

**ENVOLVIMENTO DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DE
GENES DE REPARO DA VIA DE EXCISÃO DE
NUCLEOTÍDEOS NO DESENVOLVIMENTO DE
MELANOMA CUTÂNEO**

GUILHERME FRANCISCO

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Fundação Antônio Prudente para a obtenção
do Grau de Mestre em Ciências**

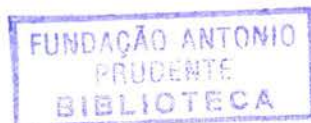
Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo

2007

Fundação Antonio Prudente
Juliana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Francisco, Guilherme

Envolvimento de variantes polimórficas de genes de reparo da via de excisão de nucleotídeos no desenvolvimento de melanoma cutâneo / Guilherme Francisco -- São Paulo, 2007.

145p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

Descritores: 1. MELANOMA MALIGNO. 2. REPARO DE DNA. 3. REPARO POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEO. 4. POLIMORFISMO GENÉTICO. 5. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.

"Nothing in Biology Makes Sense, except in the light of Evolution"

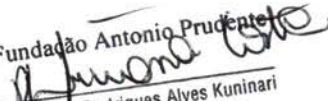
Theodosius Dobzhansky – 1973

*"Não procure compreender as respostas,
mas procure compreender as perguntas"*

Confúcio

"Lay Down Your Soul To The God's Rock n' Roll"

VENOM – 1982

Fundação Antonio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

A todos os alunos da 6ª séries A e B e 7ª séries do ano de 2005 do Colégio Nossa Senhora dos Remédios – Osasco, por me ensinarem, mesmo sem intenção, o verdadeiro valor da amizade, carinho, respeito e manter acesa em mim a crença de que a Educação vale qualquer esforço.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar ao Dr. Roger Chammas, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, por ter confiado na minha força trabalho e na minha vontade em fazer biologia. Pela orientação, pela empolgação contagiante em pesquisa, por todas as discussões enriquecedoras, sugestões, pela paciência, por ouvir minhas idéias, críticas, e acreditar nelas. Por todas as qualidades que me fazem tê-lo como um exemplo, não apenas de um bom pesquisador, mas de um cientista. Ao Roger, pela amizade, pelos conselhos e exemplo de ser humano.

A Marlene Lipari Grimaldi, pela qual todas as palavras não seriam o bastante para expressar meu carinho, admiração e respeito. Pela grandiosa amizade, por todo apoio e carinho, pelos inúmeros ensinamentos e pelo maior deles, me ensinar a admirar a ciência da vida. Ao Luiz Grimaldi, pela importante amizade.

A Dra Itamar Romano Garcia Ruiz, pela oportunidade e orientação no início da carreira científica. Minha eterna gratidão.

A todos os professores da UNESP campus de Rio Claro, pela sólida formação que me proporcionaram, pela amizade, dedicação e orientação, em especial ao Dr. Mario Palma, pelo exemplo de pesquisador, a Dra. Doralice Cella, pela amizade e orientação, ao Dr. Ariovaldo Neto e Dr. Fernando Zara, por acreditar no trabalho de fisiologia. Aos professores Dr. Luis Marcelo de Carvalho e Dra. Dalva Bonotto, por todas as orientações, sugestões e discussões que com certeza me levaram a ver na educação e no ensino algo extraordinário.

A todas as incríveis pessoas que fazem ou que fizeram parte do Grupo de Adesão Celular, pela amizade, pelo ambiente amistoso e enriquecedor: Andréia Otake, Fabiana Melo, Gabriela Malheiros, Lara Zimmermann (pela grande amizade), Luciana Andrade (muito obrigado por ter sido me recebido tão bem), Mara Junqueira (por todos os ensinamentos),

Natália Scharwz, Patrícia Costa (palavras não são o bastante para expressar o carinho, admiração e respeito por você), Raphael Salles, Renata Saito, Tharcísio Tortelli, Verônica Teixeira.

A todos os demais integrantes do Laboratório de Oncologia Experimental, em especial a Flávia Mongone e Simone Maistro. A Maria José e Ivanete pela amizade e dedicação, ao Jair e Willame. A Dra Maria Mitzi Brentani, pelas discussões sobre biologia celular.

A todos os participantes do curso de difusão "o que aprendemos com o câncer" por manter vivo o ideal da educação.

Ao Prof Dr. José Eluf Neto pela colaboração, atenção e pelas discussões epidemiológicas que muito me ensinaram. A Dra Sônia Pereira pela condução deste estudo. A Fernanda Toledo, pela pronta colaboração. Especial agradecimento a todos as pessoas que concordaram em participar do estudo. Ao Dr. Vítor Wünsch Filho pela conversas epidemiológicas.

A todos os amigos e prezados colaboradores do Hospital AC Camargo e Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer: Alexandre Leon, Dr. Rogério Izar, Waleska Martins, Dra. Dirce Carraro, Nair Hideko, Patrícia Possik, João e Zé (Virologia), Dr. André Vettore, Dr. Luis Fernando Reis. A Dra Anamaria Camargo, pelas importantes discussões, e seu grupo, pela hospitalidade e prontidão em ajudar, em especial a Ana Paula Medeiros, Ricardo Moura e Valéria Paixão.

Ao pessoal da Pós-Graduação, Ana Kurinari e Luciana Pitombeira, pela amizade e pelo constante apoio.

A Jéssica Ágata Bueno, por ser sempre essa pessoa incrível e admirável e que sempre estará em meus pensamentos.

Um agradecimento especial a todos os amigos do Colégio Nossa Senhora dos Remédios, desde o convívio dos tempos de aluno e pela incrível hospitalidade nos tempos de professor. A todos os professores pela amizade, dedicação e exemplo de profissionalismo. A Prof Márcia Rozani pela sincera amizade e carinho, a Alice Luz pela amizade, conselhos e valiosos ensinamentos, ao Prof e coordenador Carlos pela oportunidade,

pela confiança em mim depositada e pelos conselhos. Muito obrigado de coração.

A todos os diversos amigos e verdadeiros irmãos: Renato Pereira, Rodrigo Bastos, Giam Marcel, Fabio de Souza, Leonardo Acosta, Mauricio Silva, Flávio Araújo, Sandro Colombo, Daniel Borges, Welton Marques, José Adriano, Anderson Martins, Eduardo Robson, Bruno Giglio, Marcelo Tavares, Frederico Arnoldi, Rodrigo Putsvinski e Reinaldo Putsvinski Jr. As amigas Michele Pereira, Kátia Benedito, Érica Cristina e Cristina Soares.

A minhas queridas amiguinhas Amanda Matos e Natália Roque, pela mais sincera amizade, e por todos os inesquecíveis momentos juntos.

Aos diversos amigos dos tempos de Rio Claro pelos inúmeros momentos de diversão, aprendizado e companheirismo. Ao Ale, André, Aldo, Val, PC, Danilo, Aladin, Catarina.

A toda minha família, pelo constante apoio. A minha irmã Luciana Francisco, ao Vinicius Urban, e é claro, minha mãe Fátima Francisco.

Ao CNPq e Fapesp, pelo apoio financeiro.

E por fim, um agradecimento especial a Dave Mustaine, pelo exemplo de dedicação, superação, criatividade e pelo conjunto da obra. Obrigado por tornar o mundo um lugar melhor de se ouvir uma boa música.

RESUMO

Francisco G. **Envolvimento de variantes polimórficas de genes de reparo da via de excisão de nucleotídeos no desenvolvimento de melanoma cutâneo.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O melanoma cutâneo é a principal causa de morte por câncer de pele no mundo, sendo que sua incidência tem crescido nos últimos anos, tomando assim proporções epidêmicas. O desenvolvimento desta neoplasia parece estar relacionado a um padrão de exposição intermitente e intensa à radiação ultravioleta (UV), presente na luz solar, a qual é capaz de induzir lesões potencialmente carcinogênicas no DNA das células da pele, como os melanócitos. Porém, não só fatores ambientais de risco estão envolvidos, fatores genéticos também podem ter contribuição para a gênese do melanoma. Dentre os fatores genéticos possivelmente envolvidos, considera-se que variações genéticas (polimorfismos) existentes na população possam contribuir para o desenvolvimento de neoplasias em certas pessoas em comparação às demais. Com o intuito de avaliar a hipótese de que a presença destas variações estivesse relacionada ao desenvolvimento de melanoma, verificou-se, através de um estudo caso-controle, a frequência de polimorfismos em genes de reparo de DNA em indivíduos com melanoma e indivíduos saudáveis. Uma vez que genes envolvidos nos sistemas de reparo exercem função vital na correção de danos causados por UV, polimorfismos que de alguma maneira modifiquem o funcionamento da atividade de reparo, poderiam então conferir maior ou menor susceptibilidade a melanoma. Foram então analisados polimorfismos em genes do sistema de reparo por nucleotídeos (NER)(XPA, XPC, XPG e ERCC1), do sistema de reparo por excisão de bases (OGG1), bem como um gene envolvido na conversão de espécies reativas de oxigênio (SOD2). Os

riscos relativos atribuídos a cada genótipo foram calculados através dos valores de odds ratio (OR) e pelo intervalo de 95% de confiança (95% CI). Os resultados demonstraram risco elevado de desenvolvimento de melanoma para indivíduos homozigotos para polimorfismos de XPC PAT+ (OR 2,88; 1,56 - 5,32 95% CI; $p=0,0006$), IV11-5 C/A (OR 2,77; 1,49 - 5,17 95% CI; $p=0,0011$) , e K939Q (OR 2,61; 1,39 – 4,93 95% CI; $p=0,0025$), enquanto para o polimorfismo D1104H de XPG demonstrou exercer um efeito protetor (OR 0,43; 0,19 - 0,96 95% CI; $p=0,037$). Para os demais genes analisados (XPA, ERCC1, OGG1 e SOD2) não houve correlação entre os genótipos e o risco de melanoma. Quando os genótipos foram ajustados para fatores como sexo e idade, as variações genéticas de XPA, ERCC1, XPC e XPG demonstraram modificar a susceptibilidade a este tipo de câncer, conferindo diferentes aspectos conforme o tipo de fator. Análise através de ferramentas de bioinformática sugere diferentes impactos da substituição de aminoácidos destas variações, reforçando os achados epidemiológicos, e também identificaram uma possível perda de um elemento regulatório de splicing no intron que contém o polimorfismo PAT de XPC. Por fim, através de meta-análise foi possível verificar o papel dos polimorfismos de XPC e XPG em relação a melanoma, sugerindo um importante papel dos fatores ambientais junto a estas variações alélicas quanto a susceptibilidade a melanoma na população estudada. O estudo permite a conclusão de que variações polimórficas em genes de reparo de DNA modificam o risco de desenvolvimento de melanoma cutâneo.

SUMMARY

Francisco G. **[Involvement of polymorphic variants in nucleotide excision repair pathway genes on cutaneous melanoma development]**. São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Cutaneous melanoma is the more lethal form of skin cancer. Its incidence is increasing worldwide in the last years, assuming epidemic proportions. The development of this neoplasia seems to be related to an intense and intermittent UV exposure pattern, which is thought to induce potentially carcinogenic DNA lesions in epidermic cells, as melanocytes. However, not only environmental factors are risk factors, genetic factors may also contribute to melanomagenesis. Among genetic factors possibly related, genetic variations (polymorphisms) are considered to contribute to neoplasia development. Aiming to validate the hypothesis that genetic variations could be responsible for melanoma development, a case-control study was designed to determine the frequency of polymorphism in DNA repair genes in melanoma patients and in control individuals. As DNA repair genes are responsible for repairing of UV-induced DNA lesions, polymorphisms that modify the repair capacity could influence the risk for melanoma. Polymorphisms in genes of nucleotide excision repair (NER)(XPA, XPC, XPG e ERCC1), base excision repair (BER)(OGG1) and a gene related in scavenging reactive oxygen species (SOD2) were evaluated and the relative risk attributed was estimated by calculation of odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) values. The results showed melanoma risk to homozygous individuals for XPC polymorphisms PAT+ (OR 2,88; 1,56 - 5,32 95% CI; $p=0,0006$), IV11-5 C/A (OR 2,77; 1,49 - 5,17 95% CI; $p=0,0011$) and K939Q (OR 2,61; 1,39 - 4,93 95% CI; $p=0,0025$), whereas to XPG polymorphism D1104H, a protective effect was observed (OR 0,43; 0,19 - 0,96 95% CI; $p=0,037$). For the other genes (XPA, ERCC1, OGG1 e

SOD2) there were no risks for melanoma. Adjusting the genotypes to age and gender, polymorphisms in XPA, ERCC1, XPC and XPG modified the risk for melanoma, conferring different aspects for each factor adjusted. *In silico* analysis suggest different impacts of amino acid substitution of the polymorphisms, strengthening the epidemiologic results and identifying also a possible loss of a regulatory splicing element in PAT+ allele of XPC intron. Meta-analysis results demonstrated the involvement of XPC and XPG polymorphisms as melanoma risk factors, suggesting a key role of environmental factors in association with genetic variations on melanoma susceptibility in the population studied. Thus, polymorphisms in DNA repair genes modify the risk for developing cutaneous melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formação de dímeros de ciclobutano (CPD) e fotoprodutos 6-4 entre bases adjacentes no DNA após radiação UVB	3
Figura 2	<i>Locus</i> CDKN2A (INK4a/ARF) e vias de atuação de p16 ^{ink4A} e p14 ^{ARF}	10
Figura 3	Mecanismos de reparo do BER	18
Figura 4	Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)	23
Figura 5	Sub-vias de reparo de lesões de duplas quebras no DNA (DSB)	26
Figura 6	Gráfico logarítmico representando o tamanho populacional necessário para um determinado <i>odds ratio</i> com 95% de intervalo de confiança (isolinhas) em função da frequência alélica de polimorfismos	37
Figura 7	Visualização dos padrões de bandas para os genótipos de XPC PAT indicando a banda do alelo (-)(266 bp) e do alelo polimórfico (+ 83 AT) (349 bp)	51
Figura 8	Padrão de bandas dos genótipos de XPC IV11 -5 C/A	52
Figura 9	Padrão de bandas dos genótipos de XPC K939Q	53
Figura 10	Padrão de restrição dos genótipos dos alelos D e H de XPG	54
Figura 11	Padrão de bandas dos genótipos para o códon 326 de OGG1	55
Figura 12	Padrão de restrição dos genótipos do polimorfismo G/A no gene XPA	56
Figura 13	Padrão de restrição de ERCC1 N118N, transição C para T	57
Figura 14	Padrão dos três genótipos de SOD2 V16A	58
Figura 15	Alinhamento das sequências dos introns 9 dos alelos PAT – e PAT + de XPC	69
Figura 16	Forest Plot para os resultados da meta-análise para XPG D1104H	72
Figura 17	Forest Plot para os resultados da meta-análise para XPC K939Q	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação dos genes e dos respectivos SNPs (<i>single nucleotide polymorphisms</i>)	43
Tabela 2	Características da casuística segundo faixa etária e sexo	49
Tabela 3	Frequência dos genótipos para cada um dos polimorfismos estudados e OR (95% CI)	50
Tabela 4a	Distribuição dos genótipos de XPC dentre a casuística	60
Tabela 4b	Distribuição dos genótipos de XPC dentre os controles	61
Tabela 5	Modelos genéticos e risco de desenvolvimento de melanoma	63
Tabela 6	Combinação de polimorfismos e o risco de melanoma	64
Tabela 7	Análise do impacto dos polimorfismos nos genes de reparo quando categorizados por sexo, faixa etária e sexo/faixa etária	66

LISTA DE ABREVIATURAS

8-oxoG	8-oxo-guanina
λ	lambda
A	adenina
A	aminoácido alanina
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
Ala	aminoácido alanina
APE-1	apurinic/apyrimidinic (abasic) endonuclease
Arg	aminoácido arginina
Asn	aminoácido asparagina
Asp	aminoácido aspartato
B-RAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BER	Base Excision Repair
BRCA 1	breast cancer 1
BRCA 2	breast cancer 2
C	aminoácido cisteína
C	citosina
CDK	quinase dependente de ciclina
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
CSA	Cockayne Syndrome A
CSB	Cockayne Syndrome B
Cys	aminoácido cisteína
D	aminoácido aspartato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
dNTPs	deoxy-nucleotídeos (ATP, CTP, GTP, TTP)

EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERCC1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
ESR	element splicing regulator
G	guanina
Gln	aminoácido glutamina
H	aminoácido histidina
H	hora
hHR23B	human RAD23 homolog B
His	aminoácido histidina
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium
K	aminoácido lisina
Kb	quilobase
Lys	aminoácido lisina
MC1R	melanocortin 1 receptor
MDB4	methylation binding protein 4
Mdm2	mouse double minute 2
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mM	milimolar
N	aminoácido asparagina
NaCl	Cloreto de Sódio
NBS1	nijmegen breakage syndrome 1
NCX1	sodium-calcium exchanger isoform 1
NER	Nucleotide Excision Repair
NFκB	nuclear factor kappa-B
Ng	nanograma
NH₄Cl	cloreto de amônio
NH₄HCO₃	Bicarbonato de Amônio
N-RAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
PISC	polymorphism information score
Pol β	DNA polimerase beta
Pol δ/ε	DNA polimerase delta/épsilon

Polyphen	Polymorphism Phenotyping
Q	aminoácido glutamina
q.s.p.	quantidade suficiente para
Rb	retinoblastoma
RegRNA	recognition RNA
RPA	replication protein A
Rpm	rotações por minuto
S	aminoácido serina
SC35	splicing component 35
Ser	aminoácido serina
SF2/ASF	splicing factor 2/alternative splicing factor
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SR	splicing regulator
SS	splicing site
T	timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TFIIH	general transcription factor II H
Thr	aminoácido treonina
U	unidade
μl	microlitro
UTR	untranslated region
UV	ultravioleta
UVA	ultravioleta tipo A
UVB	ultravioleta tipo B
UVC	ultravioleta tipo C
UV-DDB	UV-damaged DNA-binding protein
V	aminoácido valina
V	volts
Val	aminoácido valina
XP A-G	Xeroderma pigmentosum group A-G protein
XPV	Xeroderma pigmentosum variant – DNA polimerase eta

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Radiação Ultravioleta (UV)	1
1.2	Melanoma	4
1.3	Vias de Reparo do DNA	14
1.3.1	Reparo por excisão de bases (BER)	15
1.3.2	Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)	19
1.3.3	Recombinação Homóloga (HR)	24
1.3.4	Reparo por junção dos terminais não-homólogos	25
1.4	Epidemiologia Molecular do Câncer	27
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivos gerais	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
3.1	Desenho do estudo	35
3.2	Extração de DNA	38
3.3	Genotipagem dos polimorfismos	39
3.4	Análise <i>in silico</i> das substituições de aminoácidos nos polimorfismos gênicos	43
3.5	Análise <i>in silico</i> de possíveis alterações em elementos regulatórios de splicing nos íntrons polimórficos de XPC	45
3.6	Meta-Análise	46
3.7	Análise estatística	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Características populacionais da casuística	48
4.2	Polimorfismos em genes de reparo e risco de melanoma	49
4.2.1	XPC poli AT (PAT)	51

4.2.2	XPC IV11 -5A/C	52
4.2.3	XPC K939Q	52
4.2.4	XPG D1104H	53
4.2.5	OGG1 S326C	54
4.2.6	XPA -4 G/A	55
4.2.7	ERCC1 N118N	56
4.2.8	SOD2 V16A	57
4.3	Combinação dos polimorfismos de XPC e o risco de melanoma	58
4.4	Adoção de modelos genéticos e risco de melanoma	61
4.5	Combinação das variantes genéticas e risco de melanoma	63
4.6	Correlação entre fatores genéticos, sexo e idade no risco de melanoma	64
4.7	Análise <i>in silico</i> da predição de impacto de polimorfismos com troca de aminoácidos	67
4.8	Análise <i>in silico</i> do impacto dos polimorfismos nas regiões intrônicas de XPC	68
4.9	Meta-análise	70
5	DISCUSSÃO	74
5.1	Papel dos polimorfismos de OGG1 e SOD2 na carcinogênese de melanoma	76
5.2	XPA -4 G/A e ERCC1 N118N em melanoma	83
5.3	Papel protetor de XPG D1104H em melanoma	88
5.4	Polimorfismos em XPC como genes de baixa penetrância para o desenvolvimento de melanoma	97
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	119
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

ANEXO

- Anexo 1** Estrutura dos genes estudados e a localização gênica de cada polimorfismo analisado
- Anexo 2** Diferentes índices de UV anual (*UV index*) nas cidades que realizaram estudos epidemiológicos sobre melanoma.
- Anexo 3** Formação de RNA duplex (*hairpin*) do polimorfismo PAT + no intron 9 do gene *XPC*.
- Anexo 4** Artigo submetido à Revista European Journal of Human Genetics

1 INTRODUÇÃO

1.1 RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UV)

A pele, considerada o maior órgão do corpo, tem a importante função de constituir a primeira barreira de defesa na proteção do meio interno e está propensa a diversas agressões como por microorganismos patogênicos ou por agentes lesivos, sejam químicos ou físicos. Dentre estes diversos agentes, as radiações ultravioletas, presentes na luz solar, são consideradas como o maior agente etiológico no desenvolvimento de câncer de pele, no entanto, a relação entre dose, tempo e natureza da exposição para o desenvolvimento do tumor continua não estabelecida (IVRY et al. 2006).

