

**EVOLUÇÃO CLÍNICA DO MELANOMA CUTÂNEO EM
PACIENTES PORTADORES DE POLIMORFISMOS
SELECIONADOS EM GENES DE REPARO POR
EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEO**

MARIANE CAMPAGNARI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Mestre em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. João Pedreira Duprat Neto

Co-Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Campagnari, Mariane

**Evolução clínica do melanoma cutâneo em pacientes portadores de
polimorfismos selecionados em genes de reparo por excisão de nucleotídeo /**

Mariane Campagnari – São Paulo, 2013.

87p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: João Pedreira Duprat Neto

Descritores: 1. MELANOMA. 2. NEOPLASIAS CUTÂNEAS. 3. REPARO
DO DNA. 4. POLIMORFISMO GENÉTICO.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família: meus pais, Ivani e João Carlos; meu marido, Otavio; minha irmã, Francine; meu cunhado, Anderson e meus sobrinhos, João e Enrico. São vocês que me dão suporte nas horas difíceis e que estão presentes nos momentos mais felizes. Agradeço a Deus por fazer parte desta família e por tê-los sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr João Duprat, meu orientador e chefe, que acreditou em mim e me abriu portas em um momento difícil da minha vida profissional e me deu oportunidade de trabalhar com aquilo que eu realmente gosto. Agradeço também pela paciência e amizade que sempre demonstra quando necessito.

Ao Dr Roger, que me deu a oportunidade de fazer este trabalho e me ajudou a entender assuntos antes completamente ignorados por mim. Agradeço pelas idéias e opiniões que sempre foram fundamentais para o andamento deste estudo.

À Priscila Cirilo e Tatiane Furuya, que refizeram toda a análise estatística com paciência e maestria e na principal etapa deste trabalho, seguraram na minha mão e me ajudaram a escrever, revisando o texto incansavelmente e fazendo correções fundamentais. Poucas pessoas fariam por mim o que vocês fizeram. Serei sempre grata.

Ao meu pai, João Carlos Campagnari, meu exemplo de médico e ser humano, que sempre tem as palavras certas para cada momento, que sabe agir com serenidade e sabedoria nos momentos mais difíceis e que me compreende como ninguém.

À minha mãe, Ivani Campagnari, meu exemplo de mulher batalhadora e altruísta, a pessoa a quem recorro em qualquer situação, sempre disposta a ajudar e que me ajuda a ter fé. Você é o porto seguro e o alicerce da nossa família.

Ao meu marido, Otavio Armani, que durante tantas noites e finais de semana me ajudou com gráficos, tabelas e formatações. Sem você, minha vida seria muito mais difícil. Agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos.

À minha irmã, Francine Campagnari Guilhem, cujos conhecimentos em genética foram muito importantes e me ajudaram a compreender melhor este estudo. Agradeço por ser uma grande amiga e por estar sempre ao meu lado.

Às minhas amigas, Juliana Areas, Juliana Casagrande e Juliana Machado, que percorreram comigo todo o caminho desta pós-graduação, me ajudando nos momentos difíceis e comemorando comigo os bons momentos.

A todos os outros membros do Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital A.C.Camargo: Adriana Mendes, André Molina, Bianca Costa Soares, Clélio Leonardo, Eduard Brechtbühl, Eduardo Bertolli, Elimar Gomes, Fernando Parro, Gisele Rezze, Gláucia Salere, Heidy Reis, Ivana Lameiras, Luciana Facure, Marcelo Inada, Marco Antônio de Oliveira e Nadja Alves. Todos são muito mais do que colegas de trabalho, são amigos que admiro e me ajudam a evoluir profissionalmente a cada dia.

Ao Dr Luiz Philipe Molina Vana agradeço pela parceria, companheirismo e ensinamentos.

Por fim, agradeço à Ana Kuninari, Vanuza de Oliveira e Luciana Pitombeira e à bibliotecária Suely Francisco, que exercem suas funções com seriedade, sempre dispostas a ajudar aos alunos.

RESUMO

Campagnari M. **Evolução clínica do melanoma cutâneo em pacientes portadores de polimorfismos selecionados em genes de reparo por excisão de nucleotídeo.** São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O Melanoma Cutâneo é a principal causa de morte por doenças de pele e a sua incidência está aumentando com o passar dos anos. Exposição à radiação ultravioleta (UV) é classicamente associada como fator de risco para desenvolvimento de melanomas. A atuação da radiação UV está relacionada à sua ação genotóxica, quer seja ela direta (UV-A) ou indireta (UV-B). O agravo genotóxico indireto é reparado frequentemente pela chamada via de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER). Em um estudo prévio, realizado como uma parceria entre esta instituição e a Universidade de São Paulo, foram genotipados polimorfismos selecionados em genes de reparo por excisão de nucleotídeos em pacientes portadores de melanoma, incluindo pacientes do Hospital A.C. Camargo. Neste estudo atual, avaliamos o impacto destes polimorfismos nos pacientes, analisando a evolução clínica do melanoma. Foram avaliados 127 prontuários de pacientes do Hospital A.C. Camargo, portadores de melanoma cutâneo e não portadores de xeroderma pigmentoso, em sua maioria, diagnosticados entre 2004 e 2006, que foram genotipados no estudo prévio citado. Seis pacientes foram excluídos por falta de dados nos prontuários. Os resultados demonstraram que alelos raros do polimorfismo do *XPA* G/A, no modelo dicotomizado recessivo, foram relacionados ao aparecimento mais precoce do melanoma (45,55 anos $\pm$ 12,2). No modelo dicotomizado dominante deste polimorfismo, a presença do alelo raro foi relacionada ao crescimento vertical do tumor. O alelo raro também foi relacionado a fatores de pior prognóstico da doença como: índice de Breslow entre 1,5 e 4mm e a presença de ulceração. Para os polimorfismos do *XPC* PAT+ e C/A, o alelo raro não foi associado ao subtipo histológico extensivo superficial e no polimorfismo do *XPC* Lys939Gln, a presença do alelo raro foi relacionada a outros subtipos do melanoma, diferentes daquele mais comum, o extensivo superficial. Para o polimorfismo do *XPC* C/A, o alelo raro foi

relacionado ao IM=0, no modelo dicotomizado dominante. Para o polimorfismo *XPC* PAT+, o alelo raro foi relacionado a um estágio inicial da doença (I) ao diagnóstico, também no modelo dicotomizado dominante. Por outro lado, a presença dos alelos raros de *XPC* C/A e de *XPG* Asp1104His foi relacionada a um estadiamento mais avançado ao diagnóstico da doença (estádio III). A presença de pelo menos um alelo raro do polimorfismo *XPG* Asp1104His, foi associado à presença de melanoma em indivíduos do sexo masculino. A análise dos haplótipos do gene *XPC* (C/A, Lys939Gln e PAT+), demonstrou que há desequilíbrio de ligação e a presença do haplótipo CCA destes polimorfismos foi relacionada à presença de tumores de órgãos internos, enquanto a presença do haplótipo AAT foi relacionada à presença de regressão tumoral no melanoma. Os resultados demonstram que, a presença de polimorfismos em genes de reparo por excisão de nucleotídeos, pode estar associada a presença de fatores de pior prognóstico do melanoma como: Breslow maior que 1mm, crescimento vertical do tumor, presença de ulceração, idade mais precoce de aparecimento da doença e estádios mais avançados ao diagnóstico. Novos estudos sobre a associação destes polimorfismos e a evolução do melanoma devem ser realizados para confirmação destes resultados.

