanin Index –MI*) em todas as amostras disponíveis oriundas de participantes do CANDELA nascidos no Rio Grande do Sul, e encontrou três marcadores com associação significativa para cor da pele: *SLC24A5* rs1426654; *SLC45A2* rs16891982 e *HERC2* rs1129038.

Os genes envolvidos na determinação da cor da pele e resposta ao bronzeamento são potencialmente aplicados na predisposição ao Melanoma Maligno (MM), conferindo susceptibilidade ou resistência ao seu desenvolvimento e podem ser usados como preditores de risco para esta neoplasia na população em geral (MILLER & MIHM, 2006; LIN & FISCHER, 2007). O Melanoma Maligno é um tumor originário de melanócitos e corresponde a aproximadamente 1% de todos os tumores malignos, mas é a principal causa de morte entre todos os tipos de câncer de pele, devido a sua alta propensão a metástases (ASHTON-PROLLA *et al*, 2007). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para as estimativas de câncer no Brasil em 2014, as maiores taxas estimadas de incidência do MM encontram-se na região Sul do país, com 800 novos casos no Rio Grande do Sul. Somado aos estados de Santa Catarina e Paraná, o número sobe para 1700 novos casos estimados para este ano. Além disso, apresenta-se mais frequente em populações de pele clara e expostas à radiação solar, enquanto que indivíduos de pele escura possuem menor risco de apresentá-la (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

A história de colonização do Rio Grande do Sul (RS) é caracterizada por influência Européia, devido ao grande número de imigrantes europeus não portugueses que se fixou no RS durante o século XIX (SALZANO & BORTOLINNI, 2002). Essa colonização resultou em expressivo percentual de indivíduos de pele, cabelos e olhos claros na população, e essas características fenotípicas são consideradas fatores de risco para o MM. Além destes fatores de risco, localização geográfica do RS – próximo à Linha do Equador e com alta incidência de luz

Ultravioleta (UV) - também parece estar envolvida no aumento da incidência desta enfermidade na população (BAKOS et al, 2002).

As associações entre genes e susceptibilidade ao Melanoma estão sendo cada vez melhor elucidadas com auxílio das ferramentas de análise molecular. O projeto internacional HapMap é uma colaboração entre cientistas e agências de fomento do Japão, Reino Unido, Canadá, Nigéria, China e Estados Unidos e tem como objetivo de facilitar essas análises, através do desenvolvimento de um mapa de haplótipos identificáveis no genoma humano, identificando e catalogando as similaridades e diferenças entre as sequências de DNA dos seres humanos de diferentes etnias (IBARROLA-VILLAVA *et al*, 2010). Iniciativas como essa reforçam a importância do estudo de biomarcadores adicionais com potencial relevância diagnóstica e/ou prognóstica para doenças como o MM e enfatizam que cada vez mais se torna importante reconhecer o padrão genotípico de uma população para se compreender melhor o comportamento genético dos tumores e orientar os indivíduos que apresentam maior susceptibilidade.

Visando compreender melhor as bases moleculares envolvidas na propensão e desenvolvimento do MM, o objetivo deste trabalho envolveu a investigação das frequências alélicas e genotípicas de três *SNPs* envolvidos na pigmentação da pele da população Sul-Riograndense (*rs1129038*, *rs1426654* e *rs16891982*) em amostras de MM e controles saudáveis. A investigação também abrangeu a associação dos polimorfismos com fator de risco fototipo, cor de olhos e cabelos. A metodologia adotada foi a discriminação alélica utilizando ensaios *TaqMan* nas amostras de DNA dos participantes do estudos, obtido a partir da extração da fraçãoleucocitária de sangue periférico. A determinação dos fototipos das amostras foi realizada através de entrevista realizada por dermatologista, utilizando os critérios da tabela de Fitzpatrick (The FitzpatrickSkin-Type Chart). Os resultados incluem a descrição das frequências alélicas e genotípicas dos *SNPs*, análises estatísticas para determinação de diferenças significativas entre os grupos de 120 pacientes com MM e de 135 controles saudáveis e associação com fatores de risco para MM.

1.1 Justificativa

O Melanoma Maligno (MM) é uma neoplasia potencialmente fatal e que vem apresentando um aumento sensível de sua incidência nas populações brancas de diversos países do mundo. São esperados 800 novos casos no ano de 2014 para o estado do Rio Grande do Sul (INCA, 2014). É o tipo mais fatal entre os cânceres de pele, causado pela transformação de melanócitos (células produtoras de pigmento) que acumulam alterações genéticas que resultam em proliferação e disseminação anormais (VULTUR & HERLYN, 2013). Sua etiologia é considerada heterogênea e complexa, e diversos estudos vêm tentando colaborar na compreensão dos principais mecanismos da patogênese dessa neoplasia e de como os fatores ambientais pode estar influenciando no desenvolvimento da doença. A região Sul do Brasil possui os maiores índices de MM do país, e embora vários fatores ambientais sejam sugeridos como agentes causadores, o papel da influência genética na pré-disposição à doença não está bem elucidado (ASHTON-PROLLA *et al*, 2007; BAKOS *et al*, 2011).

Atualmente, a prevenção primária do MM baseia-se em reconhecer os pacientes mais susceptíveis a desenvolvê-la. Esses pacientes apresentam características fenotípicas de presença de *nevus* melanocíticos em grande quantidade, geralmente fototipos I e II, cabelos e olhos claros como os principais aspectos (BAKOS *et al*, 2009). Além disso, a presença de mais de um caso de melanoma na família, foto exposição exagerada e o histórico de queimaduras solares ao longo da vida também são aspectos levados em consideração (CARVALHO, 2004; ASHTON-PROLLA, 2007). Recomenda-se que o indivíduo sob risco procure um dermatologista ao primeiro sinal de surgimento de novas manchas ou sinais na pele, ou modificações na cor, tamanho e bordas de lesões antigas, permitindo identificar possíveis cânceres em formação (INCA, 2014). Porém, essas recomendações são efetivas após o surgimento dos sinais iniciais, e são passíveis de interpretações errôneas por parte dos pacientes, que muitas vezes demoram a reconhecê-los e não possuem acesso ao aconselhamento adequado. Assim, muitos indivíduos podem vir a desenvolver manchas e sinais característicos do tumor sem se dar conta da gravidade que está associada à evolução deles, sendo imprescindível a consolidação de novas metodologias que auxiliem neste processo.

Neste sentido, análise molecular torna-se uma ferramenta importante e essencial, pois permite identificar os polimorfismos genéticos de baixa penetrância que podem interagir com o fator ambiental radiação UV e contribuir para aumentar a susceptibilidade às neoplasias malignas de pele. Além disso, aumenta a possibilidade de diagnosticar os portadores de mutações associadas ao desenvolvimento de MM antes de sua expressão no fenótipo dos indivíduos. Os polimorfismos identificados podem ser usados como biomarcadores que sugerem associações de maior risco para a doença, aconselhando, por exemplo, um acompanhamento clínico mais frequente do portador (BAKOS *et al*, 2011) .

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral:

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar as frequências alélicas e genotípicas dos três polimorfismos - *rs16891982* no gene *SLC45A2*; *rs1426654* no gene *SLC24A5*; e *rs1129038* no gene *HERC2*– em pacientes com Melanoma e indivíduos saudáveis (controles) pareados por sexo e idade e verificar se existe associação com a doença.

1.2.2 Objetivos específicos:

- a) Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos de única base (SNPs) *rs1426654* no gene *SLC24A5*; *rs16891982* no gene *SLC45A2* e *rs1129038* no gene *HERC2* na população estudada;
- b) Correlacionar a presença dos polimorfismos com fatores de risco para melanoma e características clínicas de apresentação, tais como fototipo, pigmentação de olhos e de cabelos.

2 Revisão da Literatura

2.1 Pigmentação em humanos – Aspectos gerais

Os traços de pigmentação humana, incluindo a variação nas cores de pele, olhos e cabelos é resultado de bases genéticas associadas a fatores ambientais, ainda pouco compreendidos e alvos de intensas pesquisas nas comunidades científicas ao redor do mundo (LIU, *et al*, 2013). No organismo humano existem diversas moléculas que são responsáveis pela pigmentação dos tecidos, tais como os carotenoides e a hemoglobina, mas a melanina é a principal molécula relacionada (LIN & FISHER, 2007). O sistema de pigmentação da pele, olhos e cabelos humanos é dependente primeiramente da produção de melanina, um biopolímero absorvedor de luz visível que ocorre em estruturas chamadas de melanócitos epidérmicos, oculares e foliculares (NORDLUND *et al*, 2006).

Os grânulos de melanina são sintetizados usando o aminoácido Tirosina, que é convertido em DOPA através de hidroxilação e posteriormente oxidado, virando Dopaquinona, através da enzima fundamental no processo de melanogênese, a Tirosinase (TYR). A Dopaquinona pode seguir por duas vias alternativas, dependendo a presença do aminoácido Cisteína. Quando ausente, a Dopaquinona dá origem ao DHI (5,6-dihidroindole) e ao DHICA (5,6-dihidroindole-2-ácido carboxílico), constituintes da chamada Eumelanina, enquanto que na presença de Cisteína, a Dopaquinona origina a Feomelanina (PARRA, 2007). As vesículas onde ocorrem os processos de melanogênese são chamadas de melanossomos. Os dois maiores tipos de melanossomos são produzidos e nomeados de acordo com o tipo de melanina que contém. Eumelassomo é maior (~0,9 x 0,3 μm) e tem formato elipsoidal, contendo matriz glicoproteica altamente ordenada, que integra a produção de eumelanina, com pigmentos nas cores preto e marrom. A feomelanina engloba

pigmentos vermelho e amarelo, e é produzida nos feomelanossomos, que são menores e esféricos (~0,7 um de diâmetro), compostos por uma matriz glicoproteica desorganizada (STURM *et al*, 2009). A eumelanina e a feomelanina são, em última instância, os pigmentos que determinam a vasta gradação de cores da pele, no espectro de luz visível para as retinas humanas. As bases genéticas dos mecanismos envolvidos na síntese desses dois pigmentos podem estar relacionadas também com desordens e doenças.

Entre indivíduos de diferentes origens étnicas, encontram-se variações quantificáveis no grau de melanização e de distribuição de melanossomos (NORDLUND *et al*, 2006). Esse padrão de distribuição é determinado por diretrizes genéticas ainda no desenvolvimento embrionário e não depende da exposição solar. Diferenças no grau de melanização, bem como as diferenças químicas nos pigmentos melânicos são os fatores determinantes na gradação visual da cor da pele (STURM *et al*, 2009). Porém, essa gradação também é assumida como um traço adaptativo moldado pela história recente de evolução. Uma forte correlação é observada entre a cor da pele dos seres humanos e as latitudes geográficas dos seus locais de origem, sugerindo fortemente que ao longo da evolução o ambiente induziu as adaptações genéticas, e que ambos desempenharam um papel chave no desenvolvimento da pigmentação (JABLONSKI & CHAPLIN, 2010; LIU *et al*, 2013).