A radiação ultravioleta (UV) pode ser dividida de acordo com o comprimento de onda, sendo UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm). Enquanto UVC é absorvido pela camada de ozônio, UVA e UVB chegam à superfície da Terra numa proporção de 90 e 10%, respectivamente (MILLER et al. 1998). Apesar de a radiação UVA ser mais abundante, UVB é cerca de 1000 vezes mais eficiente em causar queimaduras de pele.

Exposição da pele ao UV afeta a sobrevivência e proliferação de células epidermais e dermais e altera várias funções cutâneas (KADEKARO et al. 2003). Os efeitos agudos da exposição ao UV são os mais diversos, e

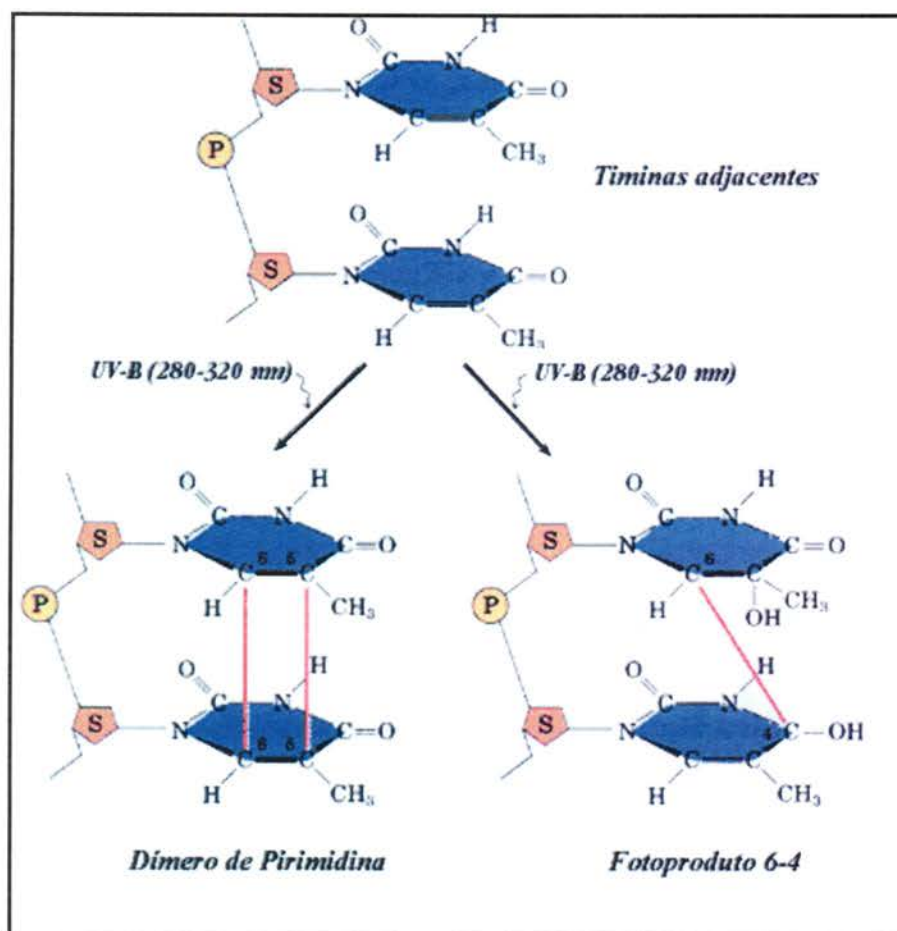
incluem lesão no DNA, apoptose, eritema, imunossupressão, envelhecimento e câncer (BRASH et al. 1996).

Um dos principais efeitos do UV no desenvolvimento do câncer está no dano direto ao DNA. Absorção do UVB pelo DNA pode levar a dois tipos de lesões: os fotoprodutos 6-4, gerados entre resíduos de pirimidinas adjacentes, e por dímeros de pirimidinas ou ciclobutanos, formados especificamente por resíduos adjacentes de timina ou citosina (Figura 1). Os dímeros de pirimidina são formados entre os átomos de carbono C-4 e C-5 de quaisquer duas pirimidinas adjacentes; as duplas ligações se tornam saturadas formando um anel de quatro membros (MATSUMURA e ANANTHASWAMY 2002). Já os fotoprodutos 6-4 se formam entre a posição seis e a posição quatro de duas pirimidinas adjacente, mais freqüente entre resíduos de TC e CC. Dímeros de pirimidina são considerados mais carcinogênicos que fotoprodutos 6-4, formando-se cerca de três vezes mais e sendo menos eficientemente reparados (YOU et al. 2001).

Ambos os tipos de lesão podem levar a mutações genéticas tais como transições C→T e CC→TT, este último característico de lesão por UV. Isto porque durante o processo de replicação, a DNA-polimerase não reconhece o dímero não reparado e o substitui por adenina (MATSUMURA e ANANTHASWAMY 2002). UVB pode causar também transversões de C→A e G→T, além de quebras no DNA (LINGE 1996; CLEAVER e CROWLEY 2002).

Fundação Antônio Prudente

Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação



Fonte: Modificado de DESPOMMIER e CHEN (2004)

Figura 1 - Formação de dímeros de ciclobutano (CPD) e fotoprodutos 6-4 entre bases adjacentes no DNA após radiação UVB.

Outro tipo de lesão que a radiação pode causar no DNA está no fato de que uma longa exposição pode levar a quebras nas ligações fosfodiéster da estrutura da molécula podendo ocasionar os chamados *single strand breaks* (SSB), quando essa quebra acontece em apenas uma das fitas, ou então *double strand breaks* (DSB), no caso das duas fitas.

O terceiro tipo de lesão que pode acometer o DNA seria ocasionado por espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas por excessiva exposição ao UV (SANDER et al. 2004), caracterizando assim um efeito indireto da radiação. Tem sido relatado que UV, principalmente UVA, é capaz de induzir

lesões no DNA *via reações fotosensibilizadas* que acabam gerando espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, oxigênio *singlets* e anions superóxidos (WANG et al. 2001). Estas moléculas poderiam causar SSB, mutações, rearranjos cromossomais e outras alterações que contribuiriam para um processo carcinogênico. Lesões nas bases nitrogenadas da molécula do DNA são, em sua maior parte, realizadas por ROS, seja oxidando ou mesmo reduzindo estas bases. Demonstrou-se que quase todas as lesões oxidativas em bases do DNA em fibroblastos em cultura como, 7,8 dihidro-8-oxoguanina, foram causadas por radiações UV, principalmente na região do UVA (KVAM e TYRREL 1997). Muitas destas lesões levam a pareamentos errôneos, como a 8-hidroxi-deoxiguanosina que faz o pareamento de G com T, podendo desta maneira, se não reparados, levar a mutações (CHENG et al. 1992).

1.2 MELANOMA

Com relação ao tipo de câncer induzido por UV, estudos mostram que enquanto os Carcinomas Baso- e Espinocelular parecem estar envolvidos com o tempo total de exposição ao sol durante a vida, o Melanoma está relacionado com exposição intensa e intermitente (HOLMAN et al. 1986; NELEMANS et al. 1993). O histórico de queimaduras de pele pelo sol tem sido freqüentemente usado como medida para exposições intermitentes e servem como um marcador para risco aumentado de melanoma. Queimaduras solares, especialmente no começo da vida, são importantes

fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma. Uma ou mais queimaduras severas pelo sol durante a juventude, duplicam o risco ao melanoma (WEINSTOCK et al. 1989). Estudos caso-controle demonstraram, com resultados consistentes, que exposição intermitente capaz de causar queimaduras é um importante fator para o desenvolvimento de câncer de pele (ELWOOD 1992).

Os locais de aparecimento de melanoma também sugerem a participação de exposições intermitentes ao sol. Melanomas ocorrem menos freqüentemente em áreas que são continuamente expostas à luz solar como face, mãos e braços e mais freqüentes em áreas protegidas, mas com exposição intermitente, como costas, ombros e pescoço em homens e costas, ombros e braços em mulheres (BUETTNER e RAASCH 1998).

O Melanoma é, dentre os casos de câncer de pele, o de menor incidência, porém com a maior taxa de letalidade. Isto porque apresentam um comportamento agressivo e frequentemente metastatizam. Este tipo de neoplasia origina-se dos melanócitos da pele, os quais têm origem embrionária a partir da crista neural. Estas células exercem a importante função de determinar a resposta da pele frente à exposição ao UV e representam cerca de <1 a 3 % das células epidermais. Sua função está em, através da fotoestimulação por UV, promover a síntese de melanina conferindo assim pigmentação à pele, a qual possui um importante efeito de fotoproteção.

Esta pigmentação em resposta à exposição à radiação ultravioleta pode ocorrer em dois passos básicos: imediata e tardia. No caso de

pigmentação imediata, esta se dá após alguns minutos de exposição, induzida principalmente por UVA, e é devido a fotooxidação de melanina já existente (KADEKARO et al. 2003). Já a pigmentação tardia se dá por UVA e UVB e envolve o aumento no número de melanócitos funcionais, estimulação da melanogênese, aumento da dendriticidade dos melanócitos e aumento na síntese, transferência, e empacotamento de melanossomos.

Contudo, a resposta da pele para pigmentação depende dos fototipos da pele, os quais podem variar de I a VI de acordo com a habilidade pigmentária constitutiva dos indivíduos (PATHAK e FANSELOW 1983). Indivíduos do fototipo I possuem pele muito clara, sempre apresentam queimaduras solares e nunca se bronzeiam quando expostas ao sol. Indivíduos do tipo II se bronzeiam pouco, e freqüentemente sofrem queimaduras solares enquanto os fototipos III e IV bronzeiam-se facilmente e raramente se queimam. Finalmente os tipos V e VI, representam os indivíduos com pele negra e que nunca se queimam em exposições ao sol. Essa classificação é de grande importância para estudos que procuram relacionar a ocorrência de melanoma em populações, visto que nestes casos o fototipo da pele dos casos deve ser levado em conta no sentido de encontrar os indivíduos com maior susceptibilidade ao desenvolvimento desta neoplasia.

Com relação à ação protetora do melanócito, a melanina (mais precisamente a eumelanina) é o pigmento que possui a habilidade de servir como uma barreira física para o UV incidente, atuando como um filtro, reduzindo portanto sua penetração na epiderme (SLOMINSKI et al. 2004).

Estes efeitos são conseguidos devido à localização dos melanossomos na área perinuclear dos melanócitos e queratinócitos, onde eles formam *caps* supranucleares que protegem o DNA dos raios UV. Contudo, durante exposições intensas e intermitentes as células recebem grandes doses de radiação UV sem proteção da síntese aumentada de melanina e os melanócitos possuem diversos fatores pró-sobrevivência e anti-apoptóticos. Estes dois fatores, portanto, podem fazer com que os melanócitos recebam intensa quantidade de luz UV mutagênica e mesmo assim consigam sobreviver (PERLIS e HERLYN 2004). Nestes casos onde os melanócitos adquirem mutações e/ou outros danos lesivos ao DNA é que o processo carcinogênico do melanoma pode ser desencadeado.

Incidência e mortalidade por melanoma têm crescido dramaticamente nos últimos anos em todo o mundo, afetando particularmente pessoas de pele clara. Estudos nos EUA demonstraram que a incidência de casos de melanoma subiu de 5.7 em 1973 para 14.3 por 100.000 em 1997. Estes números crescentes e preocupantes têm colocado ultimamente o melanoma como um caso de epidemia (BEDDINGFIELD 2003). No Brasil, este aumento de casos também foi detectado (CRIADO et al. 1999), sendo que as estimativas feitas pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer) sugeririam cerca de 5.760 novos casos de melanoma para o ano de 2006, sendo de 2.710 casos entre homens e 3.050 entre as mulheres (Ministério da Saúde 2005).

Origem étnica e localidade também têm sido fatores que predispõe ao melanoma. Isto porque Caucasianos tem maiores risco do que Hispânicos,

Asiáticos e Afro-Americanos (CROMBIE 1979). Na Austrália a incidência é maior do que 40 casos em 100.000, e pessoas com pele clara que se movem para regiões mais próximas do Equador também aumentam seus riscos ao melanoma (ARMSTRONG et al.1997).

Mas qual seria então o motivo que causou este enorme aumento dos casos de melanoma nestas últimas décadas? Estudos mostram a forte relação da exposição à luz UV como o mais importante fato de risco para aqueles com susceptibilidade fenotípica (ELWOOD 1992). A redução da camada de ozônio poderia ser o fator da maior exposição aos efeitos nocivos da radiação solar, sendo que estudos sugerem que redução de 1% da camada de ozônio aumenta a incidência de melanoma em 0,6 % (BURTON e ARMSTRONG 1994).

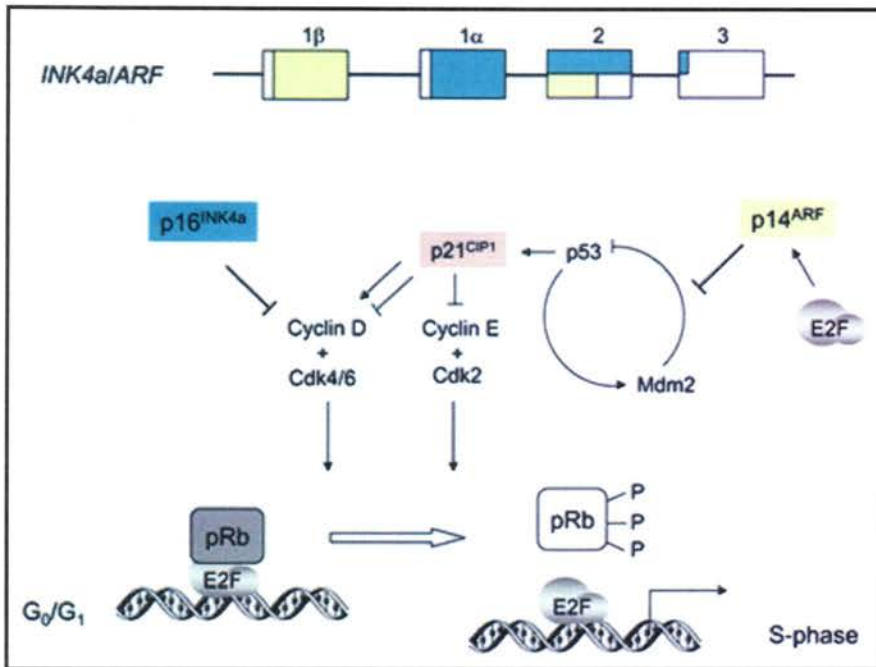
Porém, não só fatores ambientais são tidos como fatores de risco para melanoma. Muitos estudos demonstram que mutações, sejam elas esporádicas ou germinativas, contribuem demasiadamente para o desenvolvimento deste tipo de câncer de pele. Dentre os genes que conferem maior susceptibilidade ao melanoma, o *locus* gênico CDKN2A, localizado no cromossomo 9p21, têm sido relatado como um fator de alta penetrância a este tipo de câncer (HAYWARD 2003). Este *locus* codifica para duas proteínas importantes para a regulação do ciclo celular, os produtos p16^{ink4A} e p14^{ARF}, ambas geradas por um *alternative reading frame* (ARF), onde mesmo compartilhando seqüências de DNA no éxon 2, são independentemente transcritos e traduzidos (SHARPLESS e CHIN 2003).

Mutações neste *locus* são descritas tanto para casos esporádicos como para casos hereditários (KANNENGISSER et al. 2003).

Tanto p16^{ink4A} e p14^{ARF} agem na regulação do ciclo celular, mais precisamente na transição G1/S. p16 atua na inativação de proteínas quinases dependentes de ciclina, CDK4 e CDK6, as quais na presença de ciclina D, fosforilam a proteína Rb. Esta fosforilação permite o prosseguimento ao ciclo celular mediante liberação do fator transcricional E2F (THOMPSON et al. 2005), o qual promove a transcrição de diversos genes importantes na passagem de G1 para S (Figura 2). Assim, o funcionamento de p16^{ink4A} age na regulação do ciclo celular impedindo a passagem G1/S, através da inibição da fosforilação de Rb por inibição das CDKs 4 e 6, sendo que sua perda por mutações, deleções ou mesmo por processos epigenéticos, como hipermetilação da região promotora (VAN DER VELDEN et al. 2001), facilita a ciclagem das células em situações onde o ciclo celular deveria ser inibido, como por exemplo em situações de danos no DNA.

Já p14^{ARF} age na regulação do ciclo celular através de sua interação com a proteína Mdm2 (Figura 2). Mdm2 atua na regulação da proteína p53 através da promoção da degradação via proteassoma desta última. p53, por sua vez, é responsável por diversos processos celulares desde a parada de ciclo celular, reparo de DNA, além de apoptose (MENENDEZ et al. 2007). Em situações de agravo genotóxico, a ativação de p14^{ARF} e sua interação com Mdm2 leva à inibição da sua atividade de ubiquitinação de p53, permitindo assim o acúmulo de p53, que por sua vez culminaria com parada

de ciclo celular e reparo dos agravos gerados (HARRIS e LEVINE 2005). Portanto, a perda de $p14^{ARF}$ permitiria a transformação maligna de células através do acúmulo de mutações e instabilidade genética favorecida pela degradação de $p53$ via $Mdm2$.



Legenda: O locus *INK4a/ARF* tem os primeiros exons alternativos (1α e 1β) que são processados para o segundo e terceiro exons. Os transcritos α codificam para $p16^{ink4A}$ (azul) e os transcritos β codificam para $p14^{ARF}$ (verde). A figura demonstra o conhecimento atual de como $p16^{ink4A}$ e $p14^{ARF}$ atuam na regulação do ciclo celular de G1/S através das vias de Rb e p53.

Fonte: PETER (2005)

Figura 2 - Locus *CDKN2A* (*INK4a/ARF*) e vias de atuação de $p16^{ink4A}$ e $p14^{ARF}$.

Contudo, não apenas perda de genes supressores de tumor, como $p16^{ink4A}$ e $p14^{ARF}$, mas também ativação de vias oncogênicas tem sido atribuída ao desenvolvimento de melanoma. Dentre estas vias, destaca-se a via da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (FECHER et al. 2007). Essa via é composta por proteínas quinases compondo a cascata de sinalização

RAS→RAF→MEK→ERK, sendo RAS uma proteína da família de proteínas G, que ao ser ativada por sinais extracelulares, é capaz de fosforilar e ativar a RAF, que por sua vez ativa MEK (*MAP kinase extracellular signal-regulated kinase*), e que subsequentemente ativa ERK (*extracellular signal-regulated kinase*). A ativação de ERK leva a sua translocação ao núcleo, onde esta proteína é responsável pela ativação de alguns fatores de transcrição responsáveis pela proliferação e crescimento celular (CAMPBELL et al. 1998). A ativação anormal desta via ocorre devido a mutações somáticas nestes genes, onde a frequência de mutações da família do gene RAS, particularmente N-RAS, em melanomas humanos têm sido estimada na maioria dos recentes estudos entre 10 a 20% (CHUDNOVSKY et al. 2005). Por outro lado, mutações em B-RAF, estão associadas a aproximadamente 50% dos melanomas, as quais rendem à proteína uma ativação constante e conseqüentemente, a ativação da via (DEMUNTER et al. 2001; DAVIES et al. 2002; OMHOLT et al. 2003). De maneira interessante, as mutações vistas em B-RAF em melanoma têm sido associadas em regiões do corpo de exposições solares não-crônicas, ou seja, regiões expostas a exposições intermitentes (CURTIN et al. 2005), as quais, como descrito acima, são atribuídas ao desenvolvimento do melanoma. Portanto, em melanoma, mutações em B-RAF estão associadas com episódios de queimaduras solares mas não com melanomas de áreas protegidas do sol ou áreas de exposição crônica.

Alguns casos de melanoma, também apresentam ativação da via RAS sem, no entanto ter evidência de mutações (SATYAMOORTHY et al. 2003).