SUMMARY

Campagnari M. [**Clinic evolution of the cutaneous melanoma in patients with selected polymorphism in nucleotide excision repair genes**]. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The cutaneous melanoma is the main cause of death among skin cancers and its incidence is increasing along the years. The exposure to ultraviolet radiation (UV) is classically associated as a risk factor for the development of melanomas. The role of UV radiation is linked to its genotoxic action, which may cause direct (UV-A) or indirect (UV-B) damage to the DNA. An indirect damage is frequently repaired by the nucleotide excision repair pathway (NER). In a previous study, done as partnership between A.C. Camargo Hospital and Universidade de São Paulo (USP), selected polymorphisms in the nucleotide excision repair genes were genotyped in patients with melanoma, including patients from A.C. Camargo Hospital. In this present study, we evaluate the impact of these polymorphisms by analyzing the clinic evolution of the melanoma. One hundred twenty seven medical records of patients with melanoma and without xeroderma pigmentoso of the A.C. Camargo Hospital were analyzed, the majority of them was diagnosed between 2004 and 2006 and they had already been genotyped in the referred study. Six patients were excluded because of lack of information on the medical records. The results showed that the polymorphism *XPA* C/A, in the recessive dichotomized model, the rare allele was related to the diagnosis of the melanoma in an earlier age (45 ± 12.2). In the dominant dichotomized model of this polymorphism, the presence of the rare allele was related to a vertical growth of the tumor. The rare allele was also related to worse prognostic factors as: Breslow between 1.5 and 4mm and the presence of ulceration. For the polymorphisms in *XPC* PAT+ and C/A, the presence of the rare allele was not associated to the superficial spreading histologic subtype melanoma and for the *XPC* Lys939Gln, the presence of the rare allele was related to other histologic subtypes, different from the most common one - the superficial spreading melanoma. For the polymorphism *XPC* C/A, the rare allele was also related to

Mitotic Rate equals zero, in the dominant dichotomized model. For the polymorphism *XPC* PAT+, in the dominant dichotomized model, the rare allele was related to an initial stage (I) of the melanoma at the moment of the diagnosis. On the other hand, the presence of rare alleles of *XPC* C/A and *XPG* Asp1104His, was related to a stage III, at the moment of the diagnosis. The presence of at least one rare allele of the polymorphism *XPG* Asp1104His was associated to the presence of melanomas in males. The analysis of the haplotypes of the gene *XPC* (C/A, PAT+ and Lys939Gln), showed that there is linkage disequilibrium and the presence of the haplotype CCA was related to the diagnosis of internal organs tumors, while the presence of the haplotype AAT was related to the presence of tumor regression (in melanoma). Results showed that the presence of polymorphisms in the nucleotide excision repair genes may be associated to worse prognostic factors of the melanoma as: Breslow >1mm, presence of ulceration, disease appearance at an earlier age and more advanced stage at the moment of the diagnosis. More research about the association of these polymorphisms and melanoma evolution must be done to confirm these results.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Progressão do Melanoma Cutâneo.....	2
Figura 2	Curvas de sobrevida do AJCC comparando as diferentes categorias de “T” (curva A).....	7
Figura 3	Curvas de sobrevida de 7.635 pacientes com melanoma com metástase à distância.....	7
Figura 4	Esquema da via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER).....	11
Figura 5	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.....	22
Figura 6	Frequência de pacientes com melanoma segundo a espessura tumoral (Breslow).....	34
Figura 7	Gráfico demonstrando a frequência de pacientes com ou sem a presença de ulceração do melanoma.....	35
Figura 8	Gráfico mostrando as médias de idade para cada genótipo dos polimorfismos estudados. As barras de erro representam o desvio padrão.....	41
Figura 9	Gráfico mostrando as médias de idade para cada genótipo no Modelo Dicotomizado Dominante. As barras de erro representam o desvio-padrão.....	41

Figura 10	Gráfico mostrando as médias de idade para cada genótipo no Modelo Dicotomizado Recessivo. As barras de erro representam o desvio-padrão; * $p < 0,05$	42
Figura 11	Representação esquemática do programa <i>Haploview</i>	55
Figura 12	Esquema das funções do gene XPC.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência da localização anatômica dos melanomas.....	33
Tabela 2	Frequência do Índice Mitótico (IM).....	35
Tabela 3	Frequência do estadiamento dos pacientes ao diagnóstico.....	36
Tabela 4	Frequência do estado atual dos pacientes.....	37
Tabela 5	Número de indivíduos para cada genótipo, frequências genótípicas e alélicas e resultado do teste χ^2 (Equilíbrio de Hardy Weinberg).....	38
Tabela 6	Médias de idade $\pm$ desvio padrão, separadas por genótipos para os polimorfismos estudados.....	40
Tabela 7	Resultado da associação entre os genótipos do polimorfismo <i>XPA</i> G/A e Crescimento.....	44
Tabela 8	Resultado da associação entre os genótipos (Modelo Dicotomizado Dominante) do polimorfismo <i>XPA</i> G/A e Crescimento.....	44
Tabela 9	Resultado da associação entre os genótipos do polimorfismo <i>XPC</i> C/A e Índice Mitótico.....	45
Tabela 10	Resultado da associação entre os genótipos (Modelo Dicotomizado Dominante) do polimorfismo <i>XPC</i> C/A e Índice Mitótico.....	45
Tabela 11	Resultado da associação entre os genótipos (Modelo Dicotomizado Recessivo) do polimorfismo <i>XPC</i> C/A e Tipo Histológico.....	45
Tabela 12	Resultado da associação entre os genótipos (Modelo Dicotomizado Recessivo) do polimorfismo <i>XPC</i> PAT+ e Tipo Histológico.....	46

Tabela 13	Resultado da associação entre os genótipos do polimorfismo <i>XPC</i> PAT+ e Estadiamento.....	46
Tabela 14	Resultado da associação entre os genótipos (Modelo Dicotomizado Dominante) do polimorfismo <i>XPC</i> PAT+ e Estadiamento.....	47
Tabela 15	Resultado da associação entre os genótipos do polimorfismo <i>XPC</i> Lys939Gln e Tipo Histológico.....	47
Tabela 16	Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo <i>XPA</i> G/A e Breslow.....	49
Tabela 17	Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo <i>XPA</i> G/A e Crescimento.....	49
Tabela 18	Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo <i>XPA</i> G/A e Ulceração.....	49
Tabela 19	Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo <i>XPC</i> C/A e Localização.....	50
Tabela 20	Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo <i>XPC</i> C/A e Estadiamento.....	50
Tabela 21	Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo <i>XPC</i> PAT+ e Localização.....	51
Tabela 22	Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo <i>XPC</i> Lys939Gln e Tipo Histológico.....	51
Tabela 23	Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo <i>XPG</i> Asp1104His e Estadiamento.....	52
Tabela 24	Resultado da regressão logística – modelo de associação entre variáveis clínicas e os genótipos/alelos analisados.....	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação T.....	5
Quadro 2	Classificação N.....	5
Quadro 3	Classificação M.....	6
Quadro 4	Estadiamento.....	6
Quadro 5	Relação dos genes e dos respectivos SNPs.....	30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

λ	lambda
A	adenina
Ala	aminoácido alanina
Asn	aminoácido asparagina
Asp	aminoácido aspartato
BER	reparo por excisão de base
BRAF	do inglês, <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
C	citossina
CBC	carcinoma basocelular
CDK2	do inglês, <i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKN2A	do inglês, <i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CEC	carcinoma espinocelular
CSA	do inglês, <i>Cockaine Syndrome A</i>
CSB	do inglês, <i>Cockaine Syndrome B</i>
DHL	desidrogenase láctica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNA-PK	do inglês, <i>DNA-dependent protein kinase</i>
EDTA	ácido etilenoamino tetra-acético
ERCC1-5	do inglês, <i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency</i>
G	guanina
GGR	reparo global do genoma
Gln	aminoácido glutamina
HR	do inglês, <i>hazard ratio</i>
HR23B	do inglês, <i>human RAD23 homolog B</i>
His	aminoácido histidina
IC	intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kb	kilobase
Lys	aminoácido lisina

MDD	modelo dicotomizado dominante
MDR	modelo dicotomizado recessivo
NER	reparo por excisão de nucleotídeos
OR	do inglês, <i>odds ratio</i>
PCR	do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
Pro	prolina
q.s.p.	quantidade suficiente para
RFLP	do inglês, <i>restriction fragment length polymorphism</i>
RPA	do inglês, <i>replication protein A</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio
Ser	serina
SNP	do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>
T	timina
TCR	reparo acoplado à transcrição
TFIIH	do inglês, <i>general transcription fator II H</i>
TP53	do inglês, <i>tumor protein 53</i>
UTR	do inglês, <i>untranslated region</i>
UV	ultravioleta
UV-DDB	do inglês, <i>UV-damaged DNA binding</i>
UVA	ultravioleta tipo A
UVB	ultravioleta tipo B
Val	aminoácido valina
XP	xeroderma pigmentoso
XP A-G	grupos complementares <i>Xeroderma pigmentosum</i> A a G
XPV	variante dos grupos complementares <i>Xeroderma pigmentosum</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Melanoma Cutâneo.....	1
1.2	Estadiamento do Melanoma	4
1.3	Reparo de DNA por Excisão de Nucleotídeos (NER)	8
1.3.1	Polimorfismos em genes de reparo a danos em nucleotídeos e seu envolvimento em câncer	14
1.3.2	Polimorfismos em genes de reparo a danos e evolução clínica do melanoma.....	18
2	JUSTIFICATIVA.....	20
2.1	Seleção dos polimorfismos estudados.....	21
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos Específicos.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1	CrITÉrios de Inclusão e Exclusão	24
4.2	Análise dos Prontuários.....	25
4.3	Extração do DNA	26
4.4	Genotipagem dos Polimorfismos	27
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
6	RESULTADOS.....	33
6.1	Análise Descritiva dos Dados Clínicos	33
6.2	Análise dos Polimorfismos.....	37
6.3	Análise dos Polimorfismos Estudados <i>versus</i> Variáveis Clínicas	39
6.3.1	Comparação da média de idade entre os diferentes genótipos.....	39
6.4	Comparação da frequência dos genótipos entre os diferentes gêneros	42
6.5	Associação dos polimorfismos com dados de Evolução Clínica da Doença	43