Um dos fatores ambientais correlacionados com a latitude é a intensidade e duração da radiação solar, tendo como principal componente o ultravioleta (UV). A radiação UV é mais forte nas regiões equatoriais do planeta (que se localizam mais próximas a Linha do Equador, 0°C), onde cores de pele negras, resultado de alta concentração de Eumelanina, são comumente observadas. Nas regiões mais distantes do paralelo 0°C, as peles claras são encontradas em maior proporção (JABLONSKI & CHAPLIN, 2010) (Figura 1). A hipótese evolucionária mais popular para as variações na cor da pele envolve síntese de vitamina D e folato, explicada pela necessidade de absorção de radiação UV através da pele para a síntese de vitamina D (BRANDA & EATSON 1978). A vitamina D é responsável por manter a homeostase do cálcio, que por sua vez participa de diversas rotas bioquímicas em nosso organismo, e sua deficiência pode resultar em raquitismo e aumentar as chances de aborto espontâneo (MURRAY, 1934). Apesar da radiação UV permitir o

desenvolvimento saudável dos indivíduos, em altas concentrações ela causa uma série de malefícios, que vão desde queimaduras na pele até malformações neonatais. Sabe-se que a pigmentação escura da pele protege melhor contra os efeitos nocivos da radiação solar do que as peles pouco pigmentadas (RIJKEN *et al*, 2004). Para quem vive distante da intensa radiação UV, a cor clara da pele permite que ocorra a síntese de vitamina D mesmo com os baixos níveis de incidência.

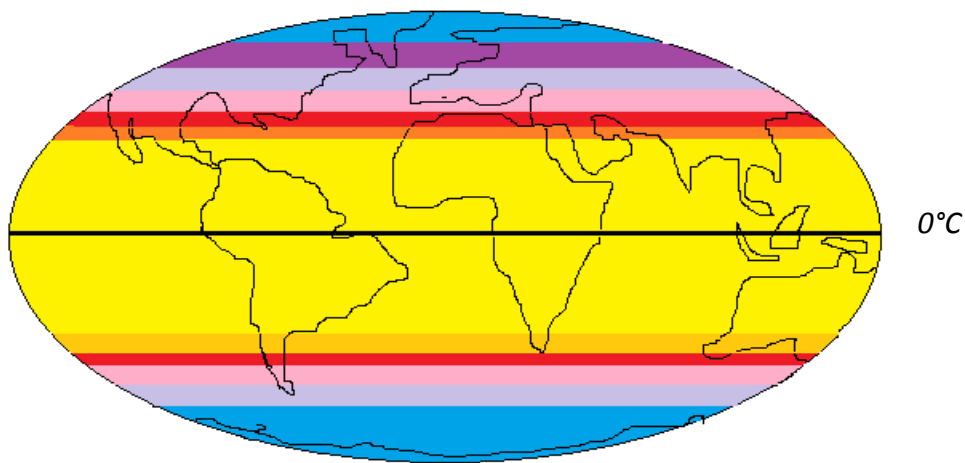


Figura 1. Representação esquemática da distribuição da luz ultravioleta no mapa mundi. A intensidade de radiação UV é indicada pelas gradações das cores quentes para as cores frias. Nos locais próximos a Linha do Equador (0°C) é possível encontrar alta frequência de pigmentações de pele escura, representados pela escala de cores quentes (amarelo, laranja e vermelho). À medida que ocorre o afastamento do paralelo 0°C, as pigmentações mais frequentes são as peles claras, representado pela escala de cores frias (rosa claro, lilás, roxo e azul). Essa forte correlação entre pigmentação da pele e localização geográfica sugere fortemente que as variações genéticas são resultado de interação com o ambiente. Adaptado de Jablonski, 2010. Figura Original.

2.2 Polimorfismos de Base Única (SNPs)

O genoma humano contém significativa variação genética. Essas extensas variações entre os indivíduos são impossíveis de catalogação e descrição sem auxílio de técnicas de Biologia Molecular, que permitem o acesso direto e objetivo da diversidade genética entre os indivíduos a nível conhecido como “*locus por locus*”. Essas técnicas não dependem de nenhum julgamento *a priori* sobre a significância da variação, sobre a variação ser entre indivíduos ou grupos e nem sobre a

quantidade de variação presente, pois discernem as espécies seguindo critérios de identificação passíveis de comprovação científica (LEWONTIN, 1972). As alterações mais comuns encontradas no genoma humano são as mutações pontuais ocasionadas por substituições de pares de bases únicos, que podem ser do tipo transições (A por G ou C por T) ou transversões (A por T ou C por G). Essas mutações são chamadas de “polimorfismos de única base”, ou “*SingleNucleotidePolymorphism(SNP)*” e geralmente localizam-se em regiões não codificadoras dos genes. O estudo desses polimorfismos em diferentes subpopulações contribui para o entendimento de nossa história genética evolutiva e para prever a susceptibilidade de indivíduos para doenças como câncer e cardiopatias. Os *SNPs* variam entre as populações, estando presentes ou ausentes e apresentando diferentes frequências genéticas(SNUSTAD & SIMMONS, 2013).

Atualmente, muitos grupos de pesquisa dedicam-se na elucidação da contribuição dos *SNPs* em diferentes pacientes e doenças, afim consolidá-los como biomarcadores de tratamento, diagnóstico e prognóstico. Através de técnicas como as citadas por Lewontin em 1972, porém enormemente aperfeiçoadas e precisas, esses polimorfismos estão auxiliando na identificação de genes causadores e de genes implicados na susceptibilidade a doenças de base genética, como câncer, esclerose lateral amiotrófica e artrite reumatoide (NAN *et al*, 2008; MENG *et al*, 2011; FANG *et al*, 2014).

2.2.1 Bases genéticas relacionadas à pigmentação da pele nos indivíduos do Rio Grande do Sul

As variações na cor da pele são consequências dos polimorfismos humanos mais visíveis conhecidos (JABLONSKI & CHAPLIN, 2010). Em uma busca na base de dados Online MendelianInheritance in Man (OMIM, 2014) – compêndio que abrange genes humanos, disponível para livre acesso e constantemente atualizado (<http://omim.org>) - utilizando as palavras-chave “pele” e “pigmentação”, o resultado foi 200 genes candidatos para a pigmentação da pele. Porém, o conhecimento acerca da herança de traços complexos como esse ainda é limitado, sobretudo em populações que não estão inseridas no eixo europeu-norte americano. Com intuito

de entender as variações genéticas envolvidas na pigmentação de populações altamente miscegenadas, Cerqueira *et al* avaliou a presença de oito *SNPs* em duas populações brasileiras oriundas do Sul e Nordeste do país, envolvidos direta ou indiretamente nas vias de pigmentação. Essas populações foram recrutadas pelo Consórcio para Análise da Diversidade e Evolução na América Latina (Projeto CANDELA). O Projeto CANDELA é um consórcio internacional multidisciplinar que envolve pesquisadores focados em estudar a diversidade biológica dos latino-americanos. Objetivando reunir dados de populações altamente miscigenadas, o CANDELA analisa amostras oriundas do México, Colômbia, Peru, Chile e Brasil, permitindo pela primeira vez a abordagem de uma ampla gama de questões relevantes à pesquisa antropológica, biológica e médica nessas populações (CANDELA, 2014).

Foram encontradas diferenças alélicas e fenotípicas entre as duas populações e três *SNPs* com relevância significativa na determinação da cor da pele na população Sul-Riograndense. Dois deles já foram descritos em associação com populações europeias e asiáticas (*SLC24A5 rs1426654* e *SLC45A2 rs16891982*) e um associado exclusivamente às populações estudadas (*HERC2 rs1129038*) (CERQUEIRA *et al*, 2014). Os principais dados publicados dos três polimorfismos avaliados neste estudo podem ser encontrados na Tabela 1.

2.2.2 *SLC45A2* (OMIM#606202) *rs16891982*

A primeira clonagem posicional bem sucedida no gene *SLC42A2* em modelo de peixes *medaka* (*AIM1*) revelou que o gene é responsável por codificar um transportador envolvido na síntese de melanina. Trata-se de uma proteína que possui 576 aminoácidos, 12 domínios transmembrana e apresenta 55% (304/543) de identidade com a proteína humana, expressa pelo gene equivalente em humanos. O alelo *b* deste gene, em condição de homozigose, origina uma variação de peixe vermelho-alaranjado. A formação de melanina nos mutantes *bb* é bastante leve, com erros na distribuição dos melanossomos. Nas clonagens em *medaka* foram encontradas mutações em sete dos oito mutantes examinados para o locus *b*, relacionadas com pigmentação dos peixes (FUKAMACHI *et al*, 2001). Em três linhagens humanas de melanona, foi identificado um antígeno chamado de proteína AIM1, composta por 530 aminoácidos. Análises moleculares detectaram o gene

AIM1 codificando dois transcritos, um com 1,7kb e outro com 2,8kb, em altos percentuais nas linhagens celulares de melanoma (HARADA *et al*, 2001). O gene foi mapeado no cromossomo 5p, contendo sete éxons, abrangendo uma região de aproximadamente 40kb (NEWTON *et al*, 2001). Através da segunda fase do projeto HapMap, que analisou em torno de três milhões de polimorfismos, foi possível determinar o envolvimento deste gene com a pigmentação na pele (HAPMAP, 2007). Graf *et al* examinaram a associação entre variação normal da cor da pele em populações Caucásicas, Asiáticas, Afro-americanos e Australianos Aborígenes, e encontraram associação o polimorfismo *rs16891982*(GRAF *et al*, 2005). Mais tarde, foi demonstrada associação também com variação na pigmentação de Sul-Asiáticos (STOKOWSKI *et al*, 2007).

O *SNP rs16891982* é uma variante do tipo *missense*, com significância clínica de patogenicidade, responsável pela troca C>G na posição 38088 do cromossomo 5 (5p13.2). Situado na região codificadora do gene, o *SNP* é responsável pela troca entre os aminoácidos Phe e Leu (Leu374Phe). O alelo 374Leu foi encontrado com alta frequência em populações não-Caucásicas, enquanto o alelo 374Phe foi associado com pigmentação mais escura de pele, cabelos e olhos nas populações com ancestralidade Européia (NAKAYAMA *et al*, 2002; GRAF *et al*, 2007). A associação deste polimorfismo com susceptibilidade ao melanoma foi confirmada pela primeira vez em Europeus no estudo de Stacey *et al*, que avaliou células basais de carcinoma em 3.326 casos e 5.439 controles (STACEY *et al*, 2009).