Isto pode ser creditado ao fato de que RAS não ativa apenas RAF, como também ativa a via da PI3K (*Phosphatidylinositol-3 phosphate kinase*) (FECHER et al. 2007). A ativação de PI3K leva a fosforilação do fosfatidilinositol bi-fosfato (PIP2), um fosfolípido de membrana, convertendo-o em PIP-3, o qual em altos níveis ativa a proteína quinase B (PKB ou AKT) (CANTRELL 2001). AKT ativada inativa proteínas que bloqueiam o ciclo celular ou estimulam a apoptose, portanto facilitando a proliferação e a sobrevivência de células.

A regulação da via PI3K→AKT está condicionada a atividade da proteína PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), a qual atua na degradação de PIP3 via atividade fosfatase, regulando assim a ativação de AKT (CANTRELL 2001). Perda de heterozigosidade em regiões do cromossomo 10q, onde se localiza PTEN, foi demonstrada em 30-50% de melanomas (CHUDNOVSKY et al. 2005), enquanto aproximadamente 10% de melanomas tem mutações em PTEN (TSAO et al. 1998).

Outro gene que vem sendo visto como fator de risco para o melanoma é o gene MC1R, um receptor para o hormônio estimulador de α -melanotrofina (α -MSH), responsável pela síntese de melanina. Variantes neste gene parecem estar comprometidos em sua capacidade de induzir a produção do pigmento nas células melanocíticas, caracterizando desta maneira o fototipo da pele do indivíduo. Dada a associação entre o tipo de pele e o risco do melanoma, não seria surpresa que certas variantes do gene MC1R tivessem maior risco para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia cutânea (REES et al. 1999).

Ultimamente, uma nova classe de genes vem sendo amplamente estudada no sentido de se buscar uma relação entre seu funcionamento com diversos tipos de câncer. Esta “classe” é conhecida como genes de reparo que são os genes responsáveis pela manutenção da integridade do genoma nos seres vivos. Ao longo da evolução o aparecimento e desenvolvimento destes genes foram de suma importância para a manutenção da vida, visto que devido aos inúmeros tipos de injúrias que o DNA pode sofrer, os danos não reparados poderiam levar a grandes problemas para as células, como casos de morte ou mesmo levar a um processo carcinogênico.

Estes genes possuem diversas funções e vias de sinalizações que garantam sua eficácia, desde o reconhecimento da lesão, recrutamento das enzimas responsáveis, passando por processamento dos danos e a parada do ciclo celular. Mutações inativadoras destas enzimas são responsáveis por alguns tipos de doenças, entre elas o Xeroderma Pigmentosum, Síndrome de Cockayne e Anemia Fanconi, Síndrome de Lynch, ou Ataxia-Telangiectasia, algumas das quais predispõe os indivíduos afetados à grande quantidade e variedade de tipos de câncer (WOODS 1998). Qualquer perturbação em genes das vias de reparo pode contribuir para a aquisição de mutações e/ou alterações potencialmente carcinogênicas. Decorrente destes fatos, é que se têm proposto que alterações nas vias de reparo de DNA são um dos primeiros eventos do processo de transformação de células, pois estas alterações possibilitariam a fixação de demais

mutações que poderiam levar as células a adquirirem o fenótipo tumoral (HANAHAHAN e WEINBERG 2000).

1.3 VIAS DE REPARO DO DNA

Sempre que ocorre uma lesão no DNA, existem certas moléculas, as quais são comumente denominadas de sensores, que reconhecem o dano e, subsequente, iniciam uma série de eventos e reações intracelulares que objetivam quatro tipos específicos de resposta: (a) transcricional, (b) *checkpoints*, (c) reparo e (d) apoptose (ZHOU e ELLEDGE 2000).

De uma maneira geral, estimulada pelas vias de sinalização sob controle de moléculas sensoras, existe toda uma maquinaria celular que procura ativar ou reprimir certos genes, bloquear o ciclo celular e permitir o reparo, mantendo a integridade do genoma. Contudo, se o reparo não é possível, a célula é levada ao processo de apoptose.

Neste processo de reconhecimento, o substrato para tal é de grande importância para o desencadeamento da resposta. Estruturas covalentes e/ou anômalas proporcionam sítios de reconhecimento de alta afinidade para os mais diversos tipos de enzimas relacionadas ao reparo. Incluem-se nessa lista as estruturas em forquilhas, estruturas de Holliday, bases oxidadas ou reduzidas, adutos no DNA, sítios abásicos ou quebras no esqueleto da molécula (SANCAR et al. 2004).

Um fato interessante a respeito das vias de reparo nas células eucarióticas é suas diversidade e complexidade, e em especial a

especificidade com que cada uma delas opera. Dentre os diversos sistemas de reparo, quatro deles possuem maior representatividade e importância, pelo menos em relação às células de mamíferos frente aos danos causados por UV, podendo-se destacar: (a) reparo por excisão de bases (BER); reparo por excisão de nucleotídeos (NER); reparo por recombinação homologa (HR) e reparo por junção dos terminais não homólogos (NHEJ) (CHARAMES e BAPAT 2003; PFEIFFER et al. 2004).

1.3.1 Reparo por excisão de bases (BER)

Danos ou perdas de bases são um evento comum na vida de uma célula, estimando-se que ocorra cerca de 10^4 lesões por dia nas células. Diante disso é necessário um eficiente sistema de reparo que mantenha a informação contida no DNA, evitando assim qualquer dano permanente no DNA, o qual possa levar ao câncer ou a morte celular. A grande maioria dos danos nas bases é decorrente das espécies reativas de oxigênio (ROS), deaminações espontâneas ou por agentes alquilantes (FORTINI et al. 2003).

Como já descrito, ROS podem ser gerados por reações estimuladas por UV, os quais acabam danificando as bases nitrogenadas do DNA. Estas bases podem ocasionar pareamentos errôneos durante o processo de replicação, gerando assim mutações. Nestes casos de bases alteradas ou oxidadas, o principal meio de reparo consiste no reparo por excisão de bases (BER- *base excision repair*) (BARZILAI e YAKAMOTO 2004).

O BER pode ser subdividido em cinco principais passos, sendo: (a) remoção da base danificada; (b) quebra da ligação fosfodiéster do sítio

abásico; (c) processamento do terminal bloqueado; (d) complementação do *gap* criado e (e) restauro da fita lesada (FORTINI et al. 2003).

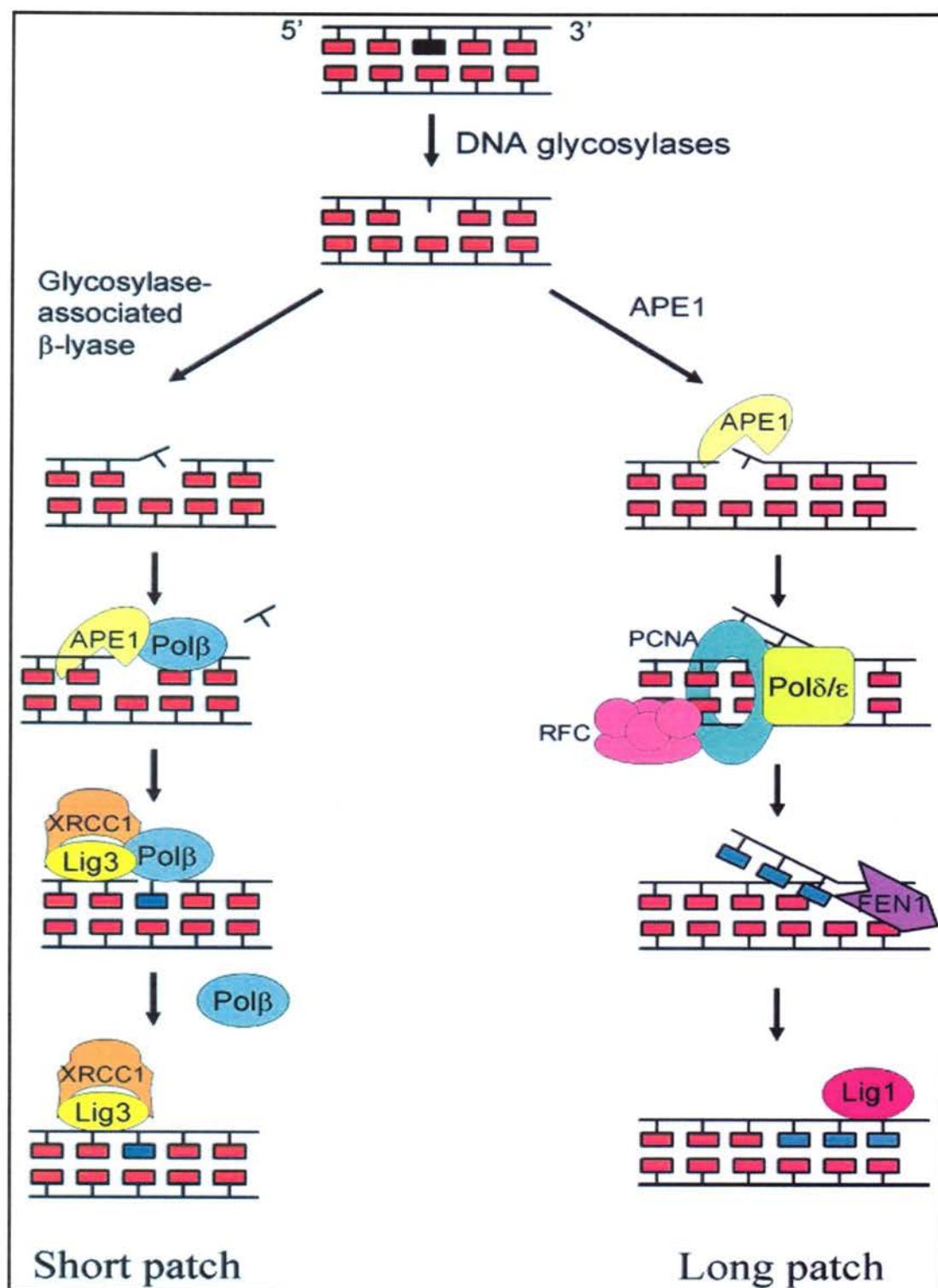
No primeiro passo desta via, a base é removida por uma enzima DNA glicosilase que quebra a ligação N-glicosídica entre a base alvo e a desoxirribose, deixando então um sítio abásico (AP) na molécula, que posteriormente será reparado. Interessante notar a diversidade de DNA glicosilases existentes nas células, decorrente principalmente da especificidade de cada uma delas (IDE e KOTERA 2004). Destacam-se dentre as principais glicosilases a OGG1 (*8-oxo-guanine glycosilase 1*), que reconhece e cliva 8-oxoguanina, um dos mais comuns tipos de lesões no DNA causadas por ROS e potencialmente carcinogênica, UDG (*uracil DNA glycosilase*) para uracilas e MBD4 para grupos metil em ilhas CpG.

Quando a base danificada é removida por uma glicosilase (SANCAR et al. 2004), como por exemplo OGG1, que cliva a ligação fosfodiéster do DNA na posição 3' do sítio abásico, outra enzima, APE1 endonuclease cliva a posição 5' do sítio e recruta a DNA polimerase Pol β para completar o *gap* de 1 nucleotídeo, o qual por fim é ligado pelo complexo de proteínas ligase 3 (Lig3) e XRCC1 (*X-ray cross complementing 1*) (Figura 3), constituindo portanto, a chamada *Short Patch* do BER.

Por outro lado, quando o sítio abásico é gerado por hidrólise espontânea, o reparo geralmente procede através da chamada *Long Patch Pathway* de BER. Nesta via, a endonuclease APE1 cliva a ligação fosfodiéster na porção 5' e recruta um complexo de proteína, composta por RFC (*Replication Factor C*), PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e

DNA polimerase Pol δ/ϵ , realizada o reparo do gap deixado por APE1, além de promover a ressíntese de alguns nucleotídeos. Por fim, ocorre a clivagem dos nucleotídeos substituídos pela atividade da endonuclease FEN-1 (*flap structure-specific endonuclease 1*) e ligação mediante Ligase 1. Estudos recentes têm sugerido que um dos motivos para a escolha entre estas duas vias de BER possa estar relacionado ao padrão de modificação de proteínas histonas do DNA, após o acontecimento de lesões, que além de auxiliar no recrutamento de proteínas de reparo, pode interferir na escolha entre sistemas de reparo, como por exemplo, *Short* e *Long Patch Pathway* em BER (HASSA e HOTTIGER 2005).

Outra proteína muito importante deste sistema de reparo é a chamada XRCC1. Tem se demonstrado suas inúmeras funções dentro do BER, principalmente em relação a coordenar a ação das diversas enzimas desta via, como AP-endonuclease (VIDAL et al. 2001a), Pol β e Ligase III (KUBOTA et al. 1996), relatando-se desta maneira a grande importância de XRCC1 para o reparo por excisão de bases. Outro fato que confirma a relevância de XRCC1 está nos estudos feitos com células deficientes para esta proteína que demonstraram sensibilidade 10 vezes maior a agentes alquilantes, além de mostraram acumulação de *single strand breaks* (SSB), elevado nível de aberrações cromossomais e alta frequência de espontâneas trocas de cromátides irmãs (THACKER e ZDZIENICKA 2003).



Legenda: Uma base danificada é reconhecida por uma DNA glicosilase para gerar um sítio abásico. Dependendo dos eventos iniciais nessa remoção de bases, a via de reparo pode ser um simples nucleotídeo (*Short Patch*) ou de 2-10 nucleotídeos (*Long Patch*).

Fonte: SANCAR et al. 2004

Figura 3 - Mecanismos de reparo do BER.

1.3.2 Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)

A absorção da energia da radiação UVB pelo DNA pode gerar dímeros de pirimidina (CPDs) e fotoprodutos 6-4, os quais são capazes de induzir mutações ou até mesmo *double strand breaks* se não forem reparados corretamente. Estes tipos de lesão, ao lado dos adutos de DNA, são preferencialmente reparados pela via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER- *nucleotide excision repair*) (COSTA et al. 2003).

Como no reparo por excisão de base, existem diferentes enzimas atuando na via do NER, sendo que a maioria delas foram descritas a partir de estudos realizados com células mutadas para tais proteínas e de pacientes com síndromes relacionadas com deficiência no sistema de reparo como, por exemplo, o Xeroderma Pigmentosum (XP) e Síndrome de Cockayne (CS). Estas proteínas foram nomeadas de acordo com seu específico grupo de complementação, sendo sete grupos identificados para XP (XPA-XPG) e duas para CS (CSA e CSB). Existe ainda um oitavo grupo de complementação para pacientes XP, denominado de XPV que é decorrente de mutações no gene da DNA polimerase η . Tal polimerase é recrutada durante a replicação do DNA em situações onde a fita molde contenha dímeros de timina induzidos por UV (GRATCHEV et al. 2003), não foram devidamente corrigidos pela maquinaria de reparo, sendo portanto responsável pela correta incorporação de nucleotídeos adenina, neutralizando as possíveis mutações causadas pelo fotoproduto.

Existem duas sub-vias em NER para. Primeiramente o GGR-NER (*global genomic repair* – NER) que opera ao longo do genoma, enquanto o

TCR-NER (*transcription-coupled repair* - NER) atua na remoção de lesões nas fitas transcritas de genes ativos (HANAWALT 2002) (Figura 4). A maior diferença entre estas duas sub-vias de reparo via NER tem sido atribuída aos passos envolvidos no processo de reconhecimento das lesões, bem como na eficiência de reparo de cada uma destas vias (SUGASAWA 2006). No TCR-NER, o bloqueio do processo de elongação da transcrição pela parada da RNA polimerase II (pol II), frente à presença de lesões no DNA da fita transcrita, é tido como o processo no qual a lesão pode ser percebida e reconhecida, onde o posterior recrutamento de CSB e eventualmente outras proteínas acaba disparando a reação de reparo (SARASIN e STARY 2007). Contudo, os passos exatos de reconhecimento da lesão e recrutamento de proteínas para o sitio de parada da RNA pol II, continuam não totalmente esclarecidos. Quanto à eficiência de reparo, TCR-NER tem demonstrado operar mais rapidamente no reparo de lesões UV do que em relação ao GGR-NER (HANAWALT 2002).

Por outro lado, em GGR-NER, as lesões são reconhecidas por proteínas que têm afinidade ao DNA e que, além disso, possuem específica afinidade por sítios danificados (SUGASAWA 2006). Um complexo contendo a proteína XPC exerce função essencial neste processo. XPC, juntamente com as proteínas hHR23B e centrina-2, é responsável pela ligação e reconhecimento de lesões. No entanto, análises bioquímicas revelaram que o complexo, mais precisamente XPC, não reconhece lesões baseando-se nos tipos específicos de lesões, mas sim a distorção que estas lesões causam na estrutura do DNA (SUGASAWA et al. 2002). Portanto, uma vez

que a lesão induz distorções na dupla hélice do DNA, XPC pode se ligar ao sítio independente da estrutura da lesão ela mesma. No complexo, HR23B protegeria contra de uma degradação proteossomal (NG et al. 2003), enquanto centrina-2 atuaria para reforçar a afinidade de XPC ao DNA (NISHI et al. 2005). No caso de lesões causadas por UV, os fotoprodutos 6-4, devido à maior distorção que ocasionam no DNA, podem ser prontamente reconhecidas por XPC, enquanto os dímeros de pirimidina (CPD), induzem pouca distorção na dupla hélice, o que leva XPC a possuir menor afinidade a esta lesão (SUGASAWA et al. 2001), contudo o reparo deste tipo de lesão ainda é dependente de XPC. Este fato pode ser uma das explicações do motivo dos CPDs serem mais carcinogênicos do que os fotoprodutos 6-4, justamente por serem menos eficientemente reconhecidos por XPC. Para o reparo de CPDs, o funcionamento de proteínas UV-DDB (UV damage DNA-binding), as quais são mutadas em paciente XP-E, são importantes no reconhecimento destas lesões, facilitando posteriormente a ligação de XPC ao sítio contendo CPDs.

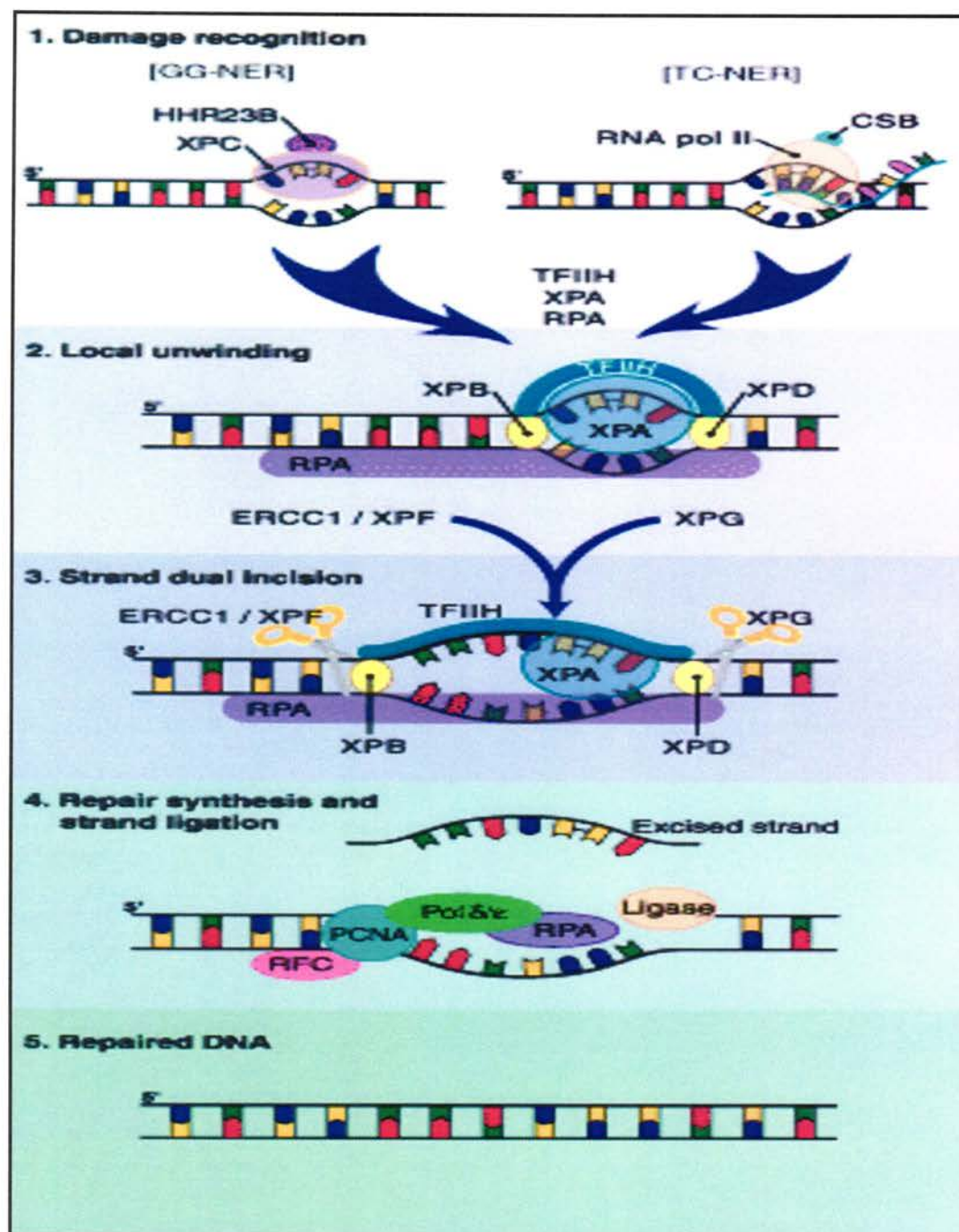
Os passos enzimáticos do NER envolvem o reconhecimento da lesão, abertura da dupla fita de DNA, incisões na fita danificada, uma de cada lado da lesão, ou seja, incisões 5' e 3', remoção do oligonucleotídeo contendo a lesão, ressíntese de DNA usando a fita complementar como molde e finalmente, ligação da fita recém sintetizada.