6.5.1	<i>ERCCI C/T</i>	43
6.5.2	<i>XPA G/A</i>	43
6.5.3	<i>XPC C/A</i>	44
6.5.4	<i>XPC PAT+</i>	45
6.5.5	<i>XPC Lys939Gln</i>	47
6.5.6	<i>XPG His1104Asp</i>	47
6.6	Associação entre alelos e dados de evolução clínica da doença	48
6.6.1	<i>ERCCI C/T</i>	48
6.6.2	<i>XPA G/A</i>	48
6.6.3	<i>XPC C/A</i>	49
6.6.4	<i>XPC PAT+</i>	50
6.6.5	<i>XPC Lys939Gln</i>	51
6.6.6	<i>XPG Asp1104His</i>	52
6.7	Modelo de regressão logística univariada-análise de associação entre genótipos /alelos e variáveis clínicas.....	52
6.8	Análise da associação dos haplótipos do gene <i>XPC</i>	55
6.9	Associação entre Sobrevidas Global e Livre de Doença e os polimorfismos estudados	56
7	DISCUSSÃO	57
7.1	Análise Descritiva dos Dados Clínicos	60
7.2	Análise dos Polimorfismos Estudados <i>versus</i> Variáveis Clínicas	65
7.2.1	Comparação da média de idade entre os polimorfismos	65
7.2.2	Análise dos gêneros entre aos diferentes polimorfismos	65
7.3	Análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	66
7.4	Análise dos Polimorfismos e Dados de Evolução Clínica da Doença	67
7.5	Análise dos Alelos e Dados de Evolução Clínica da Doença	68
7.6	Análise da Regressão Logística Univariada associando genótipo/alelos <i>versus</i> variáveis clínicas	69
7.7	Análise da Associação dos Haplótipos do gene <i>XPC</i>	70
7.8	Análise da Sobrevida.....	73

8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	75
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ANEXOS

- Anexo 1** Modelo do protocolo utilizado para a análise dos prontuários dos pacientes.
- Anexo 2** Resultado gerado pelo software *Haploview* associando os haplótipos com as variáveis clínicas.
- Anexo 3** Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

1 INTRODUÇÃO

1.1 O MELANOMA CUTÂNEO

O melanoma cutâneo é um tumor de origem neuroectodérmica, formado a partir dos melanócitos. Estas células promovem a síntese de melanina, em resposta à exposição aos raios ultravioletas (UV). É a principal causa de morte por doenças de pele e corresponde a 4% dos tumores cutâneos (MILLER e MIHM 2006).

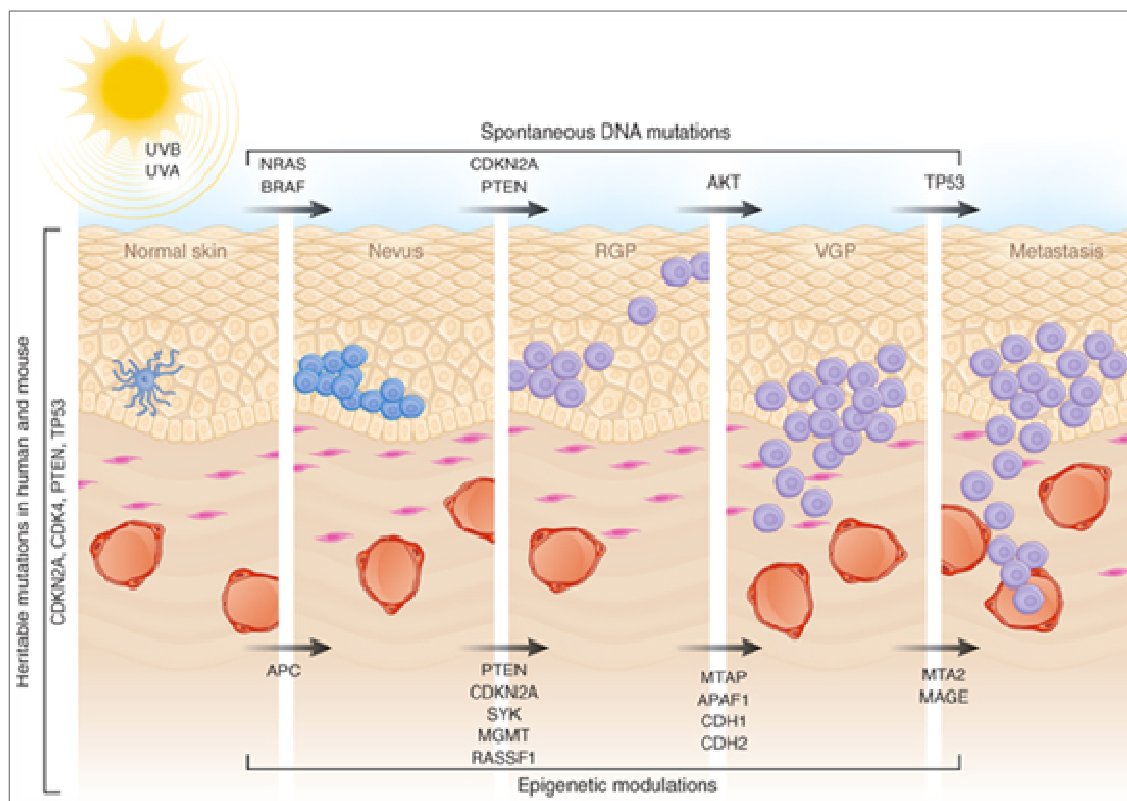
Desde 1960, a taxa de mortalidade pelo melanoma vem aumentando em cerca de 2% ao ano e em 2010 foi estimado que 8.700 americanos morreriam devido a este tumor (RIGEL 2010). Segundo o Instituto Nacional de Câncer-INCA, a estimativa de novos casos de melanoma em São Paulo para ano de 2012 foi de 5,58/100.000 em homens e 5,59/100.000 em mulheres (Ministério da Saúde 2011).

O desenvolvimento do melanoma cutâneo está associado a fatores de risco como: idade acima de 50 anos, exposição solar (principalmente aquela intermitente e intensa), história familiar, história de queimadura solar (principalmente na infância), presença de nevos displásicos ou atípicos, número de nevos, presença de sarda, além de pele, cabelos e olhos claros (GILCHREST et al. 1999; LANDI et al. 2001; BACCARELLI et al. 2004).

O melanoma cutâneo pode surgir a partir de uma lesão pigmentada preexistente ou da pele normal e apresenta duas fases de crescimento:

- 1) **Radial:** lesão plana, de comportamento mais benigno;
- 2) **Vertical:** lesão infiltrativa, com pior prognóstico.

Na primeira fase de crescimento a chance de metástase é pequena, já na segunda fase as células tumorais invadem progressivamente a membrana basal da epiderme e planos mais profundos, aumentando o risco de metástases (Figura 1).



Fonte: Adaptado de ZAIDI et al. (2008)

Figura 1 - Progressão do Melanoma Cutâneo. Proliferação anormal de melanócitos, supostamente em resposta aos raios ultravioletas e formação de nevo benigno ou atípico (primeira e segunda fases). Na terceira fase, apresenta o melanoma com crescimento radial (RGP- *radial growth phase*), com crescimento intraepitelial e já na quarta fase, o crescimento vertical (VGP- *vertical growth phase*), com invasão da derme e evoluindo com metástase (quinta fase). Diversas mutações espontâneas nos genes *CDKN2A*, *CDK4*, *BRAF*, *PTEN* e *TP53* foram associadas ao melanoma. Alguns estudos também demonstraram que modulações epigenéticas, como metilações e modificação de histona, podem alterar a expressão de genes e estar associado ao início e progressão do melanoma.