2.2.3 *SLC24A5* (OMIM #609802) *rs1426654*

Lamason *et al* postularam as primeiras afirmações acerca da associação do gene *SLC24A5* com mecanismos de pigmentação. Estudado em peixes zebrafishes (*Daniorerio*), identificaram a forma mutante do gene como responsável pela despigmentação dos melanóforos da pele e do epitélio na retina do animal, chamado de *zebrafishgolden*, que possui um atraso na formação da melanina durante a embriogênese. A forma selvagem do peixe apresenta melanóforos contendo numerosos e densos melanossomos e pigmentação normal. Existem 68% de identidade entre os aminoácidos de *zebrafishgolden* e mamíferos, suportando a conclusão de que se trata de genes ortólogos. Nos humanos, codifica proteína de membrana intracelular associada à regulação de concentração de Ca^{+2} nos

melanosomas, possuindo papel na pigmentação da pele (LAMASON *et al*, 2005). Por pertencer à família de trocadores sódio/cálcio dependente de potássio, possui dois grandes laços hidrofílicos e dois segmentos transmembrana (SCNETKAMP, 2004). O gene está localizado no cromossomo 15, e seu polimorfismo rs1426654 tem alto impacto na variação de pigmentação da pele.

O rs1426654 ocasiona a transição A>G na posição 18316 do cromossomo 15 (15q21.1). Situado na região codificadora do gene, é responsável pela troca entre os aminoácidos Thr e Ala (Ala111Thr) no terceiro éxon do gene. O alelo ancestral 111Ala tem alta frequência entre populações mais pigmentadas, como Africanos, Americanos indígenas e leste-Asiáticos, enquanto o alelo variante 111Thr é predominante em europeus e associado com a pigmentação clara da pele também em Afro-americanos e Afro-caribenhos (LAMASON *et al*, 2005; NORTON *et al*, 2007). Além deste *SNP* associado com as variações de pigmentações entre as populações, outro polimorfismo resultante da inserção de quatro novos nucleotídeos foi detectado no gene *SLC24A5*, de um indivíduo albino com extrema despigmentação cutânea (MONDAL *et al*, 2012).

2.2.4 *HERC2* (OMIM#605837) rs1129038

O gene *HERC2* pertencente à família de genes *HERC* que codifica proteínas com vários domínios estruturais. As partes estruturais dessas proteínas estão envolvidas no processo de ubiquitinação e degradação de proteínas-alvo (WU *et al*, 2010) e na síntese de proteínas em resposta a danos ao DNA (BEKKER-JENSEN *et al*, 2010). O gene *HERC2* foi mapeado no gene 15q11-q13, bastante perto do gene *P*, e tem sua região regulatória envolvida na expressão constitutiva de outro gene, o *OCA2*, relacionado à pigmentação e associado por conferir risco à predisposição ao MM em diversas populações (DUFFY *et al*, 2004; LANDI *et al*, 2005; MOCELLIN & NITTI, 2008). A região 15q13, onde *HERC2* foi identificado, está ligada a determinação de cores na íris humana (KAYSER *et al*, 2008). RNF8 é uma E3 Ubiquitinaligase que cataliza a formação de histonas H2A nos sítios de dano ao DNA, e foi encontrada interagindo com a região C-terminal de *HERC2* em células da linhagem HEK293T. As quinases de resposta ao dano no DNA ATM, ATR e DNAPK também interagem na mesma região, e a associação de *HERC2* com RNF8 aumentou após a exposição das células à radiação ionizante para indução de danos.

Depleção do gene *HERC2* na linhagem HEK239T não prejudicou o acúmulo de RNF8 nos sítios de dano, mas causou falhas no processo de poli-ubiquitinação da histona H2A e acúmulo de fatores de sinalização e de reparo de danos ao DNA (BEKKER-JENSEN *et al*, 2010).

Outra interação descoberta recentemente é a de *HERC2* como uma E3 ligase que ubiquitina BRCA1 para sua degradação durante a fase S do ciclo celular. Seu domínio HECT interage com o domínio N-terminal de *BRCA1*, marcando-o para degradação (WU *et al*, 2010). O modelo animal proposto por Ji e colaboradores foi um camundongo que teve mutação induzida por componentes químicos (*jdf2*). Os alelos mutantes resultaram em defeitos nas vesículas secretoras neuromusculares, defeitos na região do acrossoma nos espermatozoides do animal e letalidade juvenil (JI *et al*, 1999).

A maioria dos polimorfismos já encontrados em *HERC2* estão relacionados com pigmentação da pele, cabelos e olhos. O *SNP rs1129038* é responsável pela transição A>G na posição 215437 do cromossomo 15 (15q13.1). Foi observado pela primeira vez por Eiberg *et al*, uma associação significativa do alelo G com fenótipo de olhos azuis em famílias Dinamarquesas – haplótipo fundador comum contendo este *SNP* foi identificado entre as pessoas com olhos azuis na Dinamarca, Turquia e Jordânia. Ensaios funcionais de expressão *in vitro* em células humanas de carcinoma do cólon mostraram a presença do alelo G como um efeito inibitório na atividade de *OCA2* (EIBERG *et al*, 2008).

Tabela 1. Informações dos polimorfismos investigados neste estudo

SNP	Gene	Localização Cromossômica	Localização Gênica ¹	Tipo de alteração ¹	Alelo ancestral ¹	MAF* ¹
<i>rs16891982</i>	<i>SLC45A2</i>	5p13.2	Região codificadora	Tranversão C>G entre Phe e Leu (Phe374Leu)	C	G=0.2750
<i>rs1426654</i>	<i>SLC24A5</i>	15q21.1	Região codificadora	Transição A>G entre Thr e Ala (Ala111Thr)	G	A=0.4377
<i>rs1129038</i>	<i>HERC2</i>	15q13.1	Primeira variante 3' UTR do gene	Transição A>G	G	T=0.1769

*MAF= Minor Allele Frequency

¹dados obtidos nos bancos de dados dbSNP e OMIM

2.3 Melanoma Cutâneo Maligno

O melanoma é definido como uma neoplasia derivada de melanócitos, que envolve transformações malignas destas células, que acumulam alterações genéticas, levando a anormal proliferação e disseminação (VULTUR & HERLYN, 2013). Algumas características do processo de malignificação de melanócitos, resultando em Melanoma, foram descritas pela primeira vez em 1981, através de análises de linhagens celulares de melanomas e comparação com melanócitos saudáveis, onde foram descritas diferenças morfológicas e identificados 34 antígenos diferenciais secretados na superfície de células de melanoma (HOUGHTON & VIOLA, 1981).

O Melanoma Maligno (MM) constitui neoplasia de caráter altamente agressivo, sendo considerado o tumor cutâneo mais importante quanto ao diagnóstico precoce. Representando um desafio para pacientes e sistemas públicos de saúde ao redor do mundo, os casos de Melanoma estão aumentando mais rapidamente do que qualquer outro tipo de câncer, particularmente em populações de origem Europeia. Um relativo aumento na incidência de melanoma é esperado nas regiões com extensiva imigração Europeia, como nos países da América Latina. Contudo, existem poucos dados acerca da incidência e prevalência nestes locais (SCHMERLING *et al*, 2011).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para as estimativas de câncer no Brasil em 2014, as maiores taxas estimadas de incidência do MM encontram-se na região Sul do país, com 800 novos casos no Rio Grande do Sul. Somado aos estados de Santa Catarina e Paraná, o número sobe para 1700 novos casos estimados para este ano. Além disso, apresenta-se mais frequente em populações de pele clara e expostas à radiação solar, enquanto que indivíduos de pele escura possuem menor risco de apresentá-la (INCA 2014).

2.3.1 Fatores de risco associados e prevenção primária

Modulando a manifestação dessa enfermidade, há diversos fatores de risco, que estão envolvidos em processos cutâneos e pigmentares. Um dos principais

fatores de risco associados ao Melanoma Maligno é um fator ambiental fortemente correlacionado com as latitudes geográficas e a intensidade e duração da radiação solar, incluindo a exposição ao componente Ultravioleta (UV). Nos locais de maior incidência de raios UV, como as regiões Equatoriais ao redor do mundo, são mais comumente observados indivíduos com cor da pele mais escura do que nas regiões distantes da Linha do Equador (LIU *et al*, 2013). Portanto, um dos fatores de risco para desenvolvimento de MM relaciona-se com a variabilidade natural na cor da pele, um traço adaptativo assumido pela recente história da evolução.

No campo da prevenção de neoplasias e detecção precoce, é importante definir claramente alguns termos comumente usados. Os termos “notificação de novos casos”, “rastreio” e “vigilância” recebem as seguintes definições, segundo MacKie, 1996: “notificação de novos casos” refere-se à disseminação de informações relativas ao MM precoce tanto para o público quanto para a equipe de cuidados primários em saúde, e estimular o autoexame individual na pele e a notificação a um centro de referência se identificado lesão de pele preocupante. O termo “rastreio” para melanoma envolve exame sistemático na população, através de rastreio sistemático de um grupo selecionado oriundo de uma área geográfica específica. Os indivíduos desta população a serem rastreados podem ser selecionados com base na idade, sexo, ou ainda características envolvidas no aumento de risco para o melanoma, como histórico familiar. O termo “vigilância” refere-se a exames contínuos em intervalos regulares em indivíduos, para reconhecimento de novas lesões pigmentadas que podem ser características de melanoma precoce. Trata-se de exercício laborioso e é comumente confinado a um pequeno número de centros que desenvolvem pesquisas de interesse nesta área, examinando indivíduos que são conhecidos por terem risco aumentado de desenvolvimento de melanoma maligno. São incluídos indivíduos que já tiveram MM primário e que possuem histórico familiar de melanoma (MACKIE, 1996).

2.3.2 Fototipos

Atualmente, a prevenção primária do MM baseia-se em reconhecer pacientes com maior propensão ao seu desenvolvimento, com base nas características fenotípicas aparentes, como fototipo da pele. Porém, sabe-se que a ancestralidade

dos indivíduos é um fator importante a ser investigado a nível molecular. Avaliar a presença de variantes genéticas em genes de alta frequência em determinada população é importante para a identificação de subgrupos que possam apresentar maior risco de desenvolvimento desta neoplasia, bem como orientar medidas mais adequadas de prevenção (BAKOS *et al*, 2009). As evidências epidemiológicas de aumento na incidência de melanoma em indivíduos de pele clara datam de estudos desde 1983, e sugerem relação com maior exposição à luz solar (MACKIE, 1983). Contudo, a associação entre exposição à luz solar e desenvolvimento do CMM não é linear, e a exata sequência de eventos responsáveis pelo início do tumor até a expressão clínica dos sintomas ainda não está claramente definida.

Segundo a Tabela de tipos de pele Fitzpatrick (The Fitzpatrick Skin-Type Chart), existem cinco tipos de pigmentação diferentes entre os indivíduos, que são determinados por fatores genéticos e ambientais, tais como reação a exposição solar e hábitos de bronzeamento. Esta tabela baseia-se na escala criada por Thomas B. Fitzpatrick, médico do Departamento de Dermatologia de Harvard, conhecido hoje como “o pai da medicina dermatológica moderna” e “o mais influente dermatologista dos últimos cem anos”, sendo um dos primeiros pesquisadores no campo do melanoma maligno (MIHM & SOBER, 2004). A escala classifica os tipos de pele de acordo com a resposta a luz ultravioleta (UV) e inclui os tipos de pele cuja Eumelanina é prevalente. A partir das observações feitas por Fitzpatrick, foi possível determinar padrões para classificação dos tipos de pele, que variam entre o tipo I – peles altamente sensíveis, que sempre reagem com queimaduras à exposição solar e nunca se bronzeiam – até o tipo VI – peles insensíveis ao sol, altamente pigmentadas (FITZPATRICK, 1988). Além da pigmentação da pele, as análises incluem pigmentação de olhos e cabelos. Os tipos de pele classificados, conhecidos como fototipos, e os tipos de pigmentação de olhos e cabelos estão descritos na Tabela 2e são utilizados comumente na prática dermatológica para associação com risco de desenvolvimento de MM.