Após reconhecimento da lesão, seja via XPC no GGR ou pela parada da RNA pol II e CSB no TCR, os subseqüentes processos de reparo envolvem mecanismos em comum (Figura 4). O recrutamento da maquinaria

responsável pelo reparo começa com a ligação do fator de transcrição TFIIH, o qual é composto por nove subunidades sendo que as proteínas XPB e XPD exibem função já reconhecida no NER, devido a suas atividades ATPase e helicase (WEEDA et al. 1990). Desta maneira, XPB e XPD iniciam a abertura da dupla fita permitindo a chegada das outras enzimas envolvidas. Em seguida ocorre a chegada de XPA e RPA junto ao complexo. XPA é uma proteína com grande afinidade ao DNA lesado e interage tanto com TFIIH quanto RPA (STIGGER et al. 1998). Já RPA parece estar envolvida em assessorar o processo de pré-incisão da fita lesada, além de recrutar os fatores de replicação para a síntese do DNA reparado (KOLPASHCHIKOV et al. 2001).

Após a montagem desta maquinaria, são recrutadas as proteínas XPF-ERCC1 e XPG, as quais apresentam atividade endonuclease 5' e 3', respectivamente. Foi verificado que o recrutamento de XPG acontece normalmente em células deficientes em XPA, contudo a atividade endonucleásica não é realizada, confirmando assim a interação de XPA e XPG para a incisão (de LAAT et al. 1998). Ao contrário, o recrutamento de XPF-ERCC1 necessita de XPA (VOLKER et al. 2001).

Uma vez feita a incisão da fita originalmente lesada, o próximo passo consiste em preencher o gap existente. Neste momento, provavelmente toda a maquinaria deixa o DNA, restando apenas RPA, que é requerida para este processo de preenchimento. São recrutadas então as Pol δ e ϵ mais os cofatores PCNA e RFC via RPA, a síntese é feita e por fim, a DNA Ligase I termina o processo.



Legenda: Um modelo simplificado dos passos envolvidos no NER é mostrado. Reconhecimento da lesão (1) difere entre o GGR e TCR. Os passos subsequentes destes processos são comuns e incluem abertura da dupla hélice de DNA via TFIIH (2), incisões na fita lesada em ambas as posições 5' e 3' (3), ressíntese da fita de DNA e ligação.

Fonte: R&D systems (2003)

Figura 4 - Reparo por excisão de nucleotídeos (NER).

1.3.3 Recombinação Homóloga (HR)

Esta via de reparo ocorre basicamente quando há DSB, os quais podem ser produzidos por ROS, radiações ionizantes ou quando forquilhas de replicação de DNA encontram quebras e/ou outros tipos de lesão, tais como fotoprodutos por UV. A recombinação homóloga (HR – *Homologous Recombination*) repara lesões através do uso de homologia, principalmente da cromátide irmã sendo realizada na fase tardia de S e G2/M do ciclo celular (SANCAR et al. 2004). Fato interessante deste reparo está no seu processo livre de erros, diferente da outra via de reparo para DSB (NHEJ).

O início deste processo ocorre com a atividade de um complexo enzimático constituído por três proteínas (Mre11/Rad50/NBS1 ou complexo MRN), o qual faz o processamento dos terminais das duplas quebras retirando as extremidades 3' (JACKSON 2002). Em seguida ocorre a formação de um complexo pré-sináptico, no qual Rad51 forma um filamento nucleoprotéico que catalisa a troca entre as fitas do DNA, na qual a molécula danificada invade o outro DNA duplex. Esta conversão parece também ser auxiliada por certos parálogos de Rad51 e RPA (JACKSON 2002).

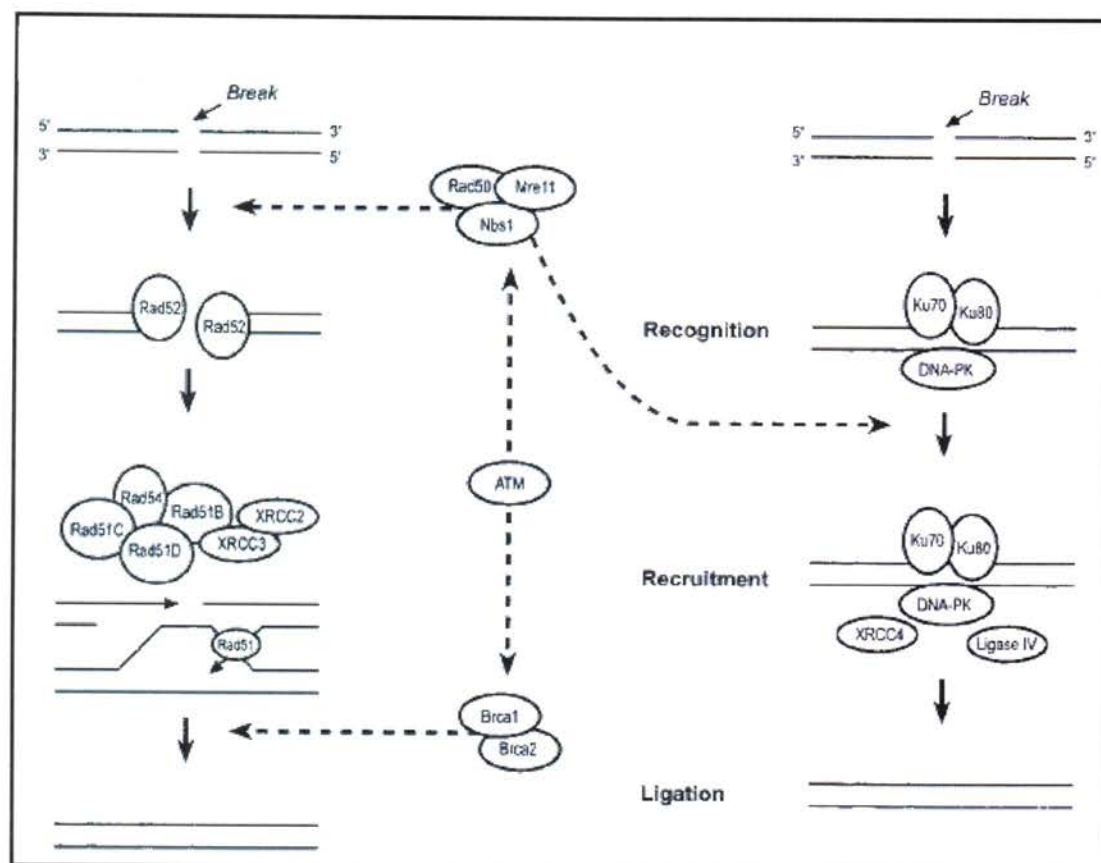
Conforme acontece essa troca de fitas, formam-se estruturas conhecidas como Junções de Holliday. Segue-se com síntese de DNA e por fim, as junções de Holliday são desfeitas por clivagem e ocorre ligação mediante atividade Ligase.

1.3.4 Reparo por junção dos terminais não homólogos (NHEJ)

Nem todas as duplas quebras no DNA são reparadas por HR. Em alguns casos, principalmente na fase G1, o reparo é realizado por outra via alternativa conhecida como junção dos terminais não homólogos (*NHEJ - non-homologous end joining*). Diferente da HR, a NHEJ não necessita de homologia para operar e está sujeita a erros durante o processo (SANCAR et al. 2004).

O sistema e método pelo qual operam o NHEJ, além de reparar quebras, são importantes em processos fisiológicos como para a recombinação V(D)J nas imunoglobulinas (KHANNA e JACKSON 2001), sendo que os erros durante o reparo, como algumas deleções ou inserções, que são de grande importância para aumento da variabilidade das imunoglobulinas.

Três passos são sugeridos para o reparo de DSD por NHEJ: (1) ligação aos terminais, (2) processamento dos terminais e (3) ligação. No passo inicial, as proteínas XRCC5 e XRCC6 se ligam aos terminais lesados do DNA, alinhando-os e preparando-os para a ligação, além de protegerem de eventuais degradações. Ocorre em seguida o recrutamento e ativação de DNA-PKcs (Proteínas Quinase dependentes de DNA) para o sítio de DSB, onde sua função de fosforilação permite a regulação e a acessibilidade de outras proteínas aos terminais de DNA (CHAN et al. 1999). Ocorre o processamento dos terminais por nucleases e polimerases (PASTWA e BLASIAK 2003) e por fim, ligação dos terminais mediante DNA ligase IV associada com XRCC4.



Legenda: A figura mostra a via da recombinação homóloga (HR – Homologous Recombination), ilustrando as proteínas envolvidas no processo, bem como os passos envolvidos. O reparo de DSB via Reparo por junção dos terminais não homólogos (NHEJ – non homologous end joining) também é ilustrado, junto com as proteínas e os processos que realizam a junção dos terminais de DNA danificados.

Fonte: GOODE et al. (2002)

Figura 5 - Sub-vias de reparo de lesões de duplas quebras no DNA (DSB).

1.4 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO CÂNCER

Nos últimos 30 anos tem havido considerável progresso no entendimento da genética molecular de doenças que são herdadas de acordo com as leis mendelianas, ou seja, aquelas cujas mutações em um único gene têm papel essencial na característica da doença. O desafio agora tem sido identificar as bases genéticas e moleculares de doenças complexas, as quais resultam de efeitos combinados de diversos genes, como por exemplo o câncer (PHAROAH et al. 2004). Mesmo para câncer, alguns genes já são conhecidos por predispor ao desenvolvimento de determinada neoplasia por apresentarem mutações herdadas, como mutações em BRCA1 e 2 para câncer de mama (WOLFF e WILSON 2006), mutações em p53 para síndrome de Li-Fraumeni (IWAKUMA et al. 2005), mutações no *locus* CDKN2A para melanoma (BISHOP et al. 2007), dentre outras. Ao contrário de outras doenças genéticas onde a penetrância de mutações é de 100%, no câncer, mesmo que mutações em determinados genes sejam consideradas como altamente penetrantes, nenhuma mutação que garante em 100% a chance de desenvolvimento de neoplasias foi descrita, o que sugere que existam demais fatores e, por que não, outros genes de efeitos modestos que em combinação com estes de alta susceptibilidade estejam atuando em conjunto (PHAROAH et al. 2004).

Contudo, se apenas cerca de 5% dos cânceres são de origem germinativa, ou seja, são devidas a mutações herdadas, como para os genes acima citados, quais seriam então os demais fatores que poderiam

contribuir para o desenvolvimento de tumores? Um conceito crescente na pesquisa oncológica é o de que o surgimento de tumores esporádicos seja consequência de uma interação gene-ambiente, onde fatores ambientais contribuiriam para a formação de danos no DNA e que tais danos, não devidamente corrigidos pelos fatores genéticos individuais, fixariam tais danos como mutações que poderiam ser potencialmente carcinogênicas. Os fatores ambientais envolvidos já são conhecidos, como por exemplo, a luz UV para câncer de pele, o tabagismo para câncer de pulmão e de cabeça e pescoço, entre outros. A grande questão, no entanto, é entender quais os fatores genéticos que contribuiriam nesse processo.

Decorrente desta questão é que vem se desenvolvendo um novo campo de pesquisa, que alguns autores denominam de Epidemiologia Molecular discutido por WÜNSCH-FILHO e ZAGO (2005). Este novo campo busca integrar os conhecimentos de biologia molecular no intuito de compreender melhor as bases genéticas da susceptibilidade a inúmeras doenças, como por exemplo o câncer. Os estudos neste campo têm, de modo geral, procurado relacionar o porquê do aparecimento de um determinado tumor baseando-se nos fatores ambientais de risco e em genes envolvidos na estabilidade genética. Tais estudos têm focado mais precisamente em polimorfismos genéticos (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*) em genes envolvidos no reparo de DNA. Esta escolha está baseada no fato de que genes de reparo agem diretamente na manutenção da estabilidade gênica, corrigindo possíveis mutações. Já a idéia de análise de polimorfismos se relaciona ao fato de que muitos desses polimorfismos

resultam em mudança de aminoácido, onde algumas destas trocas têm sido relacionadas a variações na atividade destas proteínas (XI et al. 2004). Assim, a hipótese dos estudos de epidemiologia molecular é a de que as variantes genéticas existentes na população tenham atividade diferenciada e que, juntamente com a exposição a fatores de risco, contribuam para um fenótipo que propicie um processo carcinogênico.

Os diferentes genes de reparo que atuam nas vias de reparo têm sido analisados de acordo com seus SNPs para os mais diversos tipos de câncer, todos em estudos epidemiológicos baseados em casos e controles, cujo polimorfismo poderia alterar a capacidade de reparar os danos no DNA levando a instabilidade genética e por sua vez à carcinogênese (GOODE et al. 2002). Os resultados mostrados pelas inúmeras pesquisas nesta abordagem demonstram desde fortes ou ausência de correlações de algumas SNPs com certos tipos de câncer numa população até estudos pouco conclusivos e/ou discordantes.

Com relação a genes da via BER, poucos estudos procuraram associar polimorfismos destes genes com melanoma. Para o gene OGG1, gene que codifica uma DNA glicosilase, o polimorfismo Ser326Cys o qual já foi demonstrado como fator de risco para câncer de pulmão (WIKMAN et al. 2000; LE MARCHAND et al. 2002) e próstata (XU et al. 2002), no entanto, não demonstrou ser fator de risco para melanoma (POVEY et al. 2007). Estudos funcionais demonstram que o genótipo Cys/Cys possui atividade menor de reparo a lesões de guanina (LEE et al. 2005), onde portanto indivíduos homozigotos poderiam ter maior chance de mutações por

espécies reativas que danificam a base guanina. Já em relação a outro importante gene de BER, XRCC1, os polimorfismos deste gene não têm demonstrado efeito significativo para melanoma (WINSEY et al. 2000; LI et al. 2006a).

Polimorfismos em genes envolvidos em processos anti-oxidantes, ou seja, genes envolvidos na eliminação desta espécie também podem contribuir para susceptibilidade a neoplasias. Um exemplo de gene que atua nessa função é a enzima superóxido dismutase 2 (SOD2) que converte o superóxido (espécie altamente reativa de oxigênio) em peróxido de hidrogênio, a qual é rapidamente convertida a água. Esta enzima contém um polimorfismo Val16Ala que foi demonstrado como fator de risco para câncer de mama e próstata (TAUFER et al. 2005). Além disso, estudo realizado sobre um modelo de progressão de melanoma demonstrou que enzimas responsáveis pela degradação de espécies reativas de oxigênio estavam entre as que tiveram maior diminuição de expressão na linhagem tumorigênica, dentre estas a SOD2 (DE SOUZA et al. 2006).

Enquanto os estudos dos polimorfismos dos genes de reparo da via BER são pouco direcionados ao melanoma, os genes de NER são grandemente voltados para este tipo de câncer, isto devido à relação existente entre os danos causados por UV que podem levar ao desenvolvimento deste tipo de neoplasia e por justamente estes danos serem preferencialmente reparos por excisão de nucleotídeos.

Inicialmente para o gene XPA, um polimorfismo existente em – 4 G/A, na região 5' UTR, demonstrou ser um fator de risco para câncer de pulmão

(VOGEL et al. 2005). Estudos com melanoma não foram realizados para este polimorfismo em XPA.

Para XPC, outro gene de NER e visto como a molécula responsável pelo reconhecimento de lesões no GGR, alguns polimorfismos já foram descritos como fatores de risco para melanoma. Três destes polimorfismos (poli AT de 83 pares de bases no intron 9, mudança de citosina para adenina no sítio de splice acceptor do intron 11 e Lys939Gln) apresentaram relação com melanoma apenas quando ajustados para fatores como idade e tipo de pele (BLANKENBURG et al. 2005a). Por outro lado o mesmo polimorfismo Lys939Gln não apresentou qualquer associação com melanoma num estudo multicêntrico (MILLIKAN et al. 2006). As variações Arg492His, Val499Ala, Arg687Arg não mostraram associação com risco ao desenvolvimento de melanoma (BLANKENBURG et al. 2005b).

Dois outros genes estudados em melanoma que compõe o NER são XPG, o qual polimorfismo Asp1104His não foi demonstrado associação (BLANKENBURG et al. 2005b; MILLIKAN et al. 2006), e o gene XPD onde dois polimorfismos têm sido demonstrados como fatores de risco a melanoma (LI et al. 2006b ; MILLIKAN et al. 2006). Já o gene ERCC1, que também atua no NER, possui um polimorfismo no códon 118 onde não há troca do aminoácido Asn, demonstrou que o genótipo Asn/Asn seria favorável para a quimioterapia de pacientes com melanoma em estágio avançado (LIU et al. 2005). Já os genes XPB e XPF, apresentam polimorfismos raros, o que dificulta sua associação em estudos epidemiológicos.

Com relação aos genes envolvidos no reparo de DSB, apenas XRCC3 foi estudado em melanoma. No entanto o polimorfismo Thr241Met têm demonstrado efeitos controversos, desde fator de risco (WINSEY et al. 2000) até nenhuma associação (DUAN et al. 2002; JACOBSEN et al. 2003).

Outros polimorfismos que não em genes envolvidos diretamente com reparo de DNA também são descritos como fatores de risco para melanoma, como por exemplo, genes da sintase de óxido nítrico (nNO) (LI et al. 2007a); p53 (STEFANAKI et al. 2007); receptor de vitamina D (LI et al. 2007b), além de genes de citocinas (NIKOLOVA et al. 2007), o que fortemente sugere que variações alélicas de diversos genes podem contribuir com a gênese não só de melanoma, mas também de diversas outras neoplasias, atuando portanto como genes de baixa penetrância (MOHRENWEISER et al. 2003; WÜNSCH-FILHO e ZAGO 2005).

Portanto, o intuito deste trabalho foi verificar quais os fatores associados ao desenvolvimento de melanoma na população brasileira, sendo estes fatores baseados na análise das características da população e em polimorfismos em genes de reparo de DNA bem como a relação entre estes fatores.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais do projeto consistem em identificar fatores genéticos que possam estar envolvidos na gênese de melanoma, baseando-se em polimorfismos em genes de reparo de DNA e o gene da SOD2, bem como pontuar os fatores populacionais de risco conhecidos (sexo e idade). Pretende-se verificar também a possível correlação entre estes dois fatores não apenas no intuito de se conhecer melhor os processos envolvidos na carcinogênese de melanócitos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar o papel de polimorfismos nos genes XPC (PAT-/++; IV11-5 C/A; K939Q), XPA (-4 G/A), XPG (D1104H), ERCC1 (N118N) que compõem a via NER; OGG1 (S326C) da via BER, e SOD2 (V16A), no desenvolvimento de melanoma;
2. Verificar a frequência destas variantes genéticas numa população miscigenada como a população brasileira;

3. Identificar se o risco de melanoma pode ser associado a fatores como sexo e idade;
4. Correlacionar a combinação de diferentes polimorfismos em genes de reparo e o risco associado a melanoma;
5. Correlacionar a possível relação de polimorfismos em genes de reparo com fatores de risco associados a melanoma como sexo e idade.

3 CASUÍSTICA e MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

O projeto foi baseado num estudo epidemiológico caso-controle de base hospitalar. Foram elegíveis pacientes com idade entre 19 e 79 anos com diagnóstico recente de melanoma cutâneo, válidos a partir do ano de 2004 até 2006, atendidos nos hospitais integrantes do estudo (Hospital do Câncer AC Camargo, Hospital das Clínicas da FM-USP, Instituto Brasileiro de Controle do Câncer) e que tiveram confirmação de casos por exame histopatológico. Os casos deveriam residir há mais de 6 meses na Região metropolitana de São Paulo. Foram excluídos os pacientes com Xeroderma Pigmentoso ou com melanomas outros que não fossem de áreas expostas ao sol.