Alguns subtipos clínicos do melanoma foram descritos:

- 1) **Expansivo ou extensivo superficial:** o mais comum (70%). Ocorre principalmente em tronco e membros inferiores e em indivíduos entre a 4ª e 5ª décadas de vida. É uma lesão plana com crescimento horizontal, eventualmente pode ter uma área de ulceração ou nodular, indicando maior poder metastático (CLARK et al. 1969).
- 2) **Nodular:** segundo mais comum (15 a 30%). Ocorre principalmente em indivíduos do sexo masculino, entre a 5ª e 6ª décadas de vida. Apresenta-se como um nódulo ou pápula, já na fase de crescimento vertical (CLARK et al. 1969).
- 3) **Acrolentiginoso:** ocorre principalmente em indivíduos não caucasianos, preferencialmente nas regiões palmar, plantar e leitos ungueais. Não está relacionado à exposição solar (REED 1976).
- 4) **Lentigo maligno melanoma:** apresenta crescimento lento e é precedido de lesão pré-maligna em áreas cronicamente expostas ao Sol. É pouco frequente (5%) e ocorre principalmente em indivíduos entre a 6ª e 7ª décadas de vida. É o que apresenta melhor prognóstico (CLARK et al. 1969).

Outros subtipos mais raros:

- 5) **Desmoplásico:** este subtipo de melanoma apresenta-se como um nódulo firme, semelhante a uma cicatriz. Metade dos casos deste tipo de melanoma é pigmentada. Ocorrem mais frequentemente em cabeça e pescoço, mas também podem acometer mucosas (CONLEY et al. 1971; MAGRO et al. 2006).

- 6) **Spitzóide:** o melanoma spitzóide é geralmente nodular e amelanótico. Assemelha-se a outras lesões cutâneas como: hemangiomas, granulomas piogênicos ou carcinomas basocelulares. Menos comumente estas lesões são pigmentadas com variação de cor. Podem ocorrer em crianças, mas ocorrem mais frequentemente em adultos. Cabeça e pescoço e extremidades são os locais mais comuns de aparecimento da lesão (REED et al. 1975; KAMINO 2009).

1.2 ESTADIAMENTO DO MELANOMA

O Índice de Breslow, reportado pela primeira vez pelo patologista Alexander Breslow, em 1970, determina a espessura do tumor, medindo-se verticalmente a lesão em milímetros e é fundamental para o estadiamento, determinação do tratamento e prognóstico da doença (Figuras 2 e 3).

O estadiamento do melanoma é feito a partir da classificação T, N e M, sendo T a espessura do tumor (Breslow); N a presença de linfonodos locais comprometidos, metástase em trânsito ou satelitoses e M a existência de metástases em órgãos e linfonodal ou cutânea à distância, de acordo com a: *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (Quadros 1 a 4) (EDGE et al. 2010)

Quadro 1 - Classificação T

T1	< ou = 1,0mm	a - sem ulceração e mitoses < 1/mm ² b - com ulceração ou mitoses > ou = a 1mm ²
T2	1,01 – 2,0mm	a - sem ulceração b - com ulceração
T3	2,01 – 4,0	a - sem ulceração b - com ulceração
T4	>4,0mm	a - sem ulceração b - com ulceração

Quadro 2 - Classificação N

N0	sem evidências de linfonodos comprometidos	
N1	1 linfonodo	a – micrometástases b – macrometástases
N2	2 a 3 linfonodos	a – micrometástases b – macrometástases c - metástases em trânsito ou satelitoses, sem linfonodos metastáticos
N3	4 ou mais linfonodos ou combinação de metástases em trânsito ou satelitoses e linfonodos metastáticos	

Quadro 3 - Classificação M

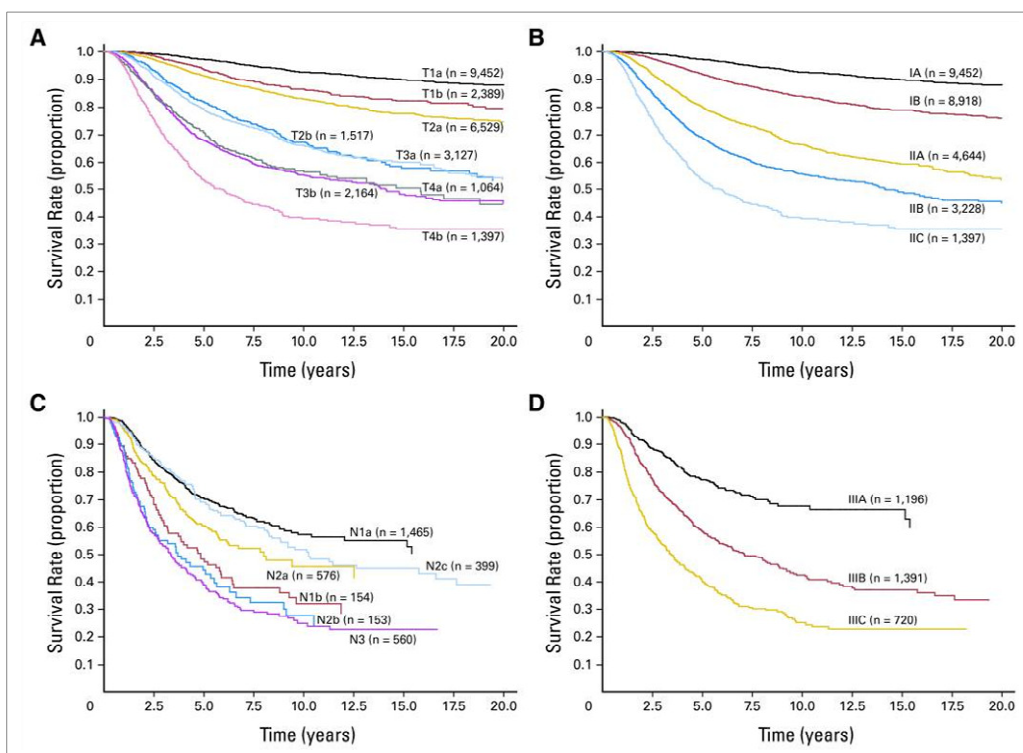
M0	Sem evidência de metástase à distância	Nível sérico DHL: NA
M1a	metástases cutâneas, subcutâneas ou linfonodais à distância	Nível sérico DHL normal
M1b	metástases pulmonares	Nível sérico de DHL normal
M1c	metástases viscerais ou em outros locais	Nível sérico de DHL elevado

DHL: desidrogenase láctica; NA: não aplicável.

Quadro 4 - Estadiamento

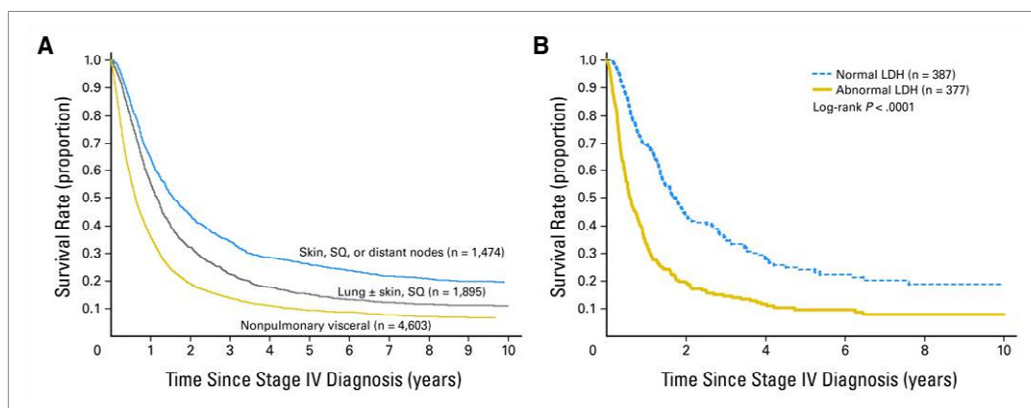
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b T2a	N0 N0	M0 M0
IIA	T2b T3a	N0 N0	M0 M0
IIB	T3b T4a	N0 N0	M0 M0
IIC	T4b	N0	M0
III	qq T	N1 ou +	M0
IV	qq T	qq N	M1 ou +

Is: *in situ*, qq: qualquer



Fonte: Adaptado de BALCH et al. (2009).