No Brasil, a história de colonização do Rio Grande do Sul (RS) é caracterizada por grande influência Européia, resultado de um grande número de imigrantes europeus não portugueses que se fixou no RS durante o século XIX (SALZANO & BORTOLINI, 2002). Como consequência, a população do estado do

Rio Grande do Sul apresenta uma maior propensão ao desenvolvimento desta neoplasia, devido a grande parcela da população possuir pele clara e da localização geográfica e hábitos culturais que estimulam exposição solar durante o período do verão (BAKOS *et al*, 2002). Um estudo epidemiológico mais recente, que avaliou dados de 30 anos na população do município de Blumenau, situado no estado de Santa Catarina, também serve como referência para a maioria dos municípios do Sul do Brasil, onde há intensa radiação solar atingindo populações de pele clara, resultantes de colonização europeia, mostra que a taxa bruta de Melanoma aumentou de 4,4 para 22,4 a cada 100.000 habitantes (NASSER, 2011). Porém, são poucos os estudos destinados a avaliar populações com alto teor de miscigenação, sendo importante o desenvolvimento de conhecimento básico e aplicado na área.

Tabela 2. Classificação de Fototipos, pigmentação de olhos e cabelos, de acordo com a Tabela de Fitzpatrick

Fototipos	Características do indivíduo
I	Pele altamente sensível ao sol, sempre se queima, nunca se bronzeia
II	Pele muito sensível ao sol, queima-se facilmente, bronzeia-se minimamente
III	Pele sensível ao sol, queima-se razoavelmente, bronzeia-se lentamente
IV	Pele minimamente sensível ao sol, bronzeia-se sempre moderadamente
V	Pele insensível ao sol, raramente se queima, sempre bronzeia-se
Cor de Olhos	
I	Olhos azuis esverdeados, cinzas ou verdes
II	Olhos azuis
III	Olhos castanhos
IV	Olhos preto-acastanhados
V	Olhos pretos
Cor de Cabelos	
I	Cabelos Loiros
II	Cabelos Castanhos
III	Cabelos Castanho-escuros
IV	Cabelos Pretos
V	Cabelos Grisalhos

3 Metodologia

3.1 População estudada

O número amostral total utilizado neste estudo foi de 255 indivíduos, sendo 61,6% de mulheres. A coorte de pacientes com Melanoma Maligno que foi avaliada foi composta por 120 pacientes recrutados pelo Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (um hospital geral, público e terciário que atende em sua vasta maioria usuários do Sistema Único de Saúde, SUS), no período de Setembro de 2007 e Novembro de 2008. A idade média dos pacientes com MM foi de 56.2 anos e todos os diagnósticos foram confirmados por análises anatomopatológicas. O grupo controle foi composto por 135 pacientes recrutados pelo mesmo departamento de Dermatologia, que procuraram atendimento por outros motivos que não câncer de pele. Esses pacientes não tinham histórico pessoal ou familiar de MM e a idade média ao recrutamento foi de 58,28 anos. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa, sob CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – nº 38602314.4.0000.5327 (Anexo A). O Consentimento Informado Livre e Esclarecido foi obtido de todos os pacientes antes da inclusão no estudo (Anexos B e C), e todos os participantes dispostos a participar foram clinicamente examinados. Foram documentados os seus fototipos de acordo com a classificação de Fitzpatrick através de entrevista com médico Dermatologista, realizada análise quantitativa e qualitativa de nevos, e registrada a data do surgimento das primeiras lesões dos pacientes com MM.

3.2 Extração DNA à partir de sangue periférico

A avaliação dos polimorfismos *rs16891982* no gene *SLC45A2*; *rs1426654* no gene *SLC24A5*; e *rs1129038* no gene *HERC2* foi realizada a partir do DNA

previamente extraído de leucócitos (Ashton-Prolla *et al*, 2007), de acordo com o método “*salting out*” (MILLER *et al*, 1988). As genotipagens foram realizadas no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, vinculado a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.3 Quantificação e diluição DNA

A concentração do DNA das amostras foi mensurada por espectrofotometria, através do equipamento *NanoDrop*, *ThermoScientific*. Todas as amostras de DNA foram diluídas a uma concentração final de 20ng/μL utilizando água de injeção como diluente, para satisfazer as condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

3.4 Genotipagem por discriminação alélica usando ensaios *TaqMan*

Os polimorfismos investigados foram selecionados de acordo com os dados publicados por Cerqueira *et al*, 2014. Esses polimorfismos foram detectados nas amostras pela PCR em tempo real através da metodologia *TaqMan*[®] de discriminação alélica da *Applied Biosystemby Life Technologies*, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e sondas específicas. Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante, e a padronização do experimento, utilizando-se de 1μL de amostra (na concentração de 20 ng) para as reações. Nos casos em que a reação não apresentava amplificação, a amostra foi concentrada para 25ng.

3.5 Análises estatísticas

As frequências genotípicas foram obtidas por contagem simples e as frequências alélicas foram calculadas a partir das frequências genotípicas. O banco de dados foi construído em planilha excele a análise estatística foi realizada com o programa estatístico StatisticalPackage for Social Sciences v.18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Foi considerado como significativo um valor de $p < 0,05$. As análises foram realizadas considerando a amostra completa os grupos separadamente (casos e controles). Também foram verificadas as variáveis quantitativas cor de olhos e

cabelos quanto diferença entre os grupos da classificação de Fitzpatrick. A verificação da associação entre os genótipos e a modificação percentual média de cada variável após o tratamento foi testada pelo método de Teste de Person Qui-quadrado.

4. Resultados

Foram incluídas neste estudo amostras de DNA de 120 pacientes diagnosticados com Melanoma e 135 controles. A idade média dos indivíduos manteve-se similar, com média de 56,3 anos entre os casos e 58,2 anos entre os controles. Quanto aos fototipos identificados nos pacientes, entre a totalidade das amostras (n= 255), a distribuição encontrada foi de 145 indivíduos com fototipos I e II – peles altamente sensíveis ao sol, sempre ou frequentemente apresentam queimaduras, nunca ou dificilmente se bronzeiam - e 110 com fototipos III, IV e V – peles menos sensíveis ao sol, que se queimam pouco e geralmente se bronzeiam - segundo a classificação de Fitzpatrick para fototipos (Fitzpatrick, 1988). Além disso, as cores de olhos e cabelos foram classificadas de acordo com tipo I: para olhos azuis esverdeados, cinzas ou verdes (27,5%) e para cabelos loiros (20,4%); tipo II: para olhos azuis (18,4%) e para cabelos castanhos ou loiro escuro (4,3%); tipo III: para olhos marrons (0,4%) e para cabelos castanhos escuros (8,2%); tipo IV: para olhos preto-acastanhados (51,4%)e para cabelos pretos (34,9%) e o tipo V: para olhos pretos (2,4%)e para cabelos grisalhos (32,2%). As características dos indivíduos recrutados para este estudo estão resumidas na Tabela 3.

As frequências genóticas e alélicas encontradas na investigação dos polimorfismos *rs16891982*, *rs1426654* e *rs1129038* nos casos e controles estão descritas na Tabela 4. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na comparação das frequências entre os casos e os controles. O alelo G (variante), em homozigose no polimorfismo *rs16891982* foi mais frequente no grupo de casos, representando 85,8% das amostras positivas para MM e em 68,9% dos controles ($P= 0,002$). Para o polimorfismo *rs1426654*, o genótipo AA foi mais frequente no grupo casos do que nos controles, sendo as proporções encontradas de 97,5% nos casos e 82,2% nos controles ($P < 0,001$). O polimorfismo *rs1129038* também exibiu frequências significativamente diferentes entre casos e controles, sendo o alelo G

em homozigosemais frequente nos pacientes com melanoma do que controles. Os resultados sugerem uma associação dos polimorfismos estudados com MM.

Nas análises defrequência dos polimorfismos em relação aos fototiposestes foram estratificados em dois grupos, devido ao pequeno número amostral atribuído a alguns dos grupos, sendo o grupo “I+II” constituído dos fototipos I e II e o grupo “III+IV+V” constituído dos fototipos III, IV e V. As cores de olhos e cabelos foram classificadas de acordo com a tabela de Fitzpatrick. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 3. Características dos indivíduos recrutados para o estudo (N=255)

Características	Grupos de estudo	
	Casos	Controles
N (%)	120 (47,05)	135 (52,94)
Idade média	56,31	58,28
Fototipos* das amostras	N (%)	
I	9 (3,5)	
II	136 (53,3)	
III	100 (39,2)	
IV	7 (2,7)	
V	3 (1,2)	
Cor de Olhos* das amostras	N (%)	
I	70 (27,5)	
II	47 (18,4)	
III	1 (0,4)	
IV	131 (51,4)	
V	6 (2,4)	
Cor de Cabelos* das amostras	N (%)	
I	52 (20,4)	
II	11 (4,3)	
III	21 (8,2)	
IV	89 (34,9)	
V	82 (32,2)	

*Classificações baseadas na Tabela de Fitzpatrick

Tabela 4. Frequências Genotípicas e Alélicas dos polimorfismos *rs16891982*, *rs1426654* e *rs1129038* nos grupos de estudo: casos (N= 120) e controles (N=135)

SNP	Frequências Genotípicas N (%)			Frequências Alélicas		P*
	CC	CG	GG	C	G	
<i>rs16891982</i>						
Casos	1 (0,8)	16 (13,3)	103 (85,8)	0,07	0,92	
Controles	10 (7,4)	32 (23,7)	93 (68,9)	0,19	0,8	0,002
<i>rs1426654</i>						
Casos	117 (97,5)	2 (1,7)	1 (0,8)	0,98	0,01	
Controles	111 (82,2)	23 (17,0)	1 (0,7)	0,91	0,09	<0,001
<i>rs1129038</i>						
Casos	24 (20)	45 (37,5)	51 (42,5)	0,39	0,61	
Controles	38 (28,1)	62 (45,9)	35 (25,9)	0,51	0,48	0,018

*P = casos versus controles para as análises genotípicas (Teste de Person Qui-quadrado)

Tabela 5. Frequências Genotípicas dos polimorfismos *rs16891982*, *rs 1426654* e *rs1129038* de acordo com fototipo, cor de olhos e cabelos (N=255)