Já com relação aos controles, os mesmos foram selecionados nos mesmos hospitais e também residentes a mais de 6 meses em São Paulo. A escolha também dependeu do pareamento com os casos segundo gênero e faixa etária. Além disso, não deveriam ter história de melanoma, Xeroderma Pigmentoso ou histórico de outros tumores cutâneos.

A escolha do tamanho da amostra foi baseada na análise do número total de casos de melanoma atendidos nos hospitais participantes no ano-base de 2001. Estimou-se portanto que dentro de um período de 24 meses, uma média de 630 pacientes. Destes, excluindo-se os não-residentes na

região metropolitana de São Paulo (cerca de 30%), reduziu-se o número para 440 pacientes. Excluindo-se também os casos prevalentes e com melanoma em áreas anatômicas não incluídas (cerca de 40%) e eventuais perdas em torno de 20%, estimou-se a amostra final de 210 casos. Assim, como a idéia do projeto foi um estudo pareado (1:1), foram incluídos também 210 controles.

Para qualquer estudo populacional de base epidemiológica, o tamanho das amostras deve ser o bastante para proporcionar um intervalo de confiança de no mínimo 95% e um *odds ratio* (OR). Portanto, para nosso estudo foi necessário estimar a frequência dos polimorfismos que deveriam ser estudados, baseando-se no tamanho populacional estimado para que atendessem os critérios discutidos acima. Para tal, foi plotado um gráfico do tamanho populacional esperado em função da frequência de determinado polimorfismo, onde o OR foi estimado em isolinhas logarítmicas (Figura 6).

Através do gráfico, ficou demonstrado que a escolha de polimorfismos que tivessem frequência populacional entre 20 e 45%, poderiam, caso tivessem associação positiva com melanoma, nos dar um *odds ratio* de no mínimo 1,75, baseando-se na estimativa de 210 casos. O passo seguinte então foi levantar na literatura as variantes alélicas de genes de reparo que estivessem dentro desta faixa de frequência em populações caucasianas. Os resultados apontados indicaram a possibilidade de estudar sete polimorfismos em genes de reparo que apresentavam uma média de frequência adequada.

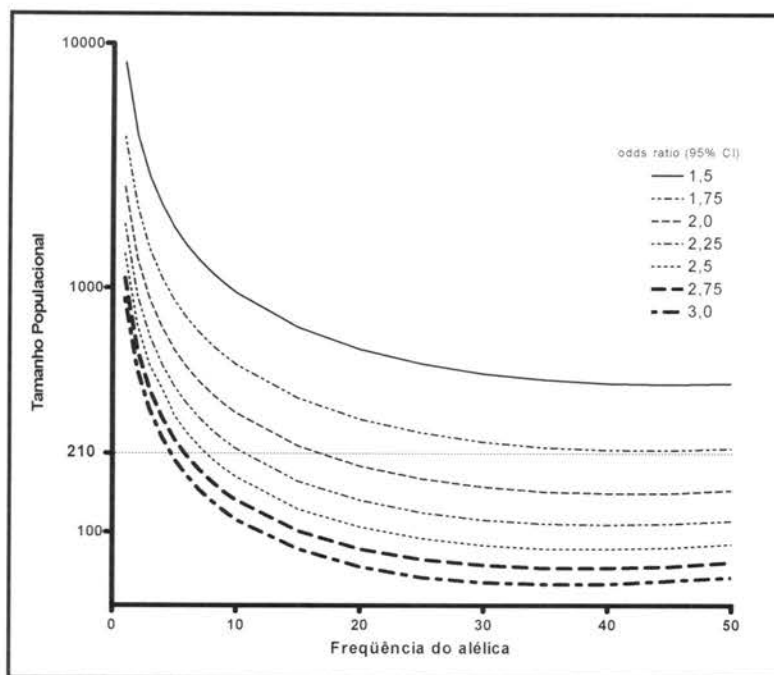


Figura 6 – Gráfico logarítmico representando o tamanho populacional necessário para um determinado *odds ratio* com 95% de intervalo de confiança (isolinhas) em função da frequência alélica de polimorfismos.

Os polimorfismos escolhidos foram: a presença de uma região repetitiva de adeninas-timinas (poli AT ou PAT) de 83 pares de bases (bp) no intron 9; uma substituição de citosina por adenina no nucleotídeo – 5 acceptor de splicing do intron 11 e uma substituição do aminoácido lisina (Lys ou K) por glutamina (Gln ou Q) no códon 939 no gene XPC, onde as frequências médias foram de 37; 39 e 42% respectivamente. Os demais polimorfismos consistiam de uma substituição do aminoácido aspártico (Asp ou D) por histidina (His ou H) no códon 1104 do gene XPG, de frequência 24%, troca do aminoácido serina (Ser ou S) por cisteína (Cys ou C) na porção 326 de OGG1 de frequência 23%, troca de citosina por timina no códon 118 de ERCC1, o qual não ocasiona troca do aminoácido asparagina (Asn ou N) com 45% e, por fim, uma troca da base guanina por adenina no

nucleotídeo – 4 da região 5' UTR do gene XPA, 42% de frequência. Além destes foi analisado a mudança do aminoácido Valina por Alanina no códon 16 do gene da SOD2 (superóxido dismutase), onde sua frequência é descrita como sendo de 41%. A representação gráfica dos genes estudados, bem como a localização de cada polimorfismos na estrutura gênica pode ser melhor visualizado no anexo 1.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Os pacientes que concordaram em participarem do estudo assinaram um termo de consentimento esclarecido e tiveram o sangue coletado por uma enfermeira participante do estudo. A coleta de sangue foi realizada através de tubos selados a vácuo contendo EDTA, a fim de se evitar a coagulação. Um total de 4 ml de sangue periférico foi retirado e em seguida levadas ao laboratório para extração do DNA dos leucócitos.

O primeiro procedimento foi o de lise de hemácias, onde o volume de sangue foi transferido para um tubo Falcon de 15 ml, onde se completou o volume com solução de lise de hemácias (NH_4HCO_3 1mM; NH_4Cl 114 mM; H_2O MilliQ q.s.p. 1000 ml). A solução foi deixada na geladeira por 30 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 300 rpm, descartando-se o sobrenadante tomando-se o cuidado de não retirar-se o *pellet* de células brancas.

Em seguida procedeu-se a extração do DNA através da lise de leucócitos através da adição de 2,4 ml de solução de lise (NaCl 4M; Tris-HCl

10 mM; EDTA 0,5 M pH 8,0 e H₂O MilliQ q.s.p. 100 ml); 48 µl de SDS 10% e 50 µl de Proteinase K (100 µg/ml), sendo em seguida deixado a solução em banho seco a 37°C *overnight*. Após a digestão, os tubos foram centrifugados por 300 rpm por 15 minutos e transferiu-se o sobrenadante contendo o DNA para um tubo Eppendorf limpo. Adicionou-se 2 volumes de etanol absoluto gelado, o tubo foi invertido diversas vezes até que se notasse que o DNA tinha precipitado.

Após a precipitação do DNA, este foi retirado da solução com auxílio de uma ponteira plástica e transferido para um microtubo contendo 1000 µl de etanol 70%, para que fossem centrifugados a 6000 rpm por 5 minutos. O etanol foi retirado e o procedimento repetido por 2 vezes. Por fim, realizou-se uma ultima lavagem com 1000 µl de etanol absoluto, centrifugando-se por 6000 rpm por 5 minutos para em seguida desprezar-se o etanol deixando-se secar a temperatura ambiente. O DNA então foi ressuspendido em TE (volume de 400 µl). A concentração do DNA foi calculada em ng/µl através de espectrofotômetro (GeneQuant – Amersham Biosciences).

3.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

O método escolhido para genotipar a casuística utilizada no estudo foi a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) seguida de restrição. Através de tal reação seria possível a amplificação específica da região de DNA que apresentasse o alelo polimórfico dos genes de interesse no estudo. A utilização das concentrações dos reagentes bem

como das condições de amplificações foram otimizadas de maneira a produzirem um produto amplificado único e de grande intensidade quando observado em gel de agarose sob luz UV, de maneira a possibilitar a genotipagem correta das amostras nos passos posteriores.

Quanto à utilização dos reagentes, as reações de PCR foram realizadas, com concentrações finais: 1x *Buffer* da enzima *Taq* Dna polimerase, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP Mix, 0,3 mM de Primer Foward, 0,3 mM de Primer Reverse, 1U enzima *Taq* Dna polimerase (Invitrogen), concentração de 100 a 200 ng de DNA das amostras e água MilliQ autoclavada numa quantidade suficiente para completar 20 μ l, o volume final da reação, colocados em tubo tipo Eppendorf. Estas condições foram válidas para a amplificação dos polimorfismos XPC PAT, XPC K939Q, XPCIV11-5 C/A, XPG D1104H, OGG1 S326C, ERCC1 N118N e SOD2 V16A. Já com relação a amplificação de XPA -4 G/A, as alterações foram restritas a utilização de 1 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de Primers Foward e Reverse e adição de 2,5 % de DMSO, garantindo assim o não aparecimento de produtos inespecíficos na reação.

Uma vez terminada a montagem da reação, as amostras foram levadas ao termociclador (PCR System 9700 – Applied Biosystem) onde as condições da amplificação foram otimizadas para: 1 ciclo de 94° C por 5 min para desnaturação completa do DNA, seguido de 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s de temperatura de associação dos primers, cuja temperatura variou de acordo com a composição das bases (Tabela 1) e 30s a 72° para

amplificação dos produtos. Seguiu-se após o termino dos 40 ciclos, uma extensão final de 5 min a 72° C.

Após o termino da reação de PCR, as amostras foram conferidas para a adequada amplificação em gel de agarose 1,5 % já corado previamente com Brometo de Etídio e submetidas à eletroforese por cerca de 1h a 120 v. Após a eletroforese, o gel foi visto sob luz UV e em seguida fotografado utilizando-se para isso o equipamento *Image Master* (Pharmacia Biotech) disponível no laboratório de Oncologia Experimental da FMUSP. Todos os géis continham um marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen) para confirmação da amplificação do tamanho esperado para determinado gene. Para o polimorfismo de XPC PAT, o próprio produto de PCR já indicava o genótipo da amostra, isso porque tal variante alélica consiste da presença ou ausência de uma região de 83 pares de bases de repetições AT. Assim, se o indivíduo fosse homozigoto para ausência do poli AT (-/-) o produto amplificado deveria ser uma banda única de 266 bp, enquanto se fosse homozigoto para a presença de poli AT (+/+) deveria apresentar banda única de 344 bp. Já o individuo heterozigoto apresentaria as duas bandas. Existe um erro no tamanho do amplificado que contém a região de 83 AT, pois a soma não corresponderia a 344 e sim a 349. A explicação está no fato de que a inserção desta região de 83 pares de bases ocasiona necessariamente a deleção de 5 pares de bases do intron 9 de XPC (KHAN et al. 2000).

Uma vez que a amplificação dos DNAs foi adequada, o passo posterior foi genotipar as amostras quanto a seu haplótipo nos genes

abordados no estudo. Para tal, foi abordada a metodologia de restrição dos fragmentos através do uso de enzimas de restrição. Tal metodologia é conhecida como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A escolha de tal método é devido ao efeito que a substituição de bases no DNA causa em sítios de restrição de enzimas, assim o polimorfismo de uma base pode criar ou mesmo retirar um sítio de restrição podendo então ser usada uma determinada enzima para a correta genotipagem.

A reação de restrição foi realizada utilizando-se cerca de 1 µg do produto amplificado por PCR, 1x Buffer da Enzima a ser utilizada, 1 U da enzima adequada para cada polimorfismo (Tabela 1) e água MilliQ autoclavada na quantidade suficiente para completar 10 µl de reação, volume final, sendo todos os reagentes colocados em tubo tipo Eppendorf. A restrição se deu em banho seco por cerca de 2 horas, onde a temperatura variou de acordo com a temperatura ideal de cada enzima. Após o termino da reação, o produto obtido foi colocado em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio e submetido a eletroforese por cerca de 1h a 120 V. Em seguida o gel foi visualizado sob luz UV e fotografado. Com auxílio da fotografia, a genotipagem das amostras foi anotada de acordo com o padrão de restrição obtido e previamente determinado. Um marcador molecular de 100 bp (Invitrogen) também foi colocado em todos os géis de agarose para confirmação dos tamanhos dos fragmentos. Todos os sets de restrições foram acompanhados pela restrição de DNA de fago λ (Invitrogen) como controle positivo do funcionamento da enzima.

A genotipagem das amostras foi realizada através do tamanho dos produtos resultantes da restrição, onde o padrão esperado para cada genótipo pode ser conferido na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação dos genes e dos respectivos SNPs (*single nucleotide polymorphisms*).

gene (SNP)	Primers (5'→3')	Temp °C	RFLP	Tamanho esperado (bp)		
XPC poli AT -/+	F - TAGCACCCAGCAGTCAAAG	56		(-/-)	(+/-)	(+/+)
	R - TGTGAATGTGCTTAATGCTG			266	344/266	344
XPC K939Q	F- GGAGGTGGACTCTCTTCTGATG	58	Pvu II	KK	KQ	QQ
	R- TAGATCCAAGCAGATGACC			765	765/585/180	585/180
XPCIV11-5 C/A	F- AAATGACCTGGGCCTGTTTG	63	Fau I	CC	CA	AA
	R- GGCAGGAAGAGGTACACATTC			160/43	203/160/43	203
XPG D1104H	F- GACCTGCCTCTCAGAATCATC	59	Nla III	DD	DH	HH
	R- CCTCGCACGTCTTAGTTTCC			272	272/227/45	227/45
XPA -4 G/A	F- TCAGAAAGGCCGGTCCGGT	58	Msp I	GG	GA	AA
	R- CTGGCGCAGCATCAGTGC			109/96	139/109/36	139/96
OGG1 S326C	F- AGTGGATTCTCATTGCCTTCG	57	Fnu4h I	SS	SC	CC
	R- GGTGCTTGGGGAATTTCTTT			251	251/153/98	153/98
ERCC1 N118N (T/C)	F- GAGGTGCAAGAAGAGGTGGA	59	BsrDI	CC	TC	TT
	R- GCAGAGCTCACCTGAGGAAC			208	208/128/80	128/80
SOD2 V16A	F-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG	62	Nae I	VV	VA	AA
	R-GCGTTGATGTGAGGTTGGAC			110	110/85/25	85/25

São mostrados também os primers utilizados para a reação de PCR, a temperatura de anelamento utilizada, o tipo de enzima usada para RFLP e o tamanho esperado em pares de bases (bp) das bandas para cada genótipo em questão.

O cálculo de freqüência dos alelos foi obtido através da soma dos indivíduos homozigotos com metade dos heterozigotos e dividindo tal numero pelo total de amostras. O símbolo *p* é aqui indicado como a freqüência do alelo “dominante” e *q* como a freqüência do alelo “recessivo” (alelo polimórfico).

3.4 ANÁLISE IN SILICO DAS SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS NOS POLIMORFISMOS GÊNICOS

Dois algoritmos *in silico*, o algoritmo PolyPhen (<http://tux.embl-heidelberg.de/ramensky/>) e o algoritmo SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>), foram usados para prever o impacto putativo dos polimorfismos com troca de aminoácidos nos genes XPC, XPG, OGG1 e SOD2 na função da proteína. Polyphen prevê o impacto funcional das trocas de aminoácidos por considerar a conservação evolutiva, as diferenças físico-químicas e a proximidade da substituição para prever domínios funcionais ou características estruturais. Os “scores” de Polyphen (PISC) foram designados como provavelmente danoso (2.00), possivelmente danoso (1.50–1.99), potencialmente danoso (1.25–1.49), borderline (1.00–1.24) ou benigno (0.00–0.99) de acordo com a classificação proposta (XI et al. 2004). Já o algoritmo SIFT prevê a importância funcional da substituição de aminoácidos com base no alinhamento de seqüências protéicas ortólogas e parálogas. Os “scores” de SIFT foram classificados como intolerantes (0.00-0.05), potencialmente intolerantes (0.051-0.10), borderline (0.101-0.20) ou tolerantes (0.201-1.00) de acordo com a classificação proposta (NG e HENIKOFF 2001; XI et al. 2004). Polyphen tem sido mostrado ter mais que 80% de certeza na predição de trocas deletérias de aminoácidos enquanto para o algoritmo SIFT, esta certeza é pouco maior que 70% (XI et al. 2004). A sensibilidade dos algoritmos Polyphen e SIFT para prever mutações deletérias em genes XP é de cerca de 85% e 83%, respectivamente.

3.5 ANÁLISE *IN SILICO* DE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES EM ELEMENTOS REGULATÓRIOS DE SPLICING NOS ÍNTRONS POLIMÓRFICOS DE XPC

Como dois dos polimorfismos estudados estão locados em regiões intrônicas (XPC PAT e XPC IV11 -5 C/A), buscou-se a utilização de ferramentas *in silico* que pudessem auxiliar em informações a respeito de possíveis alterações em sítios ou putativos elementos regulatórios de splicing causados por tais polimorfismos. Para tal análise foi utilizada as ferramentas de procura de *motifs* reguladores de splicing ESRS (*exonic splicing regulatory search*) (<http://ast.bioinfo.tau.ac.il/ESR.htm>) e RegRNA (<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/html/about.html>) (MACKIE et al. 2001). A utilização do algoritmo ESRs foi utilizada baseando-se nos dados descritos por FAIRBROTHER et al. (2002) e WANG et al. (2004). Já o uso do algoritmo RegRNA baseia-se nos dados de STAMM et al (2006). Para análise específica do impacto da troca de C por A no sítio acceptor de splicing do intron 11, utilizou-se as metodologia de informação baseadas em teoria descritas por SCHNEIDER (1997), e disponíveis na rede web (<http://www.lecb.ncifcrf.gov/~toms/delilaserver.html>).

3.6 META-ANÁLISE

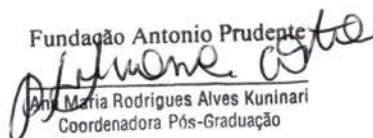
Com o objetivo de verificar os resultados deste trabalho e analisá-los de maneira qualitativa com os demais resultados publicados pela literatura, resolveu-se combinar nossos resultados com os de trabalhos já publicados de maneira a se realizar uma meta-análise buscando-se compreender melhor a relação entre polimorfismos de XPC (K939Q) e XPG (D1104H) e melanoma. A importância de meta-análises consiste em avaliar o grau de heterogeneidade dos resultados existentes na literatura, além de prover melhor confiança estatística, uma vez que estudos que analisam um pequeno número de indivíduos podem ter pouco poder estatístico para detectar efeitos de baixa penetrância para o desenvolvimento de câncer, como polimorfismos em genes de reparo.

Para tal, foi realizado uma busca no *database* do PubMed (www.pubmed.com) os trabalhos já publicados que analisaram os polimorfismos de XPC K939Q e XPG D1104H e o risco de melanoma. Os dados com relação ao número de indivíduos casos e controles bem como de indivíduos correspondente a cada genótipo para cada polimorfismo foram extraídos e analisados segundo o critério estatístico descrito por HU et al. (2005) para meta-análises. Dos artigos selecionados que analisaram estes dois polimorfismos em melanoma apenas um (MILLIKAN et al. 2006) não foi utilizado nos resultados da meta-análise por utilizarem um desenho de estudo baseado apenas em amostras de casos de melanoma. A análise dos dados bem como os resultados foi obtida usando-se o programa Review

Manager 4.2 (Oxford, England). Os resultados foram apresentados em OR (*odds ratio*) e intervalo de 95% de confiança (95% CI). Heterogeneidade entre os estudos foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Chi-quadrado foi usado para avaliar as diferenças entre pacientes com melanoma e os controles quanto aos fatores de sexo e faixa etária, além de frequência de cada alelo bem como dos genótipos dos polimorfismos selecionados. O risco relativo atribuído a cada genótipo é dado pelo valor de *odds ratio* (OR) e do intervalo de 95% de confiança. Para avaliar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências dos genótipos observados foram comparadas com os valores esperados baseando-se na frequência dos alelos encontrados, utilizando-se uma variação do teste de Chi-quadrado (goodness-of-fit test). O equilíbrio de Hardy-Weinberg é testado apenas nos controles com o intuito de verificar se não ocorrem desvios significativos na frequência de genótipos na população em geral, onde os controles representariam uma parcela da mesma.

Fundação Antonio Prudente

Prof.ª Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS POPULACIONAIS DA CASUÍSTICA

Conforme idealizado, o projeto incluiu a participação de 210 casos de melanoma, confirmados através de exame histopatológico, e 210 controles, sem história prévia de câncer, para estudo dos fatores ambientais e genéticos em relação ao risco de melanoma cutâneo. Como resultado de pareamento não houve diferença com relação a frequência dos sexos entre casos e controles, sendo esta de 49,5% para o sexo masculino e 50,5% para o sexo feminino entre os casos e 49% para o sexo masculino e 51% para o sexo feminino entre os controles.