Figura 2 - Curvas de sobrevida do AJCC comparando as diferentes categorias de “T” (curva A). Associação com sobrevida nos estádios I e II do melanoma (curva B). Comparação dos diferentes “Ns” do estágio III (curva C) e comparação dos grupos do estágio III (curva D).



Fonte: Adaptado de BALCH et al. (2009).

Figura 3 - Curvas de sobrevida de 7.635 pacientes com melanoma com metástase à distância. Sendo curva A o local da metástase à distância e B, níveis séricos de desidrogenase láctica (LDH). SQ= subcutâneo.

1.3 REPARO DE DNA POR EXCISÃO DE NUCLEOTÍDEOS (NER)

A pele é constantemente exposta a agentes carcinogênicos, como os raios UV. A radiação UV pode ser dividida em UVC, que é absorvida pela camada de ozônio; UVA que é a mais abundante (cerca de 90%) e UVB, que corresponde a 10% e é a mais nociva. Os raios UVA causam lesão direta em uma das fitas do DNA, gerando radicais livres e danos oxidativos, já a absorção dos raios UVB lesa o DNA por meio da formação de fotoprodutos 6-4 e dímeros de pirimidina, que provocam distorções em sua dupla hélice (GONÇALVES et al. 2011). Além dos dímeros serem produzidos em maior quantidade em relação aos fotoprodutos 6-4 (3:1), provocam menor distorção da dupla hélice do DNA e desta maneira são mais dificilmente reconhecidos pelas proteínas responsáveis pelo reparo (SUGASAWA et al. 2005; FRANCISCO 2007). Para exemplificar, uma hora de exposição solar gera aproximadamente 80.000 lesões por célula da pele humana (MULLAART et al. 1990). Quando estes fotoprodutos ou dímeros não são removidos, podem induzir a mutações no DNA e conseqüentemente ao desenvolvimento de câncer de pele, incluindo o melanoma (BALCH et al. 2004; AFAQ et al. 2005; LI et al. 2006). A via de reparo de danos no DNA por excisão de nucleotídeos ou simplesmente, via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é responsável pelo reparo destas lesões que causam distorções na hélice do DNA, sejam induzidas por agentes internos ou externos. Sua deficiência pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer de pele, ainda mais quando associado ao avanço da idade, devido ao tempo de exposição aos raios UV e a outros fatores carcinogênicos, como o enfraquecimento

das defesas contra exposição solar como, por exemplo, a diminuição da espessura da pele (YAAR e GILCHREST 2001; LI et al. 2006; MELIS et al. 2011).

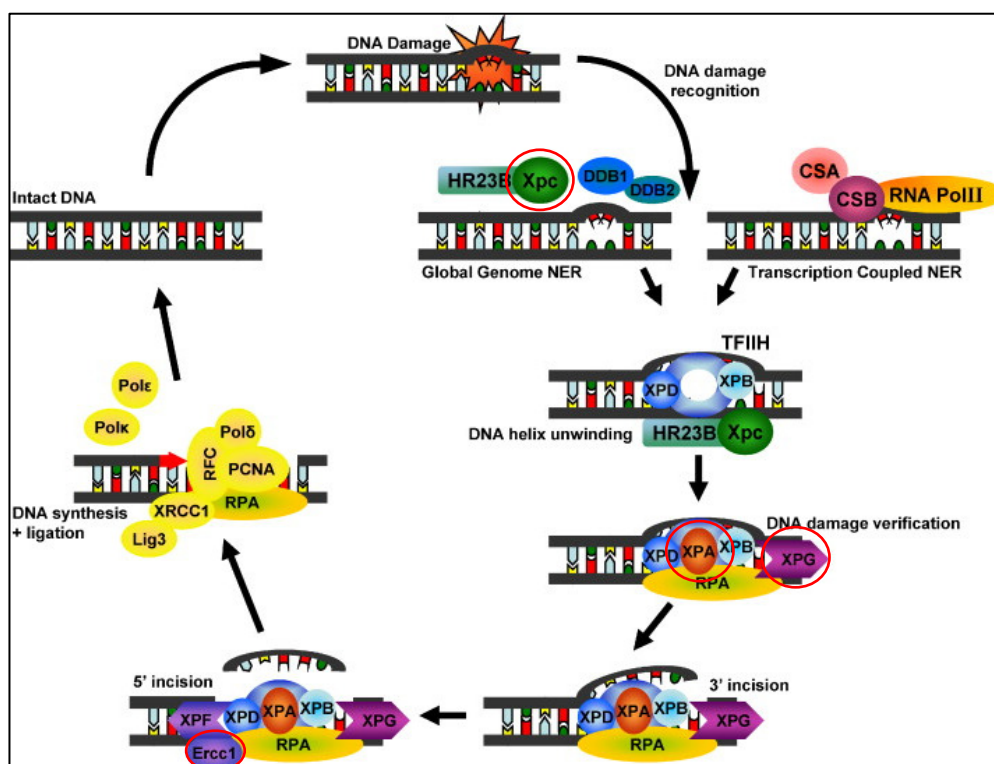
A via NER funciona por meio de duas etapas principais:

- 1) Reconhecimento da lesão, incisão e liberação do nucleotídeo alterado
- 2) Preenchimento do “gap” através de polimerização e ligação do DNA (BLANKENBURG et al. 2005a).

Mais de 30 proteínas fazem parte da via de reparo por excisão de nucleotídeos e são responsáveis pela eliminação de distorções na hélice do DNA, causadas por agentes internos ou externos. Oito tipos diferentes de genes dos grupos complementares XP, foram identificados e fazem parte desta via: *ERCC1*, *XPA*, *XPB/ERCC3*, *XPC*, *XPD/ERCC2*, *XPE*, *XPF/ERCC4* e *XPG/ERCC5*, sendo cada um responsável por etapas distintas do processo (LI et al. 2006). O reparo por excisão de nucleotídeos é dividido em duas subvias, que iniciam de maneira diferente, mas após o reconhecimento do dano ao DNA, ocorrem da mesma maneira (MELIS et al. 2011). As subvias são chamadas de Reparo do Genoma Global (GGR-NER), que reconhece e remove danos ao longo de todo o genoma e Reparo Acoplado à Transcrição (TCR-NER), que remove danos presentes em genes transcritionalmente ativos (MELIS et al. 2011). A subvia GGR-NER é considerada mais lenta e menos eficiente que a subvia TCR-NER, contudo é capaz de remover rapidamente danos causados pelos fotoprodutos 6-4 (GARINIS et al. 2006; MELIS et al. 2011). Já a subvia TCR-NER é iniciada quando há bloqueio da transcrição e é considerada uma via mais rápida e eficiente (MELIS et al. 2011). Para a subvia GGR-NER, primeiramente os produtos dos genes *XPC* e *XPE* são responsáveis pelo reconhecimento das lesões ao DNA, através das áreas de distorções da hélice do

DNA (NISHI et al. 2005; MELIS et al. 2011). A proteína XPC faz parte de um complexo multiprotéico XPC/ HR23B /Centrina 2, sendo HR23B e Centrina 2 responsáveis pela estabilização do XPC, inibindo sua ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteossomo 26S (NISHI et al. 2005). O produto do gene *XPE*, a subunidade DDB2, é a menor parte da proteína *UV-Damaged DNA Binding* (UV-DDB), que ainda contém uma subunidade maior, a DDB1 (FITCH et al. 2003; MELIS et al. 2011). A afinidade de ligação da proteína XPC ao DNA parece ser em áreas onde há maiores distorções da hélice do DNA (aquelas causadas pelos fotoprodutos), já as lesões causadas pelos dímeros de pirimidina, que causam mínimas distorções da hélice, são reconhecidas de maneira mais efetiva pela proteína UV-DDB (FITCH et al. 2003; MELIS et al. 2011). A presença da proteína UV-DDB, aumenta a afinidade do XPC a estas áreas de menores distorções do DNA (TANG et al. 2000; MELIS et al. 2011). Já para a subvia TCR-NER, o início se dá após o bloqueio da transcrição pela RNA polimerase II, devido a presença de dano ao DNA e então duas proteínas, a CSA (Cockaine Syndrome A) e CSB (Cockaine Syndrome B), que são parte dos complexos associados a RNA polimerase II, entram no processo (SUNESSEN et al. 2002). A função da proteína CSA ainda precisa ser elucidada, mas a CSB parece ser responsável pelo deslocamento da RNA polimerase II, para o início do processo de reparo (MELIS et al. 2011). A seguir, nas duas subvias, ocorre o recrutamento do fator de transcrição IIH (TFIIH), que contém duas enzimas helicases: XPB e XPD e então, as duas subvias se unem em uma só via (MILLIKAN et al. 2006; LI et al. 2006; MELIS et al. 2011). Ocorre então, a abertura da hélice, separando o DNA em duas fitas simples (LI et al. 2006). O produto do gene *XPA* é responsável pela verificação do local da lesão e age juntamente com o