SNP		Frequências Genotípicas N (%)				P*
<i>rs16891982</i>		CC	CG	GG	Total (%)	
Fototipo	I+II	0 (0,0)	17 (11,7)	128 (88,3)	145 (100,0)	<0,001
	III+IV+V	11 (10,0)	31 (28,2)	68 (61,8)	110 (100,0)	
Cor de olhos	I	0 (0,0)	4 (5,7)	66 (94,3)	70 (100,0)	<0,001
	II	0 (0,0)	9 (19,1)	38 (80,9)	47 (100,0)	
	III	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
	IV	10 (7,6)	34 (26,0)	87 (66,4)	131 (100,0)	
	V	0 (0,0)	1 (16,6)	5 (83,3)	6 (100,0)	
Cor de cabelos	I	0 (0,0)	4 (7,7)	48 (92,3)	52 (100,0)	<0,001
	II	0 (0,0)	3 (27,3)	8 (72,7)	11 (100,0)	
	III	3 (2,3)	10 (47,6)	8 (38,1)	21 (100,0)	
	IV	8 (9,0)	26 (29,2)	55 (61,8)	89 (100,0)	
	V	0 (0,0)	5 (6,1)	77 (93,9)	82 (100,0)	

SNP		Frequências Genotípicas N (%)				P*
<i>rs1426654</i>		AA	AG	GG	Total (%)	
Fototipo	I+II	137 (94,5)	7 (4,8)	1 (7,0)	145 (100,0)	0,004
	III+IV+V	91 (82,7)	18 (16,4)	1 (9,0)	110 (100,0)	
Cor de olhos	I	70 (100,0)	0 (0,0)	0(0,0)	70 (100,0)	<0,001
	II	45 (95,7)	2 (4,3)	0 (0,0)	47 (100,0)	
	III	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
	IV	108 (82,4)	21 (16)	2 (1,5)	131 (100,0)	
	V	5 (83,3)	1 (16,6)	0 (0,0)	6 (100,0)	
Cor de cabelos	I	51 (98,1)	1 (1,9)	0 (0,0)	52 (100,0)	0,019
	II	11 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (100,0)	
	III	15 (71,4)	6 (28,6)	0 (0,0)	21 (100,0)	
	IV	76 (85,4)	12 (13,5)	1 (1,1)	89 (100,0)	
	V	75 (91,46)	6 (7,3)	1 (1,2)	82 (100,0)	

SNP		Frequências Genotípicas N (%)				P*
<i>rs1129038</i>		AA	AG	GG	Total (%)	
Fototipo	I+II	16 (11,0)	55 (37,9)	74 (51)	145 (100,0)	<0,001
	III+IV+V	46 (41,8)	52 (47,3)	12 (10,9)	110 (100,0)	
Cor de olhos	I	1 (1,4)	6 (8,6)	63 (90,0)	70 (100,0)	<0,001
	II	3 (6,4)	24 (51,1)	20 (42,6)	47 (100,0)	
	III	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
	IV	56 (42,7)	72 (55)	3 (2,3)	131 (100,0)	
	V	1 (16,6)	5 (83,3)	0 (0,0)	6 (100,0)	
Cor de cabelos	I	1 (1,9)	19 (36,5)	32 (61,5)	52 (100,0)	<0,001
	II	1 (9,1)	4 (36,4)	6 (54,5)	11 (100,0)	
	III	8 (38,1)	10 (47,6)	3 (14,3)	21 (100,0)	
	IV	38 (42,7)	36 (40,4)	15 (16,9)	89 (100,0)	
	V	14 (17,1)	38 (46,3)	30 (36,6)	82 (100,0)	

*P = valores obtidos pelo Teste de Person Qui-quadrado entre os grupos I+II versus III+IV+V; entre os grupos I, II, III, IV e V de cor de olhos e entre os grupos I, II, III, IV e V de cor de cabelo.

5 Discussão

Este foi o primeiro estudo de investigação dos *SNPs* *rs16891982*, *rs1426654* e *rs1126809* em pacientes enfermos com Melanoma Maligno oriundos do Rio Grande do Sul. O objetivo foi elucidar as frequências genéticas da doença e seu comportamento na população do RS. O MM é o câncer de pele mais agressivo e resistente aos tratamentos existentes, e a pigmentação humana parece ser um fator de risco extremamente significativo para o seu desenvolvimento. Porém, é difícil determinar se as variantes genéticas que ocasionam a pele clara são também responsáveis por um maior risco de melanoma e neoplasias associadas ou se a pele clara, determinada por polimorfismos, contém pouca quantidade de melanina o que a torna mais sensível à radiação UV e essa exposição é a causadora do efeito (LIU *et al*, 2013). Mitra *et al* deram os primeiros passos para elucidar a questão, mostrando em camundongos que as vias de produção do pigmento Feomelanina encontravam-se ativas independente de radiação UV, e que essas vias contribuíram para processos carcinogênicos devido ao dano oxidativo gerado às células. No entanto, o desenvolvimento de MM é potencializado na presença de luz UV, e provavelmente, ambos somam-se para levar ao aumento do risco (MITRA *et al*, 2012).

Um dos genes conhecidos por conter polimorfismos associados com melanoma é o *SLC45A2*, cuja associação foi demonstrada pela primeira vez na população europeia de Madrid, na Espanha (FERNANDEZ *et al*, 2008). O gene codifica um transportador proteico associado a membranas envolvido na síntese de melanina e expresso em altos percentuais nas linhagens celulares de Melanoma, sendo bem relacionado com a evolução da cor clara de peles em humanos (SOEJIMA *et al*, 2006; NORTON *et al*, 2007). O *SNP* *rs16891982*(L347F) é bem reconhecido em populações Caucásicas, associado como um fator de proteção ao melanoma na condição homocigota do alelo G (347L), que está relacionado com

peles, cabelos e olhos escuros e essa condição apresenta-se pouco frequente nos Europeus de pele clara (FERNANDEZ *et al*, 2008; GUEDJ *et al*, 2008; YUASA *et al*, 2006). Em nosso estudo, este mesmo alelo apresentou-se mais frequente nos pacientes com MM (85,8% GG) em relação aos controles (68,3% GG). Em concordância com os achados de Cerqueira e colaboradores, 347L foi identificado neste estudo em maior percentual nos indivíduos com fototipo I e II (88,3%), que correspondiam a peles claras, enquanto que a presença do alelo C em condição homo ou heterozigota foi maioria nos fototipos III, IV e V (38,2% contra 11,7% nos fototipos I e II) (CERQUEIRA *et al*, 2014). Entre as populações Caucasianas, que incluem Europeus, oeste e sul-Asiáticos e norte-Africanos, as frequências dos genótipos distribuídos entre os fototipos apresentam padrão diferente do encontrado na população miscigenada do RS. Germânicos tiveram a mais alta frequência do alelo F347 (96,5%), seguidos por Franceses (89,3%), Italianos (85,1%) e Turcos oriundos do oeste da Alemanha (61,5%). A fixação do alelo C entre Europeus é encarada como uma resposta a menor incidência de radiação UV que acomete os países e a associação com hipopigmentação (YUASA *et al*, 2006). Esses achados podem sugerir que a frequência de GG encontrada em maior percentual nos indivíduos de pele clara do Rio Grande do Sul é explicada pela localização geográfica do estado em proximidade a Linha do Equador e consequente maior incidência de UV.

O polimorfismo *rs1426654*, situado no gene *SLC24A5*, é responsável pela variação não-sinônima p.A111T, onde ocorre uma variação entre os alelos A e G, dando origem aos diferentes aminoácidos alanina e treonina, respectivamente (LAMASON *et al*, 2005). Na amostra investigada, a frequência do alelo A apresentou maior, sugerindo-o como um alelo fixado nesta população (89,4% dos indivíduos apresentaram o alelo A na condição de homozigose, contra apenas 0,8% do alelo G). A alta frequência deste alelo também é encontrada em várias populações Europeias, variando de 98,7 a 100%, sugerindo forte associação de fixação deste alelo (LAMASON *et al*, 2005; NORTON *et al*, 2006; HAPMAP, 2007). Porém, a variação de cores de pele, cabelos e olhos em Europeus indicam que existem outros genes que contribuem para a pigmentação entre as populações (LAMASON *et al*, 2005). Um estudo de associação genômica – GWAS, Genome-wide association study - em populações sul-Asiáticas oriundas da Índia, Paquistão, Bangladesh e Sri Lanka

mostrou a forte associação existente entre o polimorfismo *rs1426654* e a variação natural na pigmentação da pele, e uma alta frequência do alelo A também nessas populações, consideradas altamente miscigenadas (STOKOWSKI *et al*, 2007). Em contrapartida, um estudo de GWAS em populações africanas Etiopês, sul-Sudaneses e Somalianas caracteriza o alelo G como um “componente africano”, fortemente associado aos fototipos mais pigmentados encontrados nessas populações (PAGANI *et al*, 2012). Em nossas amostras, o alelo A mostrou-se mais frequente na condição homozigota nos casos (97,5%) do que nos controles (82,2%). Além da frequência de AA ter sido maior entre os casos, ela também se manteve maior entre os fototipos I e II, olhos azuis e cabelos loiros, que são características fenotípicas envolvidas com determinação maior de risco para desenvolvimento de neoplasias epidermais. Estes achados podem sugerir pela primeira vez uma associação como alelo A ao risco de susceptibilidade para MM no Rio Grande do Sul.

O alelo ancestral G, em condição homozigota no *SNPrs1129038* apresentou-se significativamente mais frequente nos pacientes com melanoma do que nos controles, o que sugere neste trabalho uma associação com a doença. Variantes genéticas do gene *HERC2* estão ligadas a variabilidade na pigmentação de pele, cabelos e olhos. Sabe-se que o melhor *SNP* para predição de cor de olhos é o *rs12913832*, também presente em *HERC2*, e que a região conservada ao redor dele regula a expressão constitutiva de *OCA2*, o gene conhecido como maior contribuidor da variação humana para cor de olhos. O alelo C deste *SNP* leva a uma diminuição da expressão de *OCA2*, particularmente nos melanócitos da íris, pois impede a ligação de um fator de transcrição (HLTF) que regula esta expressão (EIBERG *et al*, 2007). Em nossos resultados, encontramos forte associação do *SNP rs1129038* com a cor de olhos azuis, concordando com os achados expostos por Eiberg e colaboradores (EIBERG *et al*, 2007). A alta frequência do genótipo GG nos indivíduos de cor de olhos tipo I (90%) e tipo II (42,6%), e do genótipo AG no fenótipo tipo II (51,1%) demonstram essa associação. O genótipo GG também foi mais frequente nos fototipos I e II (51% de GG contra 11% de AA) e nos cabelos tipo I (61,5% de GG contra 1,9% de AA). Em nossas análises, a presença do alelo A esteve mais frequente nos indivíduos de cabelos e olhos escuros. A combinação da presença do genótipo GG em maior frequência em casos de melanoma, peles cor de olhos e

cabelos claros demonstra que essas características podem estar relacionadas na predição de risco e susceptibilidade ao melanoma.