Quando analisada a ocorrência de melanoma em função da idade, indivíduos categorizados para idade menor que 50 anos ou maior/igual a 50 anos, verifica-se uma significativa diferença entre a idade de diagnóstico de melanoma ($p=0,03$), onde indivíduos superiores a 50 anos têm risco maior de apresentar melanoma (OR 1,52; 95% CI 1,03 – 2,23). Porém, quando analisados os dois fatores em conjunto, verificou-se que não houve diferença entre o aparecimento de melanoma em mulheres em função da idade, ou seja, menor e maior/igual a 50 anos. Já com relação ao sexo masculino, verificou-se que indivíduos acima dos 50 anos apresentaram maior risco em relação ao aparecimento de melanoma (OR 1,76; 95% CI 1,01 – 3,05;

$p=0,04$). Detalhes da distribuição da casuística do estudo em relação a sexo e faixa etária podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2 - Características da casuística segundo faixa etária e sexo. Valores representam o número de indivíduos em cada categoria.

Faixa etária	Sexo		Casuística	
	Masculino	Feminino	Controles	Casos
15 a 19	3	2	2	3
20 a 24	5	4	8	1
25 a 29	10	14	15	9
30 a 34	13	18	14	17
35 a 39	18	13	20	11
40 a 44	33	26	35	24
45 a 49	26	25	22	29
50 a 54	30	25	29	26
55 a 59	19	25	19	25
60 a 64	8	26	16	18
65 a 69	18	12	11	19
70 a 74	14	13	10	17
75 a 79	10	10	9	11
Total	207	213	210	210

4.2 POLIMORFISMOS EM GENES DE REPARO E RISCO DE MELANOMA

Os polimorfismos genéticos dentro dos seis genes propostos foram genotipados para 191 casos de melanomas e para 188 controles que tiveram sangue colhido para o estudo sobre polimorfismos nos genes de reparo. A distribuição do número de indivíduos, tanto de casos quanto controles, quanto aos genótipos para cada um dos oito polimorfismos analisados são demonstrados na tabela 3. Os valores estatísticos referentes ao risco relativo destes polimorfismos em relação ao desenvolvimento de melanoma são representados pelos valores de *odds ratio* (OR) e do intervalo de 95% de confiança (95% CI).

Tabela 3 - Frequência dos genótipos para cada um dos polimorfismos estudados e OR (95% CI).

gene	controles	casos	OR	95% CI	p
<i>XPC PAT</i>					
(-/-)	96 (51%)	65 (34%)	Ref		
(+/-)	71 (38%)	85 (44%)	1,78	1,13 - 2,76	0,01
(+/+)	21 (11%)	41 (22%)	2,88	1,56 - 5,32	0,0006
<i>XPG D1104H</i>					
DD	102 (54%)	106 (56%)	Ref		
DH	64 (34%)	75 (39%)	1,28	0,73 - 1,73	0,58
HH	22 (12%)	10 (5%)	0,43	0,19 - 0,96	0,037
<i>OGG1 S326C</i>					
SS	117 (62%)	117 (61%)	Ref		
SC	60 (32%)	64 (33%)	1,07	0,69 - 1,65	0,77
CC	11 (6%)	10 (5%)	0,90	0,37 - 2,22	0,83
<i>XPA -4G/A</i>					
GG	58 (31%)	54 (29%)	Ref		
GA	93 (49%)	92 (48%)	1,06	0,66 - 1,70	0,80
AA	37 (20%)	45 (23%)	1,31	0,73 - 2,31	0,35
<i>XPC K939Q</i>					
KK	84 (45%)	61 (32%)	Ref		
KQ	84 (45%)	92 (48%)	1,51	0,97 - 2,35	0,06
QQ	20 (10%)	38 (20%)	2,61	1,39 - 4,93	0,0025
<i>XPC IV11-5 C/A</i>					
CC	84 (45%)	55 (29%)	Ref		
CA	82 (43%)	96 (50%)	1,78	1,14 - 2,80	0,01
AA	22 (12%)	40 (21%)	2,77	1,49 - 5,17	0,0011
<i>ERCC1 N118N (C/T)</i>					
CC	63 (33%)	53 (28%)	Ref		
CT	79 (42%)	85 (44%)	1,28	0,79 - 2,06	0,31
CC	46 (24%)	53 (28%)	1,37	0,79 - 2,34	0,25
<i>SOD2 V16A</i>					
VV	68 (36%)	57 (30%)	Ref		
VA	90 (48%)	98 (51%)	1,29	0,82 - 2,04	0,25
AA	30 (16%)	36 (19%)	1,43	0,78 - 2,60	0,24

4.2.1 XPC poli AT (PAT)

A genotipagem deste polimorfismo, como descrito nos materiais e métodos, pôde ser determinada pelo tamanho das bandas presentes, como pode ser visto na figura 7. A análise estatística demonstrou que tanto o genótipo heterozigoto (+/-) quanto homozigoto polimórfico (+/+) demonstraram associação positiva para o desenvolvimento de melanoma (Tabela 3). A freqüência de cada alelo entre casos e controles diferiu significativamente ($p=0,0042$), sendo $p(-)=0,70$ e $q(+)=0,30$ para controles e de $p(-)=0,56$ e $q(+)=0,44$ em casos, onde $p(-)$ representa o alelo de maior freqüência (poli at -) e $q(+)$ representando o alelo de menor freqüência (poli at +). O cálculo para verificar se a distribuição dos genótipos estava dentro do valor esperado para a freqüência dos alelos, ou seja, se a distribuição estava dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) não demonstrou diferença estatística ($p=0,16$), demonstrando o equilíbrio da freqüência dos genótipos no grupo controle.

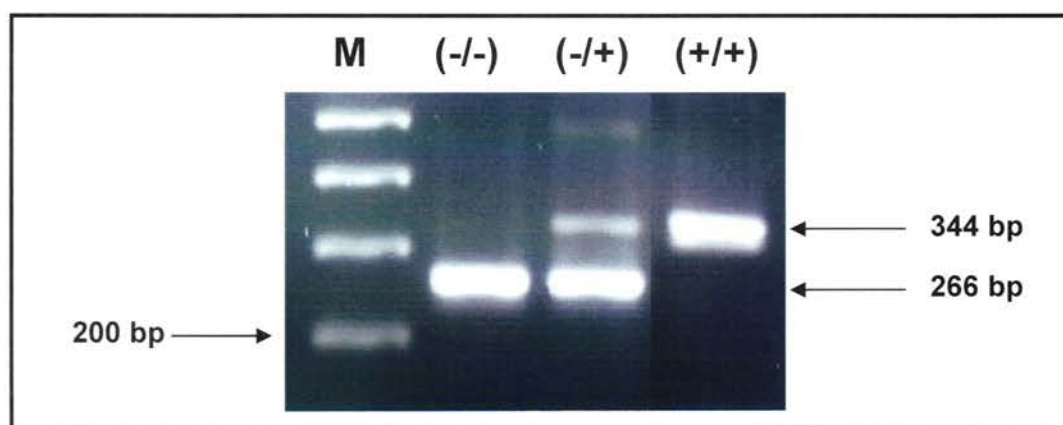


Figura 7 - Visualização dos padrões de bandas para os genótipos de XPC PAT indicando a banda do alelo (-)(266 bp) e do alelo polimórfico (+ 83 AT) (349 bp). M= marcador de peso molecular de 100 bp.

4.2.2 XPC IV 11 -5 C/A

Como esperado, a presença do alelo adenina no sitio acceptor de splice do intron 11 cria sitio para o corte com enzima Fau I (Figura 8). Com relação a freqüência dos alelos, para controles estes valores ficam $p(C)=0,66$ e $q(A)=0,34$ enquanto nos casos tais freqüências se alteram para $p(C)=0,54$ e $q(A)=0,46$, havendo assim diferença estatística entre freqüência de casos e controles ($p=0,017$). A análise da relação do polimorfismo adenina com melanoma demonstrou que tanto os indivíduos heterozigotos quanto os homozigotos para adenina apresentam risco aumentado para este tipo de neoplasia (Tabela 3). Não houve desvio do HWE para a freqüência dos genótipos entre os valores observados e esperados ($p=0,75$).

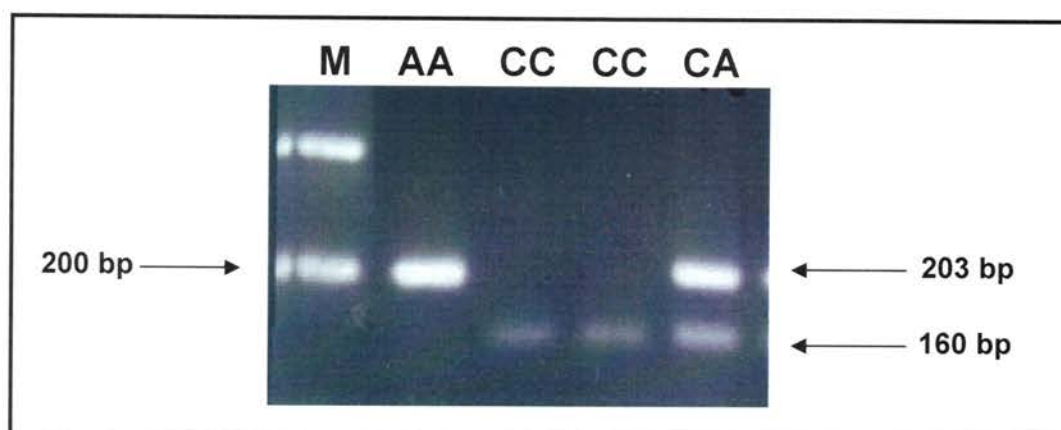


Figura 8 - Padrão de bandas dos genótipos de XPC IV11 -5 C/A. M= marcador de peso molecular de 100 bp.

4.2.3 XPC K939Q

Com relação a este polimorfismo de XPC, a confirmação do genótipo após digestão com enzima *Pvu II*, se deu com o padrão de bandas previamente discutido (Figura 9). A freqüência dos alelos foi para controles $p(K)=0,67$ e $q(Q)=0,33$ enquanto nos casos estes valores ficam $p(K)=0,56$

e $q(Q)=0,44$, demonstrando portanto uma diferença significativamente estatística entre casos e controles ($p=0,03$). Verificou-se que apenas a presença do genótipo QQ tinha associação significativa com o risco de desenvolvimento de melanoma (Tabela 3). A distribuição dos genótipos não desviou do HWE ($p=0,80$).

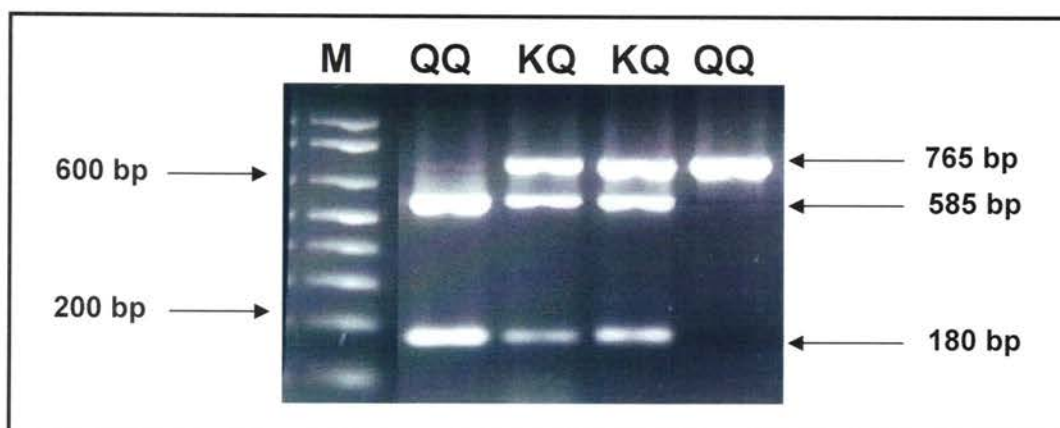


Figura 9 - Padrão de bandas dos genótipos de XPC K939Q. M= marcador de peso molecular de 100 bp.

4.2.4 XPG D1104H

Para este polimorfismo, um dado interessante tem sido observado. Os resultados comparando o risco relativo do genótipo His/His demonstraram efeito de proteção para o desenvolvimento de melanoma (Tabela 3). Contudo, a frequência deste genótipo em controles, $q(H)= 0,29$, comparando-se com os casos, $q(H)= 0,25$, não demonstrou ser diferente ($p=0,36$). Conseqüentemente, a frequência do alelo D está mais acentuada nos casos, $p(D)= 0,75$, do que nos controles, $p(D)= 0,71$. A visualização do padrão de restrição e a genotipagem dos alelos para XPG está representada na figura 10. Ao analisar se a distribuição dos genótipos obedecia ao HWE,

verificou-se, no entanto, que houve um significativo desvio no equilíbrio ($p=0,026$), mesmo sendo este considerado baixo.

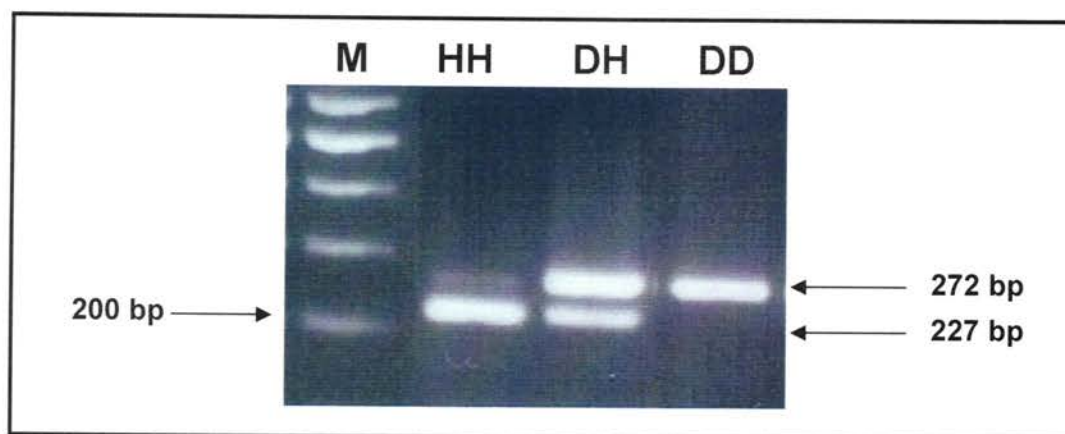


Figura 10 - Padrão de restrição dos genótipos dos alelos D e H de XPG. M= marcador de peso molecular de 100 bp.

4.2.5 OGG1 S326C

Para o polimorfismo existente no códon 326 de OGG1, no qual ocorre a troca de serina por cisteína, a frequência entre os alelos foi igual entre casos e controles, sendo $p(S)= 0,78$ e $q(C)= 0,22$, $p(S)= 0,78$ e $q(C)=0,22$ respectivamente, e conseqüentemente não havendo diferença entre casos e controles ($p=0,96$). Já com relação à distribuição dos genótipos, não houve desvio do HWE ($p=0,51$). Desta maneira, a variação alélica para este códon de OGG1 não demonstrou modificar o risco para o desenvolvimento de melanoma. A figura 11 demonstra o padrão dos alelos serina e cisteína.

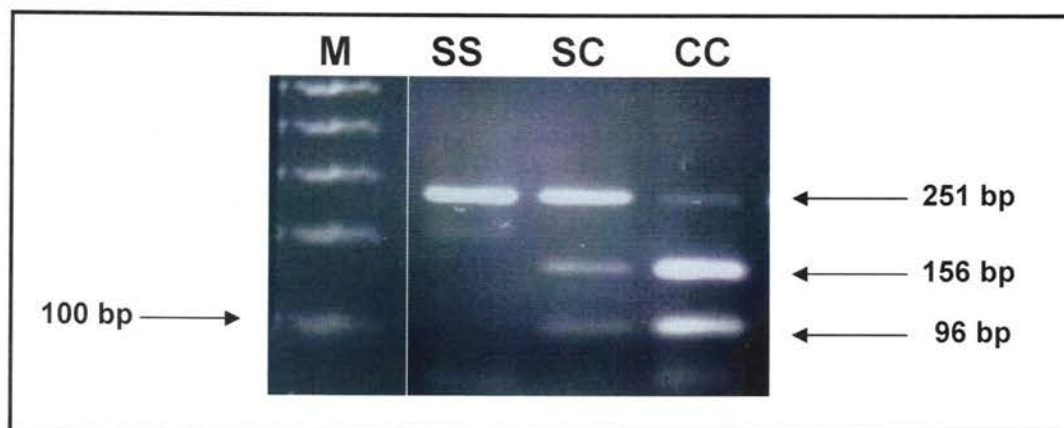


Figura 11 - Padrão de bandas dos genótipos para o códon 326 de OGG1. M= marcador de peso molecular de 100 bp.

4.2.6 XPA -4 G/A

A troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo -4 da região 5' UTR de XPA, permite que a restrição do produto de PCR gere uma banda de 109 bp, enquanto o alelo A um fragmento de 139 bp (Figura 12). A distribuição dos genótipos entre casos e controles não demonstrou nenhuma associação para risco de melanoma (Tabela 3). As frequências destes alelos ficaram distribuídas da seguinte maneira: $p(G) = 0,55$ e $q(A) = 0,45$ para controles e $p(G) = 0,52$ e $q(A) = 0,48$ nos casos, não havendo diferença estatística na frequência dos alelos entre casos e controles ($p=0,49$). Não houve desvio do HWE para esse polimorfismo na população controle ($p=0,83$). Independente do genótipo, a região amplificada já contém sítio de restrição para Msp I, ocasionando então o aparecimento de uma banda de 96 bp.

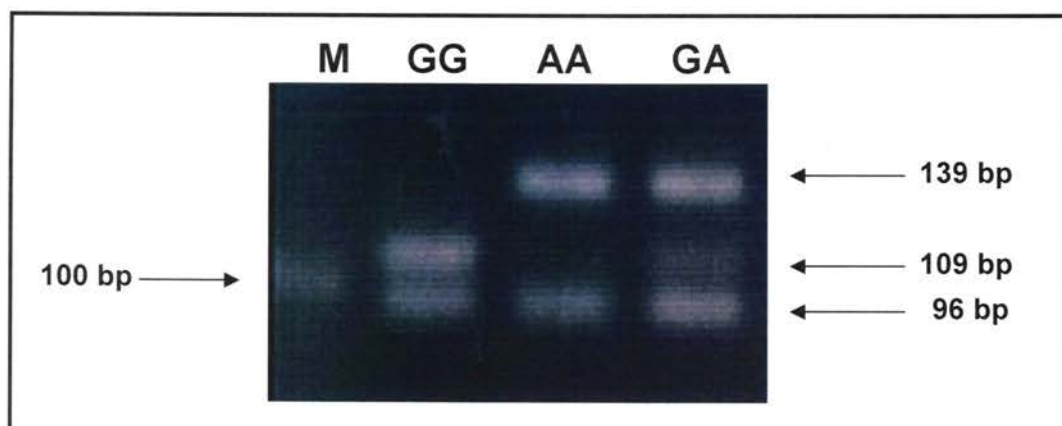


Figura 12 - Padrão de restrição dos genótipos do polimorfismo G/A no gene XPA. M= marcador de peso molecular de 100 bp.

4.2.7 ERCC1 N118N

Este polimorfismo, no qual a transição de uma citosina por timina não muda o aminoácido, mas o alelo timina cria sítio de restrição (figura 13). Os resultados não indicaram que o alelo variante (timina) apresentou associação positiva para risco aumentado de melanoma (Tabela 3). A distribuição das freqüências alélicas entre casos e controles não demonstrou diferença estatística ($p=0,43$), sendo estas de $p(C)=0,54$ e $q(T)=0,46$ para controles e de $p(C)=0,50$ e $q(T)=0,50$ nos casos. Quando analisado o HWE para a freqüência da distribuição dos genótipos, verificou-se que houve um desvio dos valores observados em relação ao esperado para a freqüência dos alelos ($p=0,028$), demonstrando portanto que há um desequilíbrio entre um dos alelos na população.