complexo RPA (*Replication Protein A*), na organização do maquinário de reparo ao redor da lesão (MELIS et al. 2011). As proteínas XPA e RPA também parecem estar envolvidas na proteção da área da fita onde não há dano e levam à abertura completa da área que deverá ser reparada (HERMANSON-MILLER e TURCHI 2002; MELIS et al. 2011). Neste momento duas enzimas responsáveis pela incisão do DNA entram no processo: o complexo XPF e ERCC1, que cliva a extremidade 5' da fita e XPG que faz o mesmo pela extremidade 3' (LI et al. 2006; MILLIKAN et al. 2006). Posteriormente o “gap” é preenchido por síntese e ligação (MILLIKAN et al. 2006) (Figura 4).



Fonte: Adaptado de MELIS et al. (2011).

Figura 4 - Esquema da via de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER).

Ocorre o dano ao DNA, que é reconhecido pelas proteínas desta via, há a abertura da dupla fita de DNA e incisão da parte danificada. Finalmente são realizadas síntese e ligação do DNA para preenchimento do “gap” e reparo da fita do DNA. Em vermelho estão representados os produtos codificados pelos genes selecionados para este estudo.

Os danos oxidativos e a quebra simples da fita de DNA são reparados pela via de reparo por excisão de base (BER). Foi demonstrado que a modulação da via BER altera a sensibilidade da célula aos raios UVA, mas não ao UVB (IBARROLA-VILLAVA et al. 2011). Em adição aos genes da via de reparo do DNA, outros produtos gênicos estão envolvidos no reconhecimento de danos ao DNA induzidos pelos raios UV e por danos oxidativos espontâneos. Portanto, mutações nestes genes como *CDKN2A* e *CDK4*, envolvidos no melanoma familiar, mutações do *BRAF* e do *TP53* também aumentam a suscetibilidade ao melanoma (POVEY et al. 2007).

Algumas síndromes foram relacionadas aos genes de reparo por excisão de nucleotídeos, as mais conhecidas são: xeroderma pigmentoso (XP), síndrome de Cockaine e tricotiodistrofia (MELIS et al. 2011). A tricotiodistrofia é causada por mutações em genes relacionados ao TFIIH (*XPB*, *XPD* e *TTDA*) e no gene *TTDN1*, cuja função ainda é desconhecida (FAGHRI et al. 2008). Nesta síndrome ocorre fotossensibilidade, cabelos frágeis, ictiose, baixa estatura, deficiência intelectual e baixa fertilidade (FAGHRI et al. 2008). Já a Síndrome de Cockaine é caracterizada por mutações nos genes *CSA* (20%) e *CSB* (80%) levando a inúmeras alterações como: caquexia, envelhecimento precoce, baixa estatura, demência, alterações visuais e auditivas, fotossensibilidade e predisposição ao câncer de pele, neuropatias, osteopenia, entre outras (RAPIN et al. 2006).

O XP é uma doença autossômica recessiva, caracterizada pela deficiência em diferentes etapas da via NER e leva ao grande aumento da suscetibilidade ao câncer de pele (cerca de 1000 vezes mais do que em indivíduos normais, segundo BLANKENBURG et al. 2005a; LI et al. 2006) e em indivíduos menores de 20 anos há um aumento da incidência de câncer não melanoma em 10.000 vezes e em 2.000

vezes para melanoma (BRADFORD et al. 2011). A deficiência na via NER é causada por mutações patogênicas nos grupos complementares XP, do *XPA* a *XPG* (em 50% dos casos as mutações ocorrem nos genes *XPA* e *XPC*) e tendo ainda um grupo variante *XPV*, no qual a mutação ocorre em um gene que codifica a polimerase- η (ETA), responsável pela replicação do DNA danificado (MASUTANI et al. 1999; NELSON et al. 2005; LI et al. 2006). Esta doença atinge 1:250.000 indivíduos nos Estados Unidos da América e 1:40.000 no Japão (MELIS et al. 2011). A idade média de aparecimento do primeiro câncer de pele é aos oito anos e esta doença esta associada também a anomalias oculares, problemas neurológicos e a um risco aumentado em 10 a 20 vezes para o desenvolvimento de tumores em órgãos internos (MELIS et al. 2011). A degeneração neurológica pode ocorrer em 20% dos pacientes com XP, principalmente naqueles pacientes cujas mutações estão nos genes *XPA*, *XPB*, *XPD* e *XPG* (CLEAVER et al. 2009). Pacientes com mutações nos genes *XPC* e *XPE*, que só fazem parte da subvia GGR-NER, sofrem menos lesões causadas pelos raios UV, comparados àqueles que têm mutações em outros genes do grupo complementar XP (MELIS et al. 2011).

Os polimorfismos são variações na sequência do DNA que ocorrem de maneira constante na população (acima de 1%) e ao contrário das mutações, que são raras, não podem ocasionar patologias debilitantes, mas podem aumentar a suscetibilidade do indivíduo a certas doenças. Os SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*, são polimorfismos em que ocorre variação de uma única base na sequência do DNA.

1.3.1 Polimorfismos em genes de reparo a danos em nucleotídeos e seu envolvimento em câncer

O gene *ERCC1* está mapeado em 19q13.3 e codifica um produto que forma um complexo com a proteína XPF, e atua na incisão da extremidade 5' do DNA danificado. Esta pode ser uma parte crítica do processo de reparo após o dano da fita do DNA e a alteração deste complexo pode gerar mutagênese e instabilidade genômica (POVEY et al. 2007).

Um estudo realizado por GAO et al. (2013), demonstrou que há desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo *ERCC1* 500 C/T (rs11615) e outros dois polimorfismos deste gene (*ERCC1* C/G- rs3212950 e *ERCC1* G/C- rs3212948). Em comparação ao polimorfismo C/T isolado, o haplótipo composto pelos três SNPs (*ERCC1* C/T, C/G e G/C), foi mais frequente em caucasianos com melanoma do que em caucasianos saudáveis ($p=0,0034$) ou afroamericanos ($p<0,001$).

O termo haplótipo é utilizado para descrever uma combinação particular de alelos ao longo do cromossomo. Pacientes portadores de certos alelos polimórficos frequentemente carregam também outros alelos variantes que se encontram em locais vizinhos no cromossomo e isto é chamado de desequilíbrio de ligação (International Hapmap Consortium 2005). O tamanho do bloco de desequilíbrio de ligação é um assunto controverso: algumas simulações em computadores e pesquisas empíricas sugerem que o desequilíbrio de ligação se estende por apenas alguns kilobases (kb), enquanto outros estudos sugerem que pode ser maior do que 100kb (REICH et al. 2001).

O produto do gene *XPA* atua no início da via NER para o reconhecimento do dano na fita do DNA, abertura completa da fita e proteção da parte não danificada do

DNA. Um estudo realizado por MILLER et al. (2006), que analisou o polimorfismo *XPA* G/A, demonstrou que em genótipos contendo o alelo A (alelo raro), a frequência de carcinomas basocelulares (CBC) e espinocelulares (CEC), era menor. Neste mesmo estudo, os autores associaram o polimorfismo com história de queimaduras solares e demonstraram aumento do risco para CBC entre aqueles pacientes com história de queimaduras solares e genótipo GG (alelos selvagens). Segundo os autores uma explicação possível para os resultados seria que os queratinócitos possuem alta taxa de apoptose em resposta ao dano do DNA, portadores do alelo A teriam menor eficiência de reparo e consequentemente, maior dano, levando a apoptose da célula. FRANCISCO (2007) estudou a associação de *XPA* -4 G/A e risco de melanoma, porém não encontrou nenhuma associação. Uma meta-análise realizada por LIU et al. (2012), avaliou SNPs no gene *XPA* como fatores de risco para diversos tumores. Os autores concluíram que o polimorfismo *XPA* G/A possui uma baixa penetrância, contudo foram observadas associações estatisticamente significativas com o câncer colorretal; modelo dicotomizado dominante GG + AG vs. AA e com o câncer de cabeça e pescoço, no modelo dicotomizado recessivo.