6 Considerações Finais

O objetivo deste estudo foi avaliar pela primeira vez a presença dos *SNPs* *rs16891982*, *rs1426654* e *rs1129038* em uma coorte de indivíduos oriundos do Rio Grande do Sul. Encontrou-se maior frequência dos três *SNPs* em condição homocigota nos casos do que nos controles, sendo o genótipo GG do *rs16891982*, o genótipo AA do *rs1426654* e o genótipo GG no *rs1129038* mais frequentes nos pacientes com melanoma. Os genótipos associados aos casos foram também mais frequentes nas características fenotípicas que são consideradas como fatores de risco para o MM, tais como fenótipo I e II, cor de olhos e cabelos claros. As diferenças entre as frequências foram significativas, porém, maiores estudos serão realizados com intuito de aprimorar a investigação e consolidar o uso desses polimorfismos como marcadores genéticos de susceptibilidade ao melanoma.

Referências Bibliográficas

ASHTON-PROLLA, P., BAKOS, L., JUNQUEIRA JR, G., GIUGLIANI, R., AZEVEDO, S. J., HOGG, D. Clinical and Molecular Characterization of Patients at Risk for Hereditary Melanoma in Southern Brazil. **Journal of Investigative Dermatology**, v.128,p. 421-425, 2007.

BAKOS, L., WAGNER, M., BAKOS, R., LEITE, C. S. M., SPERHACKE, C. L., DZEKANIAK, K. S., GLEISNER, A. L. M. Sunburn, sunscreens and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. **International Journal of Dermatology**, v. 41, p. 557-562, 2002.

BAKOS, Renato. **Estudo de Fatores Genéticos envolvidos no Melanoma cutâneo**. 2009. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

BAKOS, R. M., BESCH, R., ZORATTO, G. G., GODINHO, J. M., MAZZOTTI, N. G., RUZICKA, T. *et al.* The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. **Experimental Dermatology**, v.20, p. 890-893, 2011.

BALCH, C. M., MIHM, M. C. JR., GERSHENWALD, J. E., SOONG, S. The Revised Melanoma Staging System and the Impact of Mitotic Rate. **The Melanoma Letter Skin Cancer Foundation**. New York, 2014.

BEKKER-JENSEN, S., RENDTLEW DANIELSEN, J., FUGGER, K., GROMOVA, I., NERSTEDT, A., LUKAS, C. *et al.* HERC2 coordinates ubiquitin-dependent assembly of DNA repair factors on damaged chromosomes. **Nature Cell Biology**, v. 12, p. 80-86, 2010.

BRANDA, R. F. & EATON, J. W. Skin Color and Nutrient Photolysis: An Evolutionary Hypothesis. **Science**, v. 201, n.18, p. 625-626, 1978.

CAIRNS, J. Mutation selection and the history of cancer. **Nature**, v.255, p. 197-200, 1975

CANDELA - CONSORTIUM FOR THE ANALYSIS OF THE DIVERSITY AND EVOLUTION OF LATIN AMERICA. **University College London**. Disponível em <<http://www.ucl.ac.uk/candela>> Acesso em 10/10/2014.2014

CARVALHO, A. C., CUNHA, M.E., GIUGLIANI, R., BAKOS, L., ASHTON-PROLLA, P. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, n.1, p. 53-60, 2004.

CERQUEIRA, C. C. S., HUNEMEIER, T., GOMEZ-VALDÉS, J., RAMALLO, V., VOLASKO- KRAUSE, D., BARBOSA, A. A. L. *et al.* Implications of the Admixture Process in Skin Color Molecular Assessment. **PlosOne**, v. 9, n. 5, p. 1-7.2014.

CERQUEIRA, C. C. S., PAIXÃO-CÔRTEZ, V. R., ZAMBRA, F. M. B., SALZANO, F. M., HUNEMEIER, T., BORTOLINI, M. C. Predicting Homo Pigmentation Phenotype Through Genomic Data: From Neanderthal to James Watson. **American Journal of Human Biology**, v. 24, p. 705-709, 2012.

DUFFY, D. L., BOX, N. F., CHEN, W., PALMER, J. S., MONTGOMERY, G. W., JAMES, M.R. Interactive effects of *MC1R* and *OCA2* on melanoma risk phenotypes. **Human Molecular Genetics**, v.13, n.4, p. 447-461,2004.

EIBERG, H., TROELSEN, J., NIELSEN, M., MIKKELSEN, A., MENGEL-FROM, J., KJAER, K. W., HANSEN, L. Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the *HERC2* gene inhibiting *OCA2* expression. **Human Genetics**, v.123, n.2, p. 177-187, 2008.

FANG, W., RADOVICH, M., ZHENG, Y., FU, C-Y., ZHAO, P., MAO, C., ZHENG, S. 'Druggable' alterations detected by Ion Torrent in metastatic colorectal cancer patients. **OncologyLetters**, v. 7, p. 1761-66,2014.

FERNANDEZ, L. P., MILNE, R. L., PITA, G., AVILÉS, J. A., LÁZARO, P., BENÍTEZ, J., RIBAS, G. *SLC45A2*: A Novel Malignant Melanoma-Associated Gene. **Human Mutation**, v. 29, n.9, p. 1161-67, 2008.

FITZPATRICK, T. B. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Types I Through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, n.6, p. 869-871,1988.

FUKAMACHI, S., SHIMADA, A. & SHIMA, A. Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. **Nature Genetics**, v. 28, p. 381-385, 2001.

GRAF, J., HODGSON, R. & VAN DAAL, A. Single nucleotide polymorphisms in the *MATP* gene are associated with normal human pigmentation variation. **Human Mutation**, v. 25, p. 710-717, 2005.

GRAF, J., VOISEY, J., HUGHES, I. & VAN DAAL, A. Promoter Polymorphisms in the *MATP (SLC45A2)* Gene are Associated With Normal Human Skin Color Variation. **Human Mutation**, v. 28, n.7. p. 710-717, 2007.

GUEDJ, M., BOURILLON, A., COMBADIÈRES, C., RODERO, M., DIEUDÈ, P., DESCAMPS, V. et al. Variants of the *MATP/SLC45A2* Gene Are Protective for Melanoma in the French Population. **Human Mutations**, v. 29, n. 9, .p.1154-60, 2008.

HARADA, M., LI, Y. F., EL-GAMIL, M., ROSENBERG, S. A. & ROBBINS, P. F. Use of an in vitro Immunoselected Tumor Line to Identify Shared Melanoma Antigens Recognized by HLA-a*0201-restricted T Cells. **Cancer Research**, v. 61, p. 1089-94, 2001

HAN, J., KRAFT, P., NAN, H., GUO, Q., CHEN, C., QURESHI, A. et al. A Genome-Wide Association Study Identifies Novel Alleles Associated with Hair Color and Skin Pigmentation. **Plos Genetics**, v. 4, n.5, p. 1-11, 2008.

HOUGHTON, A. N. & VIOLA, M. V. (). Solar radiation and malignant melanoma of the skin. **Journal American Academy of Dermatology**, v.5, n.4, p. 477-483, 1981.

IBARROLA-VILLAVA, M., FERNANDEZ, L. P., PITA, G., BRAVO, J., FLORISTAN, U., SENDAGORTA, E. et al. Genetic analysis of three important genes in pigmentation and melanoma susceptibility: *CDKN2A*, *MC1R* and *HERC2/OCA2*. **Experimental Dermatology**, v.19, p. 836-844, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde. **Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil**, p. 52-53: Rio de Janeiro, 2014.

JABLONSKI, N. G. & CHAPLIN, G. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. **PNAS**, v. 107, n. 2, p. 8962-8968, 2010.

JI, Y., WALKOWICZ, M. J., BUITING, K., JOHNSON, D. K., TARVIN, R. E., RINCHIK, E. M. *et al.* The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. **Human Molecular Genetics**, v. 8, p. 533-542, 1999.

KAYSER, M., LIU, F., JANSSENS, C. J. W., RIVADENEIRA, F., LAO, O., DIUJN, K. *et al.* Three Genome-wide Association Studies and a Linkage Analysis Identify *HERC2* as a Human Iris Color Gene. **The American Journal of Human Genetics**, v. 82, p. 411-423, 2008.

LAMASON, R. L., MOHIDEEN, M. P. K., MEST, J. R., WONG, A. C., NORTON, H. L., AROS, M. C. *et al.* SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. **Science**, v. 310, p. 1782-86, 2005.

LANDI, M. T., KANETSKY, P. A., TSANG, S., GOLD, B., MUNROE, D., REBBECK, T. *et al.* MC1R, ASIP and DNA repair in sporadic and familial melanoma in a Mediterranean population. **Journal National Cancer Institute**, v. 97, n.13, p. 998-1007, 2005.

LEWONTIN, R. The Apportionment of Human Diversity. **Journal Evolutionary Biology**, v. 6, p. 381-398, 1972.

LIN, J. Y. & FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v.445, p. 843-850, 2007.

LIU, F., WEN, B. & KAYSER, M. Colorful DNA polymorphisms in humans. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 24, p. 562-575, 2013.

MACKIE, R. N. The pathogenesis of cutaneous malignant melanoma. **British Medical Journal**, v. 287, p. 1568-69, 1983.

.

MACKIE, R. M. **Skin Cancer**. 2nd ed., London: Martin Dunitz. 1996.

MCEVOY, B.; BELEZA, S. & SHRIVER, M. D. The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 2, p. 176-181, 2006.

MENG, S., SONG, F., CHEN, H., GAO, X., AMOS, C. I., LEE, J. E., WEI, Q., QURESHI, A. A., HAN, J. No Association between Parkinson Disease Alleles and the

Risk of Melanoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 21, p. 243-245, 2012.

MIHM, M. C. JR. & SOBER, A. J. Melanoma Before and After Thomas B. Fitzpatrick. **The Society for Investigate Dermatology**, v. 122, p. 32-33, 2004.

MILLER, A. J. & MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal Medicine**, v.355, p. 51-65, 2006.

MILLER, S. A., DYKES, D. D. & POLESKY, H. F. A simple salting out procedure DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MITRA, D., LUO, X., MORGAN, A., WANG, J., HOANG, M. P., LO, J., GUERRERO, C. R., LENNERZ, J. K. *et al.* An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. **Nature**, v.491, p. 415-454, 2012.

MOCELLIN S. & NITTI D. Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. **Cancer**, v. 113, p. 2398–2407, 2008.

MONDAL, M., SENGUPTA, M., SAMANTA, S., SIL, A. & RAY, K. Molecular basis of albinism in India: Evaluation of seven potential candidate genes and some new findings. **Gene**, v.511, p. 470-474, 2012.

MURRAY, F. G. Pigmentation, Sunlight and Nutritional Disease. **American Anthropologist**, v. 36, p. 438-444, 1934.

NAKAYAMA, K., FUKAMACHI, S., KIMURA, H., KODA, Y., SOEMANTRI, A., ISHIDA, T. Distinctive distribution of AIM1 polymorphism among major human populations with different skin color. **Journal Human Genetics**, v. 47, p. 92-94, 2002.