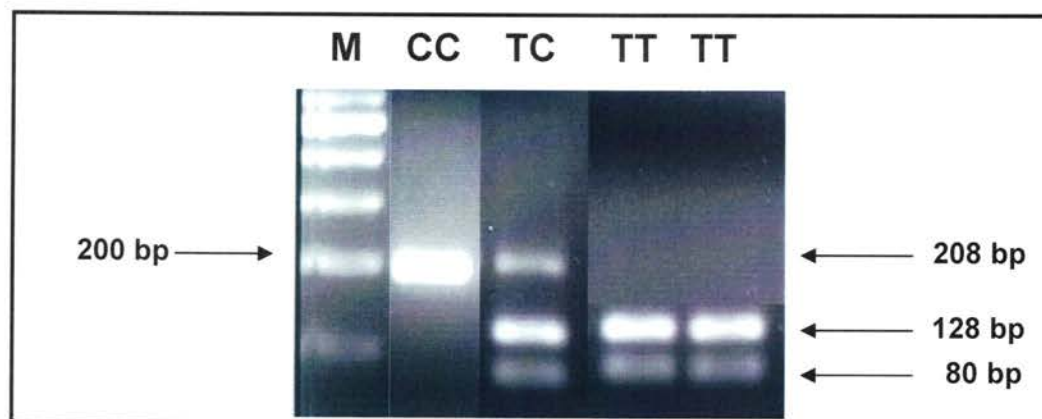


Figura 13 - Padrão de restrição de ERCC1 N118N, transição C para T. M= marcador de peso molecular de 100 bp.

4.2.8 SOD2 V16A

A inclusão da análise desta variante genética de SOD2 foi com o intuito de verificar se esse polimorfismo contribuiria para uma atividade funcional diferencial que pudesse contribuir com maior produção de espécies reativas de oxigênio, as quais potencialmente poderiam aumentar o número de mutações carcinogênicas. Contudo, quando analisada a distribuição dos genótipos de SOD2 entre casos e controles, não foi possível estabelecer uma correlação da presença deste polimorfismo com o risco de melanoma (Tabela 3). Quando analisado a frequência deste polimorfismo entre casos e controles, esta não se demonstrou diferente ($p=0,27$). A frequência alélica ficou distribuída da seguinte maneira: $p(V)=0,60$ e $q(A)=0,40$ entre controles e $p(V)=0,55$ e $q(A)=0,45$ para casos. Curiosamente, quando analisado o HWE da distribuição dos genótipos, verificou-se que este apresentou o resultado exato entre os valores observados e esperados ($p=1.0$), demonstrando haver perfeito equilíbrio dos genótipos na população. O

padrão de bandas referentes a cada genótipo de SOD2 V16A pode ser conferido na figura 14.

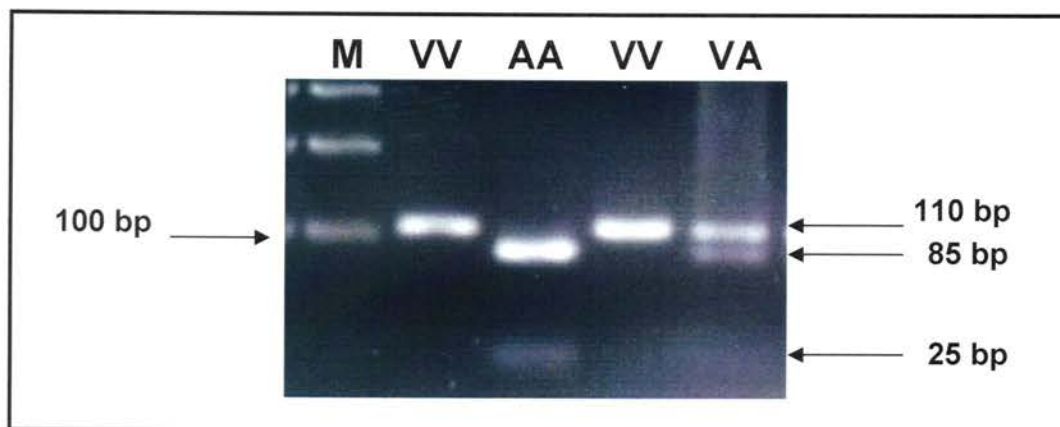


Figura 14 - Padrão dos três genótipos de SOD2 V16A. M= marcador de peso molecular de 100 bp.

4.3 COMBINAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE XPC E O RISCO DE MELANOMA

Como três dos oito polimorfismos analisados estão localizados no mesmo gene, foi feita uma análise procurando verificar como ocorre a distribuição dos genótipos no gene XPC dentro da casuística presente. O resultado das combinações alélicas para XPC pode ser observado com maior detalhe nas tabelas 4a para a casuística total e tabela 4b para apenas os controles.

O que pode ser notado desta análise é a segregação dependente que estes três polimorfismos exibem, fato demonstrado pelo maior número de casos concordantes quanto à combinação dos três alelos. Fica evidente

nestes dados que o haplótipo (combinação dos genótipos) no gene de XPC apresenta as seguintes seqüências: PAT –, Citosina, Lys enquanto num outro gene de XPC esta seqüência fica determinada pela presença dos alelos variantes, no caso PAT+, Adenina e Gln. Como este *locus* contendo os polimorfismos apresenta um tamanho de cerca 9 kb, a probabilidade de ocorrência de *crossing-over* nesta região é diminuída, como observada pela menor freqüência de haplótipos discordantes, o que leva a um padrão de herança conjunta dos alelos.

Mesmo sendo baixo o número de troca entre cromátides dentro deste *locus*, nota-se que ocorrem em maior proporção entre os polimorfismos PAT e C/A, o qual estão separados em cerca de 6,2 kb, ao invés dos polimorfismos C/A e Lys/Gln no exon 15, o qual distam apenas 2,8 kb.

Com relação à freqüência dos haplótipos, temos que o *locus* PAT-, Citosina, Lys apresenta freqüência de 51%, enquanto o *locus* polimórfico (PAT+, A, Gln) 31%. Os demais 18% distribuídos entre os diferentes genótipos. Para os controles, a freqüência de haplótipos concordantes ficou em 83% e de discordantes, 17%. Dentre os haplótipos concordantes, a freqüência para o haplótipo “selvagem” (PAT –, C, Lys) foi de 0,69, enquanto para o haplótipo variante (PAT+, A, Gln) foi de 0,31. Já para os casos, 82% apresentaram haplótipo concordante enquanto 18% foram discordantes. Com relação à freqüência dos haplótipos, observou-se $p(\text{pat} -, C, \text{Lys})=0,54$ e $q(\text{pat} +, A, \text{Gln})=0,46$, valores que também diferiram estatisticamente da freqüência observada para os controles ($p=0,005$). A distribuição dos haplótipos não apresentou desvio do HWE ($p=0,51$).

Por fim, verificou-se qual seria o risco ao desenvolvimento de melanoma atribuído aos haplótipos de XPC. A análise demonstrou que 77 controles e 47 casos apresentavam o haplótipo “dominante” (PAT(-/-), C/C e K/K) enquanto 63 controles e 76 casos apresentavam o haplótipo heterozigoto (PAT(+/-), C/A,e K/Q) o que levou a um *odds ratio* (OR) de 1,97 (1,20 – 3,23 95%CI, *p*= 0,0065). No caso de possuírem o haplótipo “recessivo” (PAT(+/+), AA, QQ), 16 controles e 33 casos, o risco de desenvolvimento de melanoma apresenta um OR de 3,37 (1,68 – 6,79 95%CI, *p*= 0,0005). Quando se analisou os genótipos discordantes para o haplótipo de XPC, no intuito de verificar se estes também estariam relacionados a um maior risco de desenvolvimento de melanoma, observou-se que estes não contribuíram significativamente para tal associação (OR 1,79; 0,98 – 3,27 95% CI, *p*=0,056).

Tabela 4 – (a) Distribuição dos genótipos de XPC dentre a casuística.

		K939Q		
poli AT	IV11 - 5	KK	KQ	QQ
(-/-)	CC	124 (33%)	5 (1,5%)	1 (0,3%)
(-/-)	CA	9 (2%)	16 (4%)	1 (0,3%)
(-/-)	AA	0	4 (1%)	1 (0,3%)
(+/-)	CC	5 (1,5%)	3 (0,8%)	0
(+/-)	CA	4 (1%)	139 (37%)	2 (0,5%)
(+/-)	AA	1 (0,3%)	1 (0,3%)	1 (0,3%)
(+/+)	CC	1 (0,3%)	0	0
(+/+)	CA	0	0	0
(+/+)	AA	1 (0,3%)	4 (1%)	49 (13%)

Tabela 4 - (b) Distribuição dos genótipos de XPC dentre os controles.

poli AT	IV11 - 5	K939Q		
		KK	KQ	QQ
(-/-)	CC	77(43%)	1 (0,5%)	0
(-/-)	CA	2 (1%)	12 (6%)	0
(-/-)	AA	0	1 (0,5%)	1 (0,5%)
(+/-)	CC	2 (1%)	1 (0,5%)	0
(+/-)	CA	1 (0,5%)	63 (33%)	1 (0,5%)
(+/-)	AA	1 (0,5%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)
(+/+)	CC	1 (0,5%)	0	0
(+/+)	CA	0	0	0
(+/+)	AA	0	1 (0,5%)	16 (8%)

4.4 ADOÇÃO DE MODELOS GENÉTICOS E RISCO DE MELANOMA

Para melhor entender o papel dos heterozigotos e sua contribuição para o risco de melanoma, adotou-se dois modelos genéticos onde se pudesse avaliar se os heterozigotos teriam efeito de proteção, devido à presença de um alelo “selvagem”, ou se teriam efeito de risco, conferido pela presença do alelo polimórfico. Para o caso do heterozigoto conferir proteção, nos adotamos um modelo denominado de “modelo dominante”, assumindo que a presença do alelo selvagem já confere efeito de proteção, assemelhando-se ao fenômeno de dominância genética. Para considerar esse modelo, assumiu-se que os homozigotos para o polimorfismo de determinado gene seria comparado à soma do número de heterozigotos mais homozigotos para o alelo dominante (ex: AA + Aa versus aa). De maneira contrária, assumindo um “modelo recessivo”, este modelo genético

assumiria que os heterozigotos já possuem efeito de risco, pois a presença de um único alelo variante já poderia de alguma maneira, conferir desvantagem com relação à eficiência completa da função conferida pelo homozigoto *selvagem*, assemelhando-se a um efeito de haploinsuficiência ou mesmo de dominante-negativo. Neste modelo a soma dos indivíduos homozigotos variantes mais heterozigotos seria comparada, por meio do risco relativo (OR), com os indivíduos homozigotos dominantes (AA versus Aa + aa). A comparação foi realizada entre casos e controles, e os valores foram representados pelos valores de (OR) e pelo intervalo de 95% de confiança (Tabela 5). Os resultados demonstram que para os polimorfismos de XPC, ambos modelos demonstram associação quanto ao risco de melanoma. No entanto, ao se comparar os resultados entre os dois modelos, é possível perceber a diminuição no intervalo de confiança no modelo recessivo, o que reforçaria a hipótese de que este modelo seria o mais adequado. Já a significância do modelo dominante poderia evidenciar a forte influência que os homozigotos polimórficos exercem sobre o risco de melanoma, onde mesmo alocando os heterozigotos como fatores de proteção, o risco continuaria significativa. Para o haplótipo de XPC, o mesmo pode ser evidenciado.

Já para XPG, apenas o modelo dominante demonstrou haver significância para melanoma. Neste caso, verifica-se que apenas o genótipo His/His apresenta o efeito de proteção, não sendo esse efeito associado à presença de apenas um alelo His. No modelo recessivo, alocando o genótipo de risco (Asp/His) junto com o genótipo His/His de proteção, acaba-

se anulando o efeito de proteção. Para os demais polimorfismos não houve qualquer relação independente do modelo adotado.

Tabela 5 - Modelos genéticos e risco de desenvolvimento de melanoma.

SNP	Dominante - OR (95% CI)	p	Recessivo - OR (95% CI)	p
XPC PAT	2,17 (1,23 - 3,84)	0,0067	2,02 (1,33 - 3,06)	0,0008
XPC K939Q	2,08 (1,16 - 3,74)	0,012	1,99 (1,30 - 3,05)	0,0013
XPC IV C/A	1,99 (1,13 - 3,51)	0,015	1,99 (1,30 - 3,05)	0,0013
XPG D1104H	0,41 (0,19 - 0,90)	0,02	0,95 (0,63 - 1,42)	0,8
OGG1 S326C	0,89 (0,36 - 2,14)	0,43	1,04 (0,68 - 1,57)	0,55
XPA G/A	1,26 (0,77 - 2,05)	0,41	1,13 (0,72 - 1,76)	0,23
ERCC1 N118N	1,18 (0,75 - 1,87)	0,29	1,31 (0,84 - 2,03)	0,17
SOD2 V16A	1,13 (0,81 - 1,58)	0,15	1,33 (0,86 - 2,04)	0,22
XPC haplótipo	2,34 (1,23 - 4,47)	0,0082	2,26 (1,42 - 3,59)	0,0005

4.5 COMBINAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS E RISCO DE MELANOMA

O passo seguinte na análise da relação dos polimorfismos no risco de melanoma, seria de avaliar se a combinação de genótipos entre os polimorfismos analisados poderia conferir risco para o desenvolvimento de melanoma. Diferentes combinações foram analisadas, contudo as únicas combinações que mostraram algum risco foram: combinações de XPC PAT/XPG, XPC K939Q/XPG, XPC IV11/XPG e XPC haplótipo/XPG (Tabela 6). Para a combinação XPC PAT/ERCC1 foi assumido que os genótipos de proteção seriam PAT -/- e CC e de risco seriam PAT +/+ e TT. Já com relação à combinação de genótipos de XPC e XPG, baseando-se nos resultados obtidos pelos modelos genéticos (Tabela 5), assumiu-se que os genótipos que conferiam proteção seriam os homozigotos selvagem de XPC

mais o genótipo HH de XPG (que demonstrou efeito de proteção) e de risco seriam a combinação de heterozigotos e homozigotos variantes de XPC e heterozigotos e homozigotos selvagem de XPG. Para os demais tipos de combinação de polimorfismos não houve diferença entre casos e controles.

Tabela 6 - Combinação de polimorfismos e o risco de melanoma. Para XPC haplótipo (wt) significa o genótipo selvagem PAT-/-, C/C, Lys/Lys; (ht) heterozigotos PAT-/-+, C/A, Lys/Gln, (var) haplótipo variante PAT+/+, A/A, Gln/Gln.

genes/SNPs	Combinações	OR (95% CI)	p
XPC PAT/XPG	(-/-)(HH) versus (+/-)(+/+)(DH)(DD)	4,39 (1,37 - 14,1)	0,0075
XPC 939/XPG	(KK)(HH) versus (KQ)(QQ)(DH)(DD)	3,19 (1,08 - 9,37)	0,027
XPC IV11/XPG	(CC)(HH) versus (CA)(AA)(DH)(HH)	4,14 (1,29 - 13,27)	0,01
XPC haplótipo/XPG	(wt)(HH) versus (ht)(var)(DH)(HH)	8,47 (2,29 - 31,29)	0,0002

4.6 CORRELAÇÃO ENTRE FATORES GENÉTICOS, SEXO E IDADE NO RISCO DE MELANOMA

O passo seguinte foi a análise dos resultados dos polimorfismos em relação a idade, sexo e idade/sexo. Para análise de cálculo, o critério faixa etária foi dividido em dois grupos: menores de cinquenta anos e maiores (e iguais) de 50 anos, conforme descrito para análise das características populacionais da casuística. A escolha da idade de cinquenta anos foi decorrente de esta ser a idade tida como início do período de menopausa (entre as mulheres). Isto porque esse período corresponde a modificações hormonais importantes, as quais poderiam atuar como fatores associados ao desenvolvimento de melanoma. A análise também foi realizada adotando-se os três modelos genéticos descritos, sendo o modelo dominante e recessivo,

além também do modelo de homozigoto polimórfico *versus* homozigoto “selvagem” (AA vs aa). Os resultados podem ser visualizados na Tabela 7.

Nos polimorfismos ajustados por sexo, verificou-se uma grande predominância de resultados significantes para o sexo feminino, com exceção de XPA, onde efeito de risco só foi observado para indivíduos do sexo masculino. Nesta mesma categoria, sexo feminino, verificou-se efeito aumentado de risco de melanoma para polimorfismos em XPC, bem como para o haplótipo, e ERCC1 nos modelos recessivos, enquanto para XPG, o genótipo His/His, demonstrou efeito de proteção para um modelo dominante.

Quando categorizados por faixa etária, verifica-se que os polimorfismos de XPC conferem risco independente da idade, no entanto, XPG parece ter efeito de proteção apenas em indivíduos com idade maior que 50 anos.

Para a análise dos polimorfismos em correlação com sexo e idade, os resultados demonstraram, novamente com exceção de XPA, efeito significativo do papel das variantes genéticas nos genes de reparo de DNA no desenvolvimento de melanoma em indivíduos do sexo feminino e com idade igual ou superior a 50 anos. XPC e ERCC1 destacam-se por apresentarem efeito de risco em modelo recessivo, enquanto XPG demonstra novamente efeito de proteção no modelo dominante. Em todas as análises não houve qualquer tipo de significância para OGG1 e SOD2 (Tabela 7). O pequeno número de amostras não permitiu a análise da combinação dos polimorfismos em categorização com sexo e idade.

Tabela 7 - Análise do impacto dos polimorfismos nos genes de reparo quando categorizados por sexo, faixa etária e sexo/faixa etária.

	Faixa etária		Sexo	
	< 50	> 50	Masculino	Feminino
XPA	ns	ns	2,28 (1,08 - 4,8)(0,02)***	ns
XPC PAT	1,97 (1,02 - 4,62)(p=0,02)*	2,43 (1,26 - 4,67)(p=0,007)***	ns	5,79 (2,11 - 15,89)(p=0,0003)*
XPC IV11	2,68 (1,10 - 6,51)(p=0,02)*	2,14 (1,15 - 3,98)(p=0,01)***	ns	2,56 (1,39 - 4,69)(p=0,002)***
XPC 939Q	1,80 (1,00 - 3,25)(p=0,04)*	2,59 (1,00 - 6,75)(p=0,04)***	ns	2,11 (1,15 - 3,86)(p=0,01)***
XPG	ns	0,33 (0,10 - 1,04)(p=0,05)**	ns	0,15 (0,03 - 0,73)(p=0,0081)**
ERCC1	ns	ns	ns	2,45 (1,30 - 4,62)(p=0,004)***
OGG1	ns	ns	ns	ns
SOD2	ns	ns	ns	ns
XPC Haplo	2,68 (1,06 - 6,74)(p=0,03)*	2,77 (1,39 - 5,55)(p=0,0034)***	ns	2,61 (1,33 - 5,11)(p=0,004)***

	Faixa Etária X Sexo			
	< 50 Masculino		< 50 Feminino	
XPA	3,44 (1,31 - 9,04)(0,0096)**	> 50 Masculino	> 50 Feminino	
XPC PAT	ns	ns	ns	ns
XPC IV11	ns	ns	ns	3,98 (1,69 - 9,32)(p=0,001)***
XPC 939Q	ns	ns	ns	2,80 (1,20 - 6,54)(p=0,01)***
XPG	ns	ns	ns	2,12 (1,06 - 5,25)(p=0,04)***
ERCC1	ns	ns	ns	0,15 (0,03 - 0,73)(p=0,0081)**
OGG1	ns	ns	ns	2,72 (1,08 - 6,81)(p=0,03)***
SOD2	ns	ns	ns	ns
XPC Haplo	ns	ns	ns	3,56 (1,37 - 9,23)(p=0,007)***

A tabela ilustra a análise dos polimorfismos nos seis genes estudados. Os valores são representado em OR (95% CI)(p value). XPA (-4 G/A); XPC PAT (Poli AT -/+); XPC IV11 (-5 C/A); XPC K939Q; XPG (D1104H); ERCC1 (N118N - C/T); OGG1 (S326C); SOD2 (V16A); XPC Haplo (Haplótipos de XPC). * modelo genético AA vs aa; ** modelo genético de dominância (AA + Aa vs aa); *** modelo genético recessivo (AA vs Aa + aa); ns = não significativo

4.7 ANÁLISE *IN SILICO* DA PREDIÇÃO DE IMPACTO DE POLIMORFISMOS COM TROCA DE AMINOÁCIDOS

A utilização de algoritmos de predição de impacto de troca de aminoácidos teve como objetivo obter algum tipo de informação a respeito do provável efeito que o polimorfismo poderia causar na proteína, possibilitando com essa informação bases para discussão dos resultados bem como possibilidades de estudos mais funcionais. Primeiramente, a análise da troca de Asp por His no códon 1104 de XPG demonstrou ser uma troca possivelmente danosa (Polyphen-PSIC score de 1,628), enquanto a predição feita por SIFT também assinalou um troca dita como intolerante (score 0,00). Contudo, a predição por SIFT teve uma baixa confiança devido ao pequeno número de alinhamentos utilizados.