O gene *XPC* foi mapeado em 3p25 e polimorfismos ou SNPs, neste gene podem diminuir a eficácia na via NER, levando ao aumento da suscetibilidade ao câncer. (NELSON et al. 2005; LI et al. 2006). Existem polimorfismos comuns no gene *XPC* tais como: substituição de Lisina (Lys) por Glutamina (Gln), na posição 939 do exon 15 (Lys939Gln) (rs2228001) e inserção de 83 bases AT no intron 9 (PAT+) (NELSON et al. 2005). O polimorfismo do gene *XPC* PAT+ não é classificado como SNP, mas como polimorfismo do tipo inserção/deleção (in/del).

SHEN et al. (2001), demonstraram que o polimorfismo PAT+, está associado ao risco aumentado de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. O polimorfismo do *XPC* Lys939Gln, parece estar associado ao câncer de bexiga em uma população da Suécia (SANYAL et al. 2004). Em adição, um estudo na Alemanha, realizado por BLANKENBURG et al. (2005b), avaliou a presença de três tipos de polimorfismos no gene *XPC*: PAT+; substituição de citosina por adenina (C/A- rs2279017) e Lys939Gln (rs2228001) e observou uma associação com o aumento do risco para melanoma quando ajustado para fatores como idade, tipo de pele e número de nevus. FRANCISCO (2007) encontrou aumento do risco de desenvolvimento do melanoma em homozigotos dos polimorfismos: *XPC* PAT+, *XPC* -4 C/A e *XPC* Lys939Gln.

Um estudo realizado na China por ZHU et al. (2010), demonstrou que pacientes que apresentavam os genótipos C/C e C/A no intron 11 do gene *XPC*, obtiveram melhor resposta ao tratamento quimioterápico em relação aos pacientes com genótipo A/A. Portanto, os autores observaram que as variantes polimórficas no *XPC* C/A poderiam alterar a sensibilidade de pacientes portadores de câncer de pulmão (não pequenas células) à quimioterapia com Vinorelbina e Cisplatina.

Outro estudo realizado por GONÇALVES et al. (2011), observou que pacientes portadores do haplótipo *XPC* completo, ou seja, pacientes que apresentavam simultaneamente as três variantes raras dos polimorfismos de *XPC* já citados acima, apresentavam maior risco para desenvolvimento de melanoma do que aqueles que possuíam isoladamente apenas um tipo de polimorfismo.

Os polimorfismos do gene *XPB* (localizado no cromossomo 19q13.3) mais frequentes em caucasianos são: substituição de Aspartato por Asparagina, na posição 312, no exon 10 (Asp312Asn; rs 13181) e substituição de Lisina por Glutamina, na

posição 751 no exon 23 (Lys751Gln; rs 13181) (BENHAMOU e SARASIN 2002; LI et al. 2006). Estes polimorfismos também estão associados a uma diminuição no reparo do DNA em lesões causadas pelos raios UV, o que pode acarretar aumento do risco de câncer com o envelhecimento (DYBDAHL et al. 1999). Em estudo realizado por BACCARELLI et al. (2004), observou-se que os polimorfismos do *XPB* aumentaram o risco para melanoma em pacientes com idade maior de 50 anos e portadores do SNP Asp312Asn, em pacientes com ausência de nevos displásicos, mas portadores do SNP Lys751Gln e naqueles com pouca capacidade de bronzeamento e portadores dos dois SNPs: 312Asn e 751Gln. Em estudo realizado no Texas, por LI et al. (2006), foi encontrado aumento do risco para melanoma cutâneo, associado a variantes polimórficas do *XPB* 751Gln e do *XPB* 312Asn, quando comparadas com 751Lys/Lys e 312Asp/Asp respectivamente. Neste mesmo trabalho foram investigados os polimorfismos do *XPD*: substituição de Alanina por Valina (Ala499Val; rs 2228000) e substituição de Lisina por Glutamina (Lys939Gln) e do *XPD*: substituição de Histidina por Aspartato (His1104Asp; rs 17655), mas não foi encontrado associação com aumento do risco para melanoma.

O polimorfismo mais estudado do gene *XPD*, localizado no cromossomo 13q22, é a substituição de guanina por adenina (G/A), que leva a troca dos aminoácidos Aspartato por Histidina, na posição 1104 (Asp1104His; rs17655). BLANKENBURG et al. (2005b), não identificaram associações entre este polimorfismo e o aumento do risco de melanoma. Já FRANCISCO (2007), demonstrou que este polimorfismo exerce um efeito protetor.

Em relação ao gene *XPD*, SHI et al. (2012), realizaram uma meta-análise para estudar a associação entre os polimorfismos mais comuns do *XPD* e risco para

câncer. Os polimorfismos estudados em XPF foram: Arg415Gln, exon 8 (rs1800067), Ser835Ser, exon 11 (rs1799801), Ser662Pro, exon10 (rs2020955) e C/G, intron 1(rs744154). Os autores não acharam associação entre os polimorfismos estudados e aumento do risco para câncer, mas acharam associação entre a variante genotípica CC do polimorfismo Ser835Ser e a redução do risco para câncer em caucasianos, em comparação com o genótipo TT (selvagem). Segundo os autores, os indivíduos com genótipo CC apresentaram maiores níveis de transcrição de *XPF* do que os demais genótipos.

1.3.2 Polimorfismos em genes de reparo a danos e evolução clínica do melanoma

Os estudos apresentados demonstraram resultados contraditórios quanto ao risco para desenvolvimento de melanomas. Uma vez estabelecido, o melanoma pode ter uma evolução boa ou ruim. A busca por marcadores moleculares que possam ser indicadores de uma melhor ou pior evolução clínica da doença é essencial para o manejo dos pacientes. Polimorfismos em genes de reparo a danos no DNA, além de influenciar a suscetibilidade, podem potencialmente alterar a progressão e a sobrevida em pacientes com melanoma. LIU et al. (2005) avaliaram o impacto dos SNPs *XPD* Lys751Gln e *ERCC1* C/T e identificaram uma associação entre a variante rara de *ERCC1* e sobrevida global ($p = 0.04$). Outro estudo, em uma população alemã, SCHRAMA et al. (2011) identificaram os SNPs *XPD* Lys751Gln e *XPG* Asp1104His como fatores prognósticos independentes para a evolução do melanoma. Os autores revelaram que o genótipo raro *XPG* HisHis foi significativamente associado com diminuição de sobrevida. A taxa de sobrevida após

cinco anos foi de 55% para pacientes com este genótipo, comparados com 82% de pacientes com o genótipo *XPG* AspAsp. Já para o *XPD*, o modelo *hazard ratio* (HR) revelou o significativo impacto do genótipo raro *XPD* GlnGln com pior prognóstico (HR = 2,2) comparado com pacientes com genótipo selvagem *XPD* LysLys ($P < 0,01$). LI et al. (2013), analisaram 1.042 casos de melanoma e encontraram fatores preditivos do prognóstico do melanoma associado aos seguintes SNPs: *XPE* (rs28720291), *XPG* (rs4150314); *XPC* (rs2470458) e *XPD* (rs50871). Estes polimorfismos foram associados ao aumento do risco de morte por melanoma, baseado em um seguimento de 3 anos.