NAN, H., NIU, T., HUNTER, HAN, J. Missense Polymorphisms in Matrix Metalloproteinase Genes and Skin Cancer Risk. **Cancer Epidemiologic Biomarkers Prevention**, v. 17, n.12, p. 3551-57, 2008.

NASSER, N. Melanoma cutâneo – estudo epidemiológico de 30 anos em cidades do sul do Brasil, de 1980-2009. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.5, p. 932-941, 2011.

NEWTON, J. M., COHEN-BARAK, O., HAGIWARA, N., GARDNER, J. M., DAVISSON, M. T., KING, R. A., BRILLIANT, M. H. Mutations in the Human Orthologue of the Mouse *underwhite* Gene (*uw*) Underlie a New Form of Oculocutaneous Albinism, OCA4. **The American Journal of Human Genetics**, v.69, p. 981-988, 2001.

NORDLUND, J. J., BOISSY, R. E., HEARING, V. J., KING, R. A., OETTING, W. S., ORTONNE, JP. **The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology**. 2nd ed. USA: Blackwell Publishing. 2006.

NORTON, H. L., KITTLES, R. A., PARRA, E., MCKEIGUE, P., MAO, X., CHENG, K *et al*. Genetic Evidence for the Convergent Evolution of Light Skin in Europeans and East Asians. **Molecular Biology Evolution**, v. 24, p. 710-722, 2006.

OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine. Disponível em < <http://omim.org/>> acesso em 04 de novembro de 2014.

PAGANI, L., KIVISILD, T., TAREKEGN, A., EKONG, R., PLASTER, C., ROMERO, I. G. *et al*. Ethiopian Genetic Diversity Reveals Linguistic Stratification and Complex Influences on the Ethiopian Gene Pool. **The American Journal of Human Genetics**, v. 91. p.83-96, 2012.

PARRA, E. J. Human Pigmentation Variation: Evolution, Genetic Basis and Implications for Public Health. **Wiley InterScience**, v.50, p. 85-100, 2007.

QUILLEN, E. E., BAUCHET, M., BIGHAM, A. W., DELGADO-BURBANO, M. E., FAUST, F.X., KLIMENTIDIS, Y. C. *et al*. OPRM1 and EGFR contribute to skin pigmentation differences between Indigenous Americans and Europeans. **Human Genetics**, v. 131, p. 1073-1080, 2012.

RIJKEN, F., BRUIJNZEEL, P. L. B., VAN WEELDEN, H. & KIEKENS, R. C. M. Responses of Black and White Skin to Solar-simulating Radiation: Differences in DNA Photodamage, Infiltrating Neutrophils, Proteolytic Enzymes Induced, Keratinocyte Activation, and IL-10 Expression. **The Journal of Investigate Dermatology**, v. 122, n.6, p. 1448-55, 2004.

SALZANO, F. M. & BORTOLINI, M. C. The genetics and evolution of Latin American populations. 1st ed., UK: Cambridge University Press. 2002

SCHMERLING, R. A., LORIA, D., CINAT, G., RAMOS, W.E., CARDONA, A.F., SÁNCHEZ, J.L. *et al.* Cutaneous melanoma in Latin America: the need for more data. **Revista Panam Salud Publica**, v. 30, p. 431-438, 2011.

SCHNETKAMP, P. P. M. The SLC24 Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger family: vision and beyond. **PflugersArchives**, v.447, p. 683-688, 2004.

SNUSTAD, D. P. & SIMMONS M. J. Fundamentos de Genética. 6ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 324-325;415, 2013.

SOEJIMA, M., TACHIDA, H., ISHIDA, T., SANO, A., KODA, Y. Evidence for recent positive selection at the human *AIM1* locus in a European population. **Molecular Biology Evolution**, v. 23, n.1, p. 179-188, 2006.

STACEY, S. N., SULEM, P., MASSON, G., GUDJONSSON, S. A., THORLEIFSSON, G., JAKOBSDOTTIR, M. *et al.* New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma. **Nature Genetics**, v. 41, p. 909-914, 2009.

STOKOWSKI R. P., PANT, P. V., DADD T., FEREDAY, A., HINDS D.A., JARMAN C., *et al.* A genome wide association study of skin pigmentation in a South Asian population. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, p. 1119-32, 2007.

STURM, R. A. Molecular genetics of human pigmentation diversity. **Human Molecular Genetics**, v.18, p. R9-R17, 2009.

The International HapMap Consortium. Genome-wide detection and characterization of positive selection in human populations. **Nature**, v.449, p. 789-796, 2007.

Disponível em <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/downloads/nature02168.pdf>.

Acesso em 02 de Novembro de 2014.

VULTUR, A. & HERLYN, M. SnapShot: Melanoma. **Cancer Cell**, v. 23, p. 706-706.e1. Melanoma Research Center, TheWinstar Institute. USA. 2013

YAMAGUCHI, Y.; BRENNER, M & HEARING, V. J. The regulation of Skin Pigmentation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 38, p. 27557-61, 2007.

YUASA, I., UMETSU, K., HARIHARA, S., KIDO, A., MIYOSHI, A., SAITOU, N. *et al.* Distribution of the F347 Allele of the *SLC45A2* (*MATP*) Gene and Founder-Haplotype Analysis. **Annals of Human Genetics**, v.70, p.802-811, 2006.

WEI, A., ZANG, D., ZHANG, Z., LIU, X., HE, X., YANG, L. *et al.* Exome Sequencing Identifies SLC24A5 as a Candidate Gene for Nonsyndromic Oculocutaneous Albinism. **Journal of Investigate Dermatology**, v. 133, p. 1834-40, 2013.

WU, W., SATO, K., KOIKE, A., NISHIKAWA, H., KOIZUMI, H., VENKITARAMAN, A. R., OHTA, T. *HERC2* Is an E3 Ligase That Targets BRCA1 for Degradation. **Cancer Research**, v. 70, n. 15, p. 6384-92, 2010.

Anexos

Anexo A – Parecer Consubstanciado do CEP

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da presença do polimorfismo genético A148T no gene CDKN2A em casos de melanoma cutâneo

Pesquisador: PATRICIA ASHTON PROLLA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 38602314.4.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 903.365

Data da Relatoria: 02/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto anteriormente aprovado pelo CEP HCPA (07139).

O melanoma cutâneo é uma neoplasia potencialmente fatal e que apresenta um aumento sensível de sua incidência nas populações brancas de diversos países do mundo. Sua etiologia é heterogênea e complexa, porém experimentos realizados vêm tentando colaborar na compreensão dos principais mecanismos da patogênese desta neoplasia e, conseqüentemente, na composição daqueles indivíduos e situações ambientais que possam apresentar maior risco. Atualmente, a prevenção primária da doença baseia-se em reconhecer os pacientes mais susceptíveis a desenvolvê-la, tendo as características fenotípicas anteriormente comentadas, como os principais aspectos e, também, em realizar campanhas educacionais com o intuito de orientar a população quanto aos riscos associados com a fotoexposição exagerada, a uma necessidade de fotoproteção nestes momentos e ao diagnóstico precoce do melanoma, sendo este, até o momento, o principal fator prognóstico da doença.

O presente projeto visa comparar a presença do polimorfismo genético A148T do gene CDKN2A em pacientes com melanoma cutâneo e controles.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-003
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7840 Fax: (51)359-7840 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 903.305

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Principal:

Comparar a presença do polimorfismo genético A148T do gene CDKN2A em pacientes com melanoma cutâneo e controles.

Objetivo Secundário:

- Verificar a presença do polimorfismo constitucional A148T do gene CDKN2A em DNA extraído de leucócitos dos casos e controles.
- Verificar a presença do polimorfismo A148T do gene CDKN2A em DNA extraído nas células neoplásicas dos casos de melanoma.
- Analisar as frequências gênicas e genotípicas do polimorfismo A148T do gene CDKN2A em indivíduos com melanoma e nos controles.
- Analisar polimorfismos (SNPs) associados à fototipo (pigmentação da pele): SLC24A5 rs1426654, SLC45A2 rs16891982, HERC2 rs1129038 e TYR rs1126809 e verificar se estes se correlacionam com o fototipo previamente descrito em casos e controles, bem como com risco para melanoma.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Incluem os riscos da punção venosa (já realizada). Todas análises genéticas serão realizadas conforme os objetivos previstos e aprovados neste projeto. Em relação a emenda 3 proposta juntamente com esse cadastro na PB, os resultados de avaliação de polimorfismos provavelmente não trarão benefícios individuais para cada paciente, sendo apenas a uma complementação a caracterização da amostra quanto ao efeito de polimorfismos no fototipo e possivelmente, risco de melanoma. Não estão sendo estudadas mutações altamente penetrantes e germinativas, portanto não se prevê risco substancial da informação a ser obtida com as atividades da emenda 3, que tem potencialmente uma importância mais coletiva do que individual.

Benefícios:

Os resultados obtidos poderão contribuir para o entendimento dos diferentes fatores de risco para melanoma.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo caso-controle.

Serão incluídos pacientes de ambos os sexos, portadores de melanoma cutâneo que serão

Endereço: Rua Remígio Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-003
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7840 Fax: (51)3359-7840 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 903.385

atendidos ou que se encontram em acompanhamento no Ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e controles sem história pregressa ou familiar de melanoma, controlados por fototipo, sexo e idade, provenientes do mesmo local.

O cálculo da amostra apontou 134 casos e 134 controles necessários para avaliar o efeito da presença do polimorfismo em casos de melanoma em relação a controles; tendo, o estudo, um poder estatístico de 80%. As variáveis em estudo são: Presença do polimorfismo A148T no gene CDKN2A em PCR de DNA de células germinativas (neutrófilos); Presença do polimorfismo A148T no gene CDKN2A em PCR de DNA de células neoplásicas; Idade; Sexo; História de exposição solar; Presença de nevos atípicos; Ancestralidade; Fototipo.

Os pacientes serão selecionados a partir de uma revisão dos laudos anátomo-patológicos, identificando os casos de melanomas cutâneos primários e dos casos novos que serão atendidos ou encaminhados ao Serviço de Dermatologia do HCPA. Os controles serão selecionados a partir de pacientes atendidos na rotina de atendimento do Serviço de Dermatologia do HCPA.

Os procedimentos detalhados encontram-se devidamente descritos no projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados documentos relativos à versão original do projeto aprovado.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1) Foi apresentada uma única versão de projeto, a original, onde consta o pesquisador responsável anterior e os objetivos anteriormente aprovados para o projeto. Uma vez que este projeto teve seu pesquisador responsável alterado, uma nova versão de projeto, incluindo as alterações geradas a partir da nova pesquisadora responsável (Incluindo Emenda 3), deverá ser adicionada à Plataforma. Da mesma forma, as informações incluídas no registro do projeto na Plataforma deverão estar em consonância com a nova versão de projeto que será apresentada (número de pacientes, objetivos, entre outros).

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: Agradecemos esta recomendação e informamos que uma versão atualizada do projeto, incluindo as modificações apresentadas nas emendas já aprovadas e na emenda atual, foi incluída na Plataforma Brasil.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7840 Fax: (51)359-7840 E-mail: cepcpa@hcpa.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 903.305

PENDÊNCIA ESCLARECIDA.