Para a troca de Ser por Cys no códon 326 de OGG1, tal polimorfismo foi previsto como uma alteração do tipo “borderline” por ambos algoritmos (Polyphen-PSIC score de 1,225 e SIFT score de 0,18). Para SOD2 Val16Ala, ambos algoritmos demonstraram que essa variação é benigna e que provavelmente não causaria alterações importantes na função protéica (Polyphen-PSIC score de 0,316 e SIFT score de 0,83). Por fim, a análise da troca de Lys por Gln em XPC demonstrou que tal alteração foi predita de ser possivelmente danosa (Polyphen-PSIC score de 1,618) e intolerável segundo SIFT score (0,00). Porém, a exemplo de XPG o resultado obtido por SIFT tem baixo valor de confiança devido ao baixo número de comparações.

4.8 ANÁLISE *IN SILICO* DO IMPACTO DOS POLIMORFISMOS NAS REGIÕES INTRÔNICAS DE XPC

Com relação a análise do impacto dos polimorfismos intrônicos de XPC, primeiramente se optou por revalidar os dados obtidos por KHAN et al. (2002). Os dados mostrados pelo trabalho citado demonstraram que a substituição de C por A no sítio acceptor de splicing do intron 11 diminui o conteúdo informacional deste sítio (score), o qual é de grande importância na reconhecimento da maquinaria de splicing para o correto processamento de introns e exons. Como o algoritmo utilizado baseia-se na utilização de sequências consenso de sítios aceptores publicados, a idéia da revalidação da informação consistia numa eventual atualização dos dados utilizados pelo algoritmo de maneira que pudessem indicar uma mudança nos valores previamente publicados. No entanto, da mesma maneira que apresentado por KHAN et al. (2002) o polimorfismo no sitio de splicing diminui o score deste sitio de 7.5 para 5.1. Portanto mesmo com a atualização de dados a cerca de sitios aceptores, não houve mudança no critério que avaliou o conteúdo informacional deste polimorfismo.

Em seguida, buscou-se analisar o possível impacto da inserção da região de poli AT no intron 9 de XPC. Primeiramente, analisou-se se esta inserção poderia de alguma forma alterar ou modificar a localização do *branch site*, importante sítio de ligação da maquinaria do spliceossomo. No entanto, não houve qualquer tipo de alteração quanto a essa região. O próximo passo foi averiguar se a inserção do poli AT alteraria algum putativo

sítio de elementos reguladores de splicing, porém tal análise não demonstrou nenhuma possível alteração destes elementos.

Por fim, uma casual comparação entre a sequência intrônica completa dos alelos PAT – e PAT + (a partir das sequencias depositadas no Gene Bank) revelou a presença de uma deleção de quatro pares de bases na sequência polimórfica (Figura 15), próxima ao começo do exon 10 de XPC. Posterior análise desta deleção, demonstrou que esta perda elimina três putativos *motifs* de ligação de elementos reguladores de splicing do tipo silenciadores (Figura 15). Tais *motifs* putativos foram identificados como elementos reconhecidos por proteínas regulatórias de splicing das famílias das proteínas SR (splicing regulators), SF2/ASF e SC35, as quais são fatores essenciais para o correto mecanismo de splicing de pré-mRNAs (POZZOLI e SIRONI 2005).

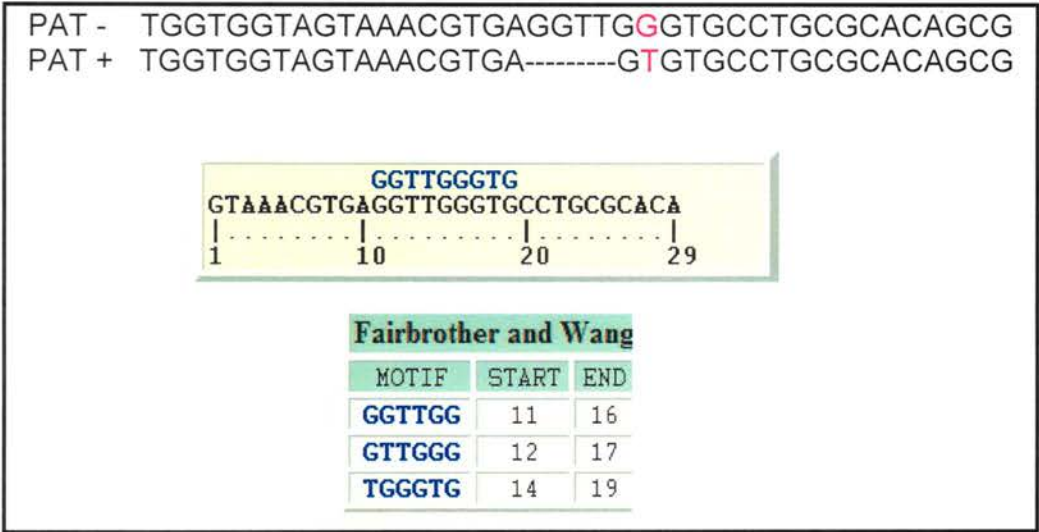


Figura 15 - Alinhamento das sequencias dos introns 9 dos alelos PAT – e PAT + de XPC. A figura demonstra a deleção de bases que ocorre no alelo PAT +, além de uma alteração de G para T (em vermelho).

4.9 META-ANÁLISE

Por fim, os resultados obtidos com XPG D1104H e XPC K939Q foram analisados conjuntamente com resultados publicados sobre estes polimorfismos e melanoma numa meta-análise, o que permitiria um melhor entendimento dos resultados, principalmente em relação a demais fatores envolvidos como por exemplo a latitude, bem como a relação destes polimorfismos e melanoma.

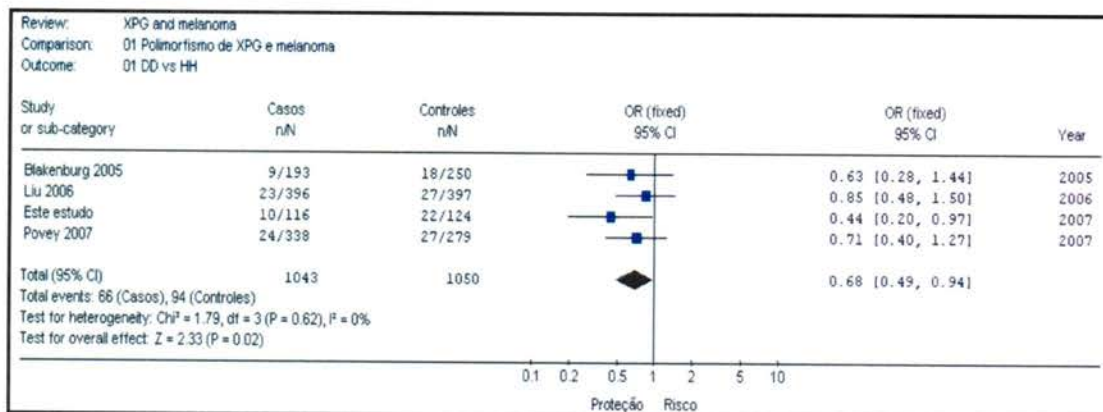
Os estudos relacionados para essa meta-análise foram para XPC K939Q: BLANKENBURG et al. (2005a) e LI et al. (2006b). Já para XPG os artigos relacionados foram BLANKENBURG et al. (2005b), LI et al. (2006) e POVEY et al. (2007). Para análise dos genótipos foi adotado os três modelos genéticos já abordados neste trabalho (DD vs HH; DD + DH vs HH; DD vs DH + HH para XPG) (Figura 15) (KK vs QQ, KK + KQ vs QQ; KK vs KQ vs QQ para XPC) (Figura 16).

Primeiramente os resultados para XPG, demonstraram que realmente o alelo His conferia efeito de proteção para o desenvolvimento de melanoma seja quando comparava-se o efeito do genótipo HH em relação ao genótipo DD (OR 0,68; 0,49-0,94 95% CI; $p=0,02$) ou quando adotava-se o modelo dominante (OR 0,69; 0,50-0,95 95% CI; $p=0,02$). Já para o modelo recessivo, não houve diferença significativa (OR 0,89; 0,78-1,03 95% CI; $p=0,12$), sugerindo que o genótipo DH teria efeito de risco atribuído ao alelo D, sendo que a colocação deste alelo junto ao genótipo HH, culmina com a “quebra” do efeito protetivo de HH. Curiosamente, os resultados não

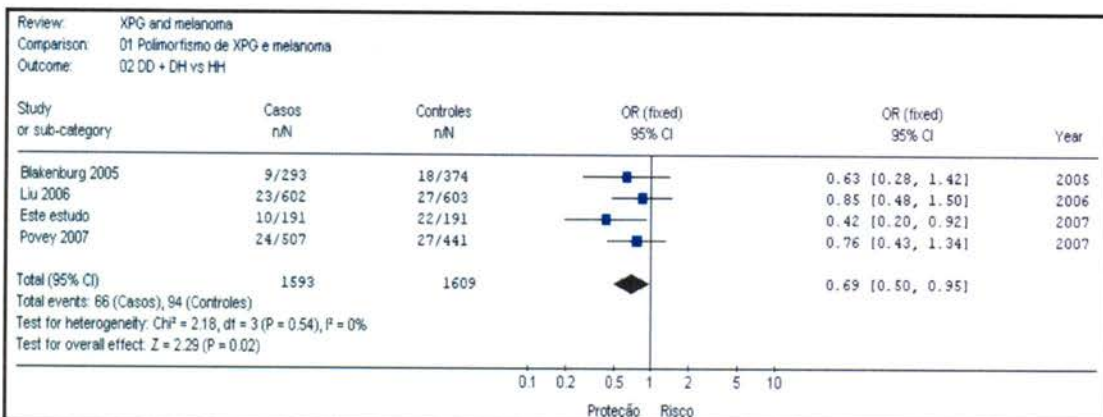
demonstraram nenhum efeito significativo de heterogeneidade, reforçando portanto que a tendência de efeito de proteção do alelo His também foi relatada em demais artigos (Figura 16). Para essa meta-análise, não houve desvio do HWE ($p=0,19$).

Já para XPC K939Q os resultados foram divergentes. Tanto para a análise de QQ vs KK (OR 1,24; 0,97-1,59 95% CI; $p=0,09$) quanto o modelo recessivo (OR 1,05, 0,88-1,24 95% CI, $p=0,61$) não houve risco significativo. Além disso, ambas análises demonstraram alto valor de heterogeneidade entre os estudos ($p<0,005$). No entanto, o modelo dominante (KK + KQ vs QQ) demonstrou haver um efeito marginal para o risco de melanoma (OR 1,25; 1,00-1,57 95% CI, $p=0,05$; teste de heterogeneidade de $p=0,08$). Tais resultados sugerem que algum fator adicional pode estar envolvido na maior susceptibilidade para o desenvolvimento de melanoma causado pelo genótipo QQ de XPC 939. Tal fator adicional pode conferir efeito de risco dos heterozigotos na população aqui apresentada (Tabela 2), e que a ausência deste fator eleva os heterozigotos a um efeito de proteção (Figura 17). Não houve também para XPC desvio do HWE ($p=0,52$).

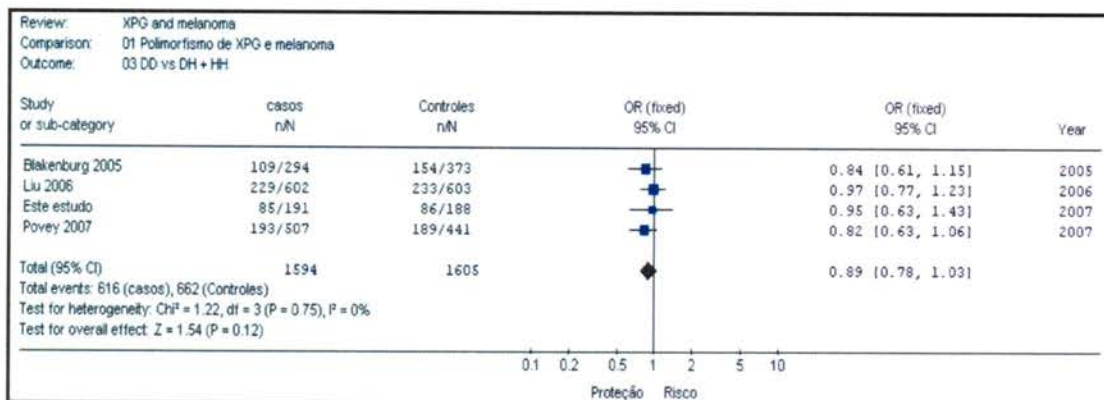
A)



B)



C)

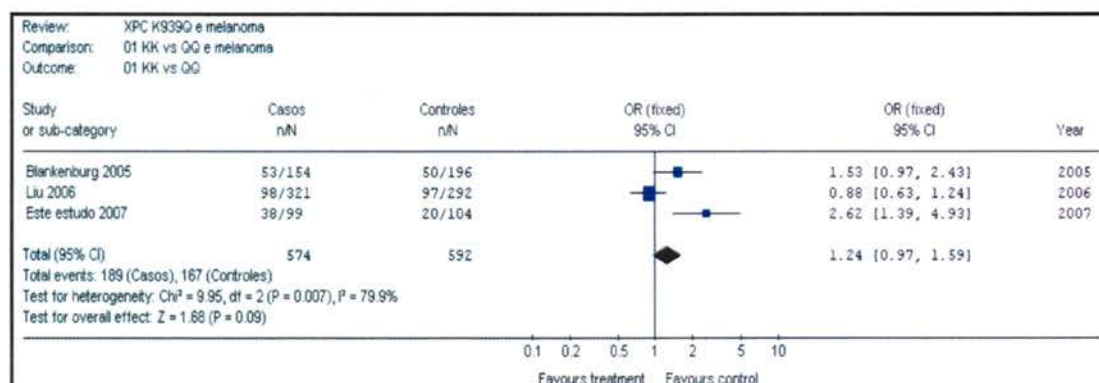


Legenda: (A) Meta-análise para XPG D1104H comparando-se DD vs HH. (B) Meta-análise para XPG D1104H adotando o modelo genético dominante (DD + DH vs HH). (C) Meta-análise para XPG D1104H adotando o modelo genético recessivo (DD vs DH + HH). As figuras demonstram os estudos analisados, baseando-se por autores e ano de publicação, OR e 95% CI, teste para heterogeneidade e teste de efeito total. N significa o número total de amostras, n significa o número de indivíduos com o(s) genótipo(s) assumidos a serem de risco.

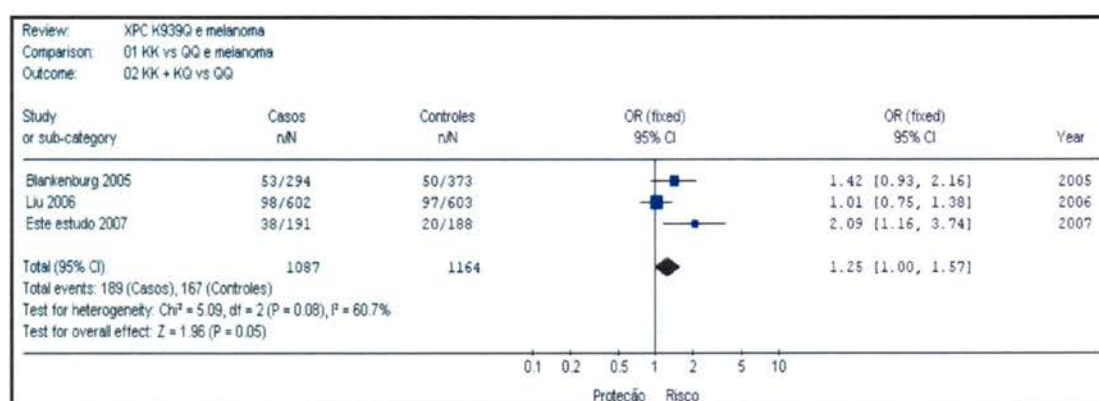
Figura 16 - Forest Plot para os resultados da meta-análise para XPG D1104H.

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

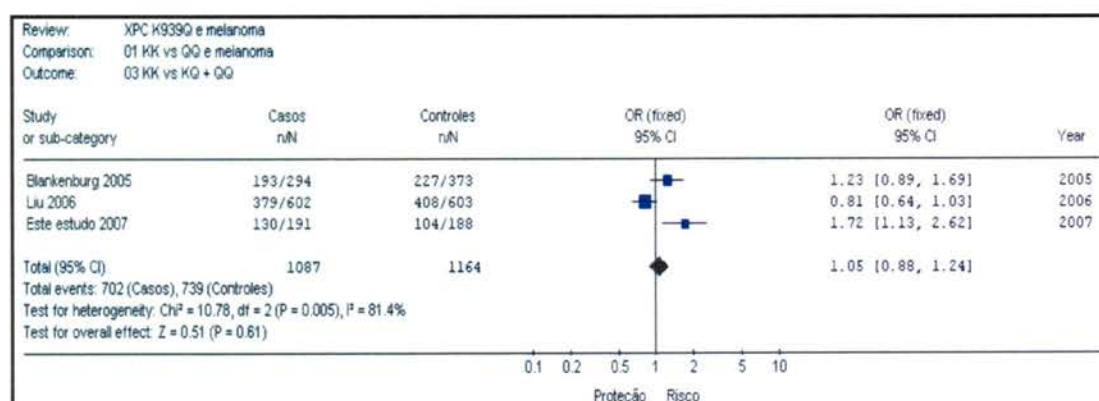
A)



B)



C)



Legenda: (A) Meta-análise para XPC K939Q comparando-se KK vs QQ. (B) Meta-análise para XPC K939Q adotando o modelo genético dominante (KK + KQ vs QQ). (C) Meta-análise para XPC K939Q adotando o modelo genético recessivo (KK vs KQ + QQ). As figuras demonstram os estudos analisados, baseando-se por autores e ano de publicação, OR e 95% CI, teste para heterogeneidade e teste de efeito total. N significa o número total de amostras, n significa o número de indivíduos com o(s) genótipo(s) assumidos a serem de risco.

Figura 17 - Forest Plot para os resultados da meta-análise para XPC K939Q

5 DISCUSSÃO

Uma crescente tendência na literatura científica tem indicado que diversos genes de baixa-penetrância estariam relacionados com a patogênese de cancer, cada um destes contribuindo para a genética total da susceptibilidade a doenças neoplásicas, e que variações genéticas (polimorfismos) estariam envolvidos nestes genes de baixa penetrância (MOHRENWEISER et al. 2003). Uma vez que existe essa crescente evidência da participação destes genes de baixa penetrância, quais então seriam estes genes e qual sua importância?

O desenvolvimento e progressão do câncer têm sido atribuídos a aquisição de capacidades que permitiriam o crescimento do tumor, desde auto-suficiência em fatores de crescimento até invasão tecidual e metástase (HANAHAN e WEINBERG 2000), sendo que evidências sugerem que a aquisição destas características é diretamente, ou indiretamente, devido a alterações causadas por mutações ao longo do genoma. Consequentemente, a aquisição de mutações tem sido associada a um "fenótipo mutador" das células (LOEB 2001). Nesse fenótipo, alterações de funções em genes que agem diretamente na manutenção da estabilidade genética, como genes de reparo, possibilitariam um maior acúmulo de mutações numa célula, potencializando a chance de que importantes vias carcinogênicas sejam desreguladas e dêem origem a um tumor. Bons exemplos de fenótipos mutadores e sua relação com o câncer vêm da alta

incidência de tumores em indivíduos com mutações germinativas em alguns importantes genes. Mutações em BRCA1 e 2 para câncer de mama, em genes de reparo de bases mal-emparelhadas (*MMR-mismatch repair*) no caso do câncer de cólon hereditário, ou mesmo no reparo por excisão de nucleotídeos (NER) que caracterizam a síndrome de Xeroderma Pigmentosum onde indivíduos possuem cerca de 1000 vezes mais chance de desenvolver câncer de pele, reforçam tal hipótese de um fenótipo mutador. No entanto, se apenas 5% dos casos de tumores são devidos a mutações herdadas em genes de reparo, a hipótese da participação destes genes na gênese dos demais 95% dos tumores cairia em algum evento que contribuísse para uma atividade menor de reparo. Atividade esta que não completaria um quadro de síndrome genética, mas que frente a certos insultos genéticos poderia facilitar o acúmulo de mutações.

Desta forma, este possível evento poderia ser atribuído justamente a variações genéticas existentes em genes de reparo, classificando-os então como os genes de baixa penetrância associados ao desenvolvimento de câncer, este último sendo decorrente do acúmulo de mutações ocasionadas pela atividade diferencial destas variações. Com o intuito de então verificar a importância destes genes de baixa penetrância na susceptibilidade a melanoma, conduziu-se um estudo de caso-controle buscando avaliar se variações genéticas, ou seja, polimorfismos, nos genes de reparo estariam associados ao desenvolvimento de melanoma.

A escolha dos genes se deu basicamente devido a natureza da carcinogênese dos melanócitos. O aparecimento de melanoma tem sido