2)A Folha de Rosto não está assinada pela pesquisadora responsável atual do projeto.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: A folha de rosto devidamente assinada foi adicionada a PB.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

3)Deverá ser adicionado um Formulário de Delegação de Funções, devidamente preenchido e assinado pelos pesquisadores.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: O formulário de delegação de funções foi acrescentado à PB.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

4) Não está claro se serão incluídos novos pacientes no estudo. Caso ainda sejam incluídos, sugerimos atualização dos TCLEs de acordo com as normativas vigentes. No caso de não haver previsão de novas inclusões, desconsiderar esta pendência.

RESPOSTA DOS PESQUISADORES: não serão incluídos novos casos no estudo.

PENDÊNCIA ESCLARECIDA.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovada nova versão de projeto: 20/11/2014.

PORTO ALEGRE, 09 de Dezembro de 2014

Assinado por:
José Roberto Goldim
(Coordenador)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-003
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)359-7840 Fax: (51)359-7840 E-mail: cephcpa@hcpa.ufrgs.br

Anexo B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS CASOS

Projeto de pesquisa: Avaliação da presença do polimorfismo A148T no gene CDKN2A em casos de melanoma

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Casos

Justificativa: O melanoma cutâneo é o tipo de câncer da pele que se caracteriza por manchas escuras e irregulares. Diversos fatores colaboram para seu surgimento. O melanoma pode surgir ao acaso ou relacionado a um histórico na família de casos semelhantes. A maioria dos casos é relacionada a exposições solares exageradas que acabam degenerando os melanócitos (células da pele que produzem melanina) em células malignas. A presença de muitos sinais benignos, pele clara, cabelos e olhos claros e história na família de melanoma são alguns dos fatores que sugerem um maior risco de ter câncer de pele. Entretanto, numa parcela destes casos, costuma se encontrar também uma predisposição genética para o desenvolvimento da doença, ou seja, os pacientes apresentam algum tipo de alteração de seus genes que o deixam em maior risco de ter um melanoma. O gene chamado CDKN2A é um destes. É comprovado em diversos estudos em distintas populações que alterações do CDKN2A podem implicar na formação de um melanoma no futuro. Mais de 77 tipos de alteração deste gene já foram descritas. Na nossa população, foi estudada a existência de uma destas alterações (A148T) numa quantidade pequena de pacientes e se viu que ela existia em 13% deles. Enfim, torna-se extremamente importante estudar a existência de alterações de genes na nossa população para poder entender um pouco mais sobre os fatores de risco desta doença no nosso meio e, conseqüentemente, poder oferecer uma prevenção mais efetiva.

Procedimentos: Se você concordar em participar do estudo, após ler cuidadosamente e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será encaminhado ao Serviço de Dermatologia para realização de exame dermatológico pelo pesquisador principal. Responderá um questionário que conterá perguntas sobre seus hábitos de exposição ao sol, cor da pele, ancestralidade e serão registrados dados sobre seu exame dermatológico e as características da lesão de melanoma. Você será encaminhado ao ambulatório de pesquisa do HCPA para coleta de sangue. Sua amostra de sangue e o bloco de parafina da lesão de pele serão analisados no Centro de Terapia Gênica do HCPA (extração do DNA) e no laboratório de pesquisa do Departamento de Dermatologia da Universidade Ludwig-Maximilians de Munique na Alemanha pelo pesquisador Renato MarchioriBakos (análise do polimorfismo). Esta avaliação é feita através de um método chamado PCR-RFLP. Nós ainda não sabemos se estes “polimorfismos genéticos” realmente têm alguma importância sobre o risco de melanoma no Rio Grande do Sul, e este estudo está sendo feito justamente para tentar verificar isso. Caso alguma informação derivada deste estudo for importante para você e sua família todo esforço será realizado para informá-los, caso assim o queira. Como ainda não sabemos exatamente o que significa ter cada um destes polimorfismos em termos de risco para melanoma, é importante que você continue realizando todos os seus exames e recomendações de rotina, como evitar queimaduras solares, proteger-se do sol e realizar avaliações médicas e laboratoriais regulares.

Informações adicionais:

- A coleta de sangue do estudo é feita como uma coleta usual. Entretanto, algumas pessoas podem apresentar tonturas e pequeno desconforto no momento da picada da agulha e podem desenvolver pequenos hematomas (manchas roxas na pele) no local da punção.
- Em qualquer das etapas, os pacientes poderão desistir de participar do estudo, sem prejuízo para seu acompanhamento dentro do Serviço de Dermatologia ou outro setor do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- As informações obtidas são de uso exclusivo deste projeto e os resultados serão divulgados em conjunto, sendo preservado o nome dos participantes. Se você autorizar, o seu material genético será armazenado. E, no caso de utilização deste material em estudos futuros, você será contatado para autorizar o seu uso.
- A sua participação não envolve custos para você e também nenhum tipo de remuneração por participar do estudo.

Você está sendo convidado, pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a participar deste estudo. Instruído de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

1. Você tem garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e de que será informado quanto a possibilidade de realização de novos exames relacionados ao estudo caso necessários

2. A sua participação no estudo não implicará em nenhum tipo de remuneração financeira.

3. Sua identidade será preservada e todas as informações serão utilizadas somente para fins de pesquisa.

4. Este projeto não prevê prazo exato ou estipulado para fornecer os resultados desta pesquisa, porém serão fornecidos assim que disponível.

5. Você poderá optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.

6. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo.

7. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA no Serviço de Genética Médica do HCPA, obtido nesse projeto de pesquisa, para estudos futuros, ciente de que serei contatado para nova autorização deste uso, conforme resolução 347/05.

Eu, _____, li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Assinatura do paciente: _____

Data: __/__/__

Autorização de responsável (caso paciente tenha idade inferior a 18 anos):

Eu, _____, responsável pelo menor _____ (grau de parentesco : _____), li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento, concordo com o teor do documento e autorizo participação de meu (minha) _____ na pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

A ser preenchido pelos pesquisadores:

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: __/__/__

Pesquisadores responsáveis: Renato M. Bakos, Patrícia Prolla, Roberto Giugliani

Contatos: Rua Ramiro Barcellos, 2350 Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Fone/ fax: 21018571

Anexo C: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS CONTROLES.

Projeto de pesquisa: Avaliação da presença do polimorfismo A148T no gene CDKN2A em casos de melanoma

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Controles

Justificativa: O melanoma cutâneo é o tipo de câncer da pele que se caracteriza por manchas escuras e irregulares. Diversos fatores colaboram para seu surgimento. O melanoma pode surgir ao acaso ou relacionado a um histórico na família de casos semelhantes. A maioria dos casos é relacionada a exposições solares exageradas que acabam degenerando os melanócitos (células da pele que produzem melanina) em células malignas. A presença de muitos sinais benignos, pele clara, cabelos e olhos claros e história na família de melanoma são alguns dos fatores que sugerem um maior risco de ter câncer de pele. Entretanto, numa parcela destes casos, costuma se encontrar também uma predisposição genética para o desenvolvimento da doença, ou seja, os pacientes apresentam algum tipo de alteração de seus genes que o deixam em maior risco de ter um melanoma. Enfim, torna-se extremamente importante estudar a existência de alterações de genes na nossa população para poder entender um pouco mais sobre os fatores de risco desta doença no nosso meio e, conseqüentemente, poder oferecer uma prevenção mais efetiva. ***Para melhor avaliar este risco, avalia-se a presença desta alteração em pacientes com melanoma e se compara os achados com um grupo de pacientes sem melanoma. Você está sendo convidado a participar do estudo no grupo controle, ou seja, que NÃO tem melanoma.***

Procedimentos: Se você concordar em participar do estudo, após ler cuidadosamente e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será encaminhado ao Serviço de Dermatologia para realização de exame dermatológico pelo pesquisador principal. Responderá um questionário que conterá perguntas sobre seus hábitos de exposição ao sol, cor da pele, ancestralidade e serão registrados dados sobre seu exame dermatológico. Você será encaminhado ao ambulatório de pesquisa do HCPA para coleta de sangue. Sua amostra de sangue será analisada no Centro de Terapia Gênica do HCPA (extração do DNA) e no laboratório de pesquisa do Departamento de Dermatologia da Universidade Ludwig-Maximilians de Munique na Alemanha pelo pesquisador Renato MarchioriBakos (análise do polimorfismo). ***Esta avaliação é feita através de um método chamado PCR-RFLP.*** Você poderá ser informado dos resultados da análise caso assim o queira. Como ainda não sabemos exatamente o que significa ter cada um destes polimorfismos em termos de risco para melanoma, é importante que você continue realizando todas as recomendações de rotina, como evitar queimaduras solares, proteger-se do sol e realizar avaliações médicas regulares.

Informações adicionais:

- A coleta de sangue do estudo é feita como uma coleta usual. Entretanto, algumas pessoas podem apresentar tonturas e pequeno desconforto no momento da picada da agulha e podem desenvolver pequenos hematomas (manchas roxas na pele) no local da punção.
- Em qualquer das etapas, os pacientes poderão desistir de participar do estudo, sem prejuízo para seu acompanhamento dentro do Serviço de Dermatologia ou outro setor do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- As informações obtidas são de uso exclusivo deste projeto e os resultados serão divulgados em conjunto, sendo preservado o nome dos participantes. Se você autorizar, o seu material genético será armazenado. E, no caso de utilização deste material em estudos futuros, você será contatado para autorizar o seu uso.
- A sua participação não envolve custos para você e também nenhum tipo de remuneração por participar do estudo.

Você está sendo convidado, pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a participar deste estudo. Instruído de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa,

assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

1. *Você tem garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e de que será informado quanto a possibilidade de realização de novos exames relacionados ao estudo caso necessários*
2. *A sua participação no estudo não implicará em nenhum tipo de remuneração financeira.*
3. *Sua identidade será preservada e todas as informações serão utilizadas somente para fins de pesquisa.*
4. *Este projeto não prevê prazo exato ou estipulado para fornecer os resultados desta pesquisa, porém serão fornecidos assim que disponível.*
5. *Você poderá optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.*
6. *Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo.*
7. *Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA no Serviço de Genética Médica do HCPA, obtido nesse projeto de pesquisa, para estudos futuros, ciente de que serei contatado para nova autorização deste uso, conforme resolução 347/05.*

Eu, _____, li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Assinatura do paciente: _____

Data: __/__/__

Autorização de responsável (caso paciente tenha idade inferior a 18 anos):

Eu, _____, responsável pelo menor _____ (grau de parentesco : _____), li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento, concordo com o teor do documento e autorizo participação de meu (minha) _____ na pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

A ser preenchido pelos pesquisadores:

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: __/__/__

Pesquisadores responsáveis: Renato M. Bakos, Patrícia Prolla, Roberto Giugliani
Contatos: Rua Ramiro Barcellos, 2350 Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Fone/ fax: 21018571