2 JUSTIFICATIVA

Indivíduos que apresentam SNPs ou outros polimorfismos em genes de reparo da via NER (grupos complementares XP) podem ter aumento da suscetibilidade ao câncer e também alteração da progressão do melanoma e diminuição da sobrevida, como demonstrado nos estudos acima citados. Foi então, avaliado o risco de desenvolvimento de melanomas em indivíduos não portadores de XP em estudo prévio realizado em colaboração com o Hospital A.C. Camargo (FRANCISCO 2007). Foram genotipados 412 pacientes, sendo 202 casos de melanoma (dos quais 127 eram pacientes do Hospital A.C. Camargo). Estes pacientes tiveram, em sua maioria, diagnóstico de melanoma entre 2004 e 2006. Este estudo verificou os fatores associados ao melanoma na população brasileira, relacionando fatores ambientais e polimorfismos dos genes de reparo do DNA. De acordo com os dados obtidos neste estudo prévio, polimorfismos em genes dos grupos XP aumentam o risco do desenvolvimento para melanoma em um grupo de pacientes brasileiros com ascendência europeia. Uma vez que dados sobre a associação de fatores genéticos e evolução clínica do melanoma são ainda escassos na literatura, esses polimorfismos tornam-se bons candidatos para avaliação quanto à evolução e sobrevida neste tipo de câncer. Entre os polimorfismos avaliados, foram selecionadas as seguintes variantes em genes dos grupos XP para associação com dados de evolução clínica:

- **ERCCI:** C/T, no códon 118 (rs11615)
- **XPA:** G/A, no nucleotídeo -4 (região 5'UTR) (rs1800975)

- **XPC:** C/A, no intron 11(rs2279017)
PAT +, no intron 9 (in/del) (rs72163318)
Lys939Gln no exon 15 (rs2228001)
- **XPG:** Asp1104His (rs17655)

2.1 SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS

Em estudos populacionais de base epidemiológica, o tamanho das amostras deve ser o suficiente para proporcionar um intervalo de confiança de no mínimo 95% e um *odds ratio* (OR). Para o estudo realizado previamente por FRANCISCO (2007) foi necessário calcular a estimativa da frequência dos polimorfismos a ser estudados. Para isto, foi plotado um gráfico do tamanho populacional esperado em função da frequência de determinado polimorfismo, onde o *odds ratio* foi estimado em isolinhas logarítmicas (Figura 5). Através do gráfico, ficou demonstrado que a escolha de polimorfismos que apresentassem frequência populacional entre 20 e 45% poderia, caso tivessem associação positiva com melanoma, apresentar um *odds ratio* de no mínimo 1,75, baseando-se na estimativa de 210 casos. Posteriormente foram levantadas na literatura as variantes alélicas de genes de reparo no DNA que estivessem dentro desta faixa de frequência em populações caucasianas. Desta maneira, os seis polimorfismos em genes de reparo por excisão de nucleotídeos citados anteriormente, foram selecionados.

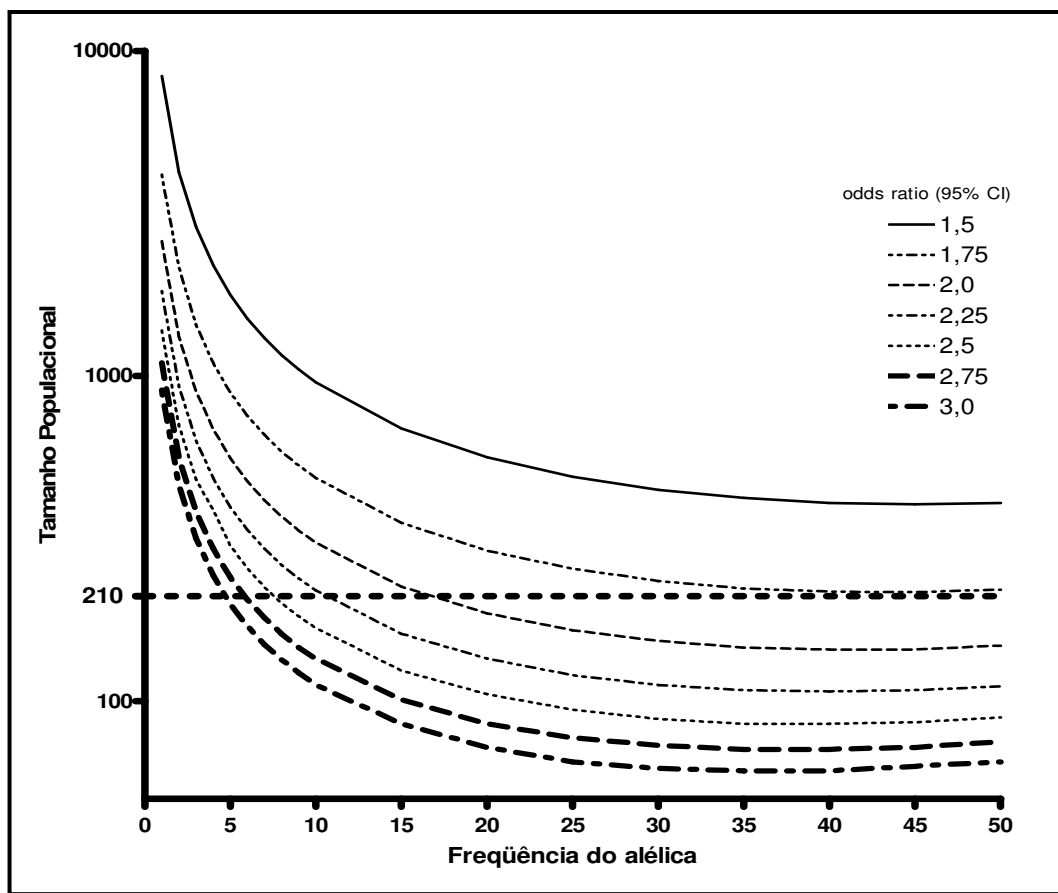


Figura 5 - Gráfico logarítmico representando o tamanho populacional necessário para um determinado *odds ratio* com 95% de intervalo de confiança (isolinhas) em função da frequência alélica dos polimorfismos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi identificar marcadores genéticos com valor prognóstico em pacientes com melanoma.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Observar a evolução clínica da doença nos pacientes portadores de melanoma e associar com os polimorfismos dos genes *ERCC1*, *XPA*, *XPC* e *XPB*;
- 2) Analisar a associação entre os haplótipos compostos pelos polimorfismos de *XPC* e as variáveis clínicas estudadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 127 prontuários de pacientes do Hospital A.C. Camargo, portadores de melanoma cutâneo e não portadores de XP, diagnosticados em sua maioria, entre 2004 e 2006 e que foram genotipados no estudo prévio acima citado, na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para o estudo realizado por FRANCISCO (2007), do qual os pacientes deste estudo atual também fizeram parte, os critérios de inclusão para o grupo de casos foram: pacientes com idade entre 19 e 79 anos, com diagnóstico recente de melanoma cutâneo (com confirmação por exame anátomo-patológico), válidos a partir do ano de 2004, atendidos nos hospitais integrantes do estudo (Hospital A.C. Camargo, Hospital das Clínicas - FMUSP e Instituto Brasileiro de Controle do Câncer). Os pacientes deveriam residir há mais de seis meses na região metropolitana de São Paulo. Foram excluídos os pacientes com xeroderma pigmentoso ou com melanoma em áreas não expostas ao sol.

Para o estudo atual os critérios de inclusão foram: pacientes com melanoma diagnosticado entre 2004 e 2006 no Hospital A.C. Camargo, que não eram portadores de XP e que fizeram parte do estudo prévio (FRANCISCO 2007). Foram excluídos do estudo aqueles pacientes cujos dados nos prontuários eram insuficientes.

4.2 ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS

Para a análise dos prontuários foi montado um protocolo, no qual foram considerados os seguintes aspectos:

- data do diagnóstico;
- idade do paciente ao diagnóstico;
- local do melanoma;
- exame anátomo-patológico da lesão;
- estadiamento ao diagnóstico;
- tratamento realizado;
- presença ou não de recidiva;
- data da recidiva;
- tipo de recidiva: metástases locorregionais ou à distância;
- realização ou não de quimioterapia;
- tipo de quimioterapia;
- estado atual do paciente;
- diagnóstico de outros tumores de pele;
- diagnóstico de tumores primários em outros órgãos.

O modelo do protocolo utilizado para a análise dos prontuários dos pacientes com melanoma apresenta-se no Anexo 1.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA

Como citado acima, a extração do DNA e genotipagem foram realizadas no laboratório do Grupo de Adesão Celular e Câncer na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em estudo prévio (FRANCISCO 2007).

A coleta de sangue foi realizada através de tubos selados a contendo EDTA, para evitar coagulação. Uma alíquota de 4 mL de sangue periférico, foi encaminhado ao laboratório para extração do DNA a partir dos leucócitos.

A amostra foi transferida para um tubo Falcon com solução de lise de hemácias (NH_4CO_3 1mM; NH_4Cl 114mM; H_2O ultra-pura q.s.p. 1000mL). A solução foi mantida em geladeira por 30 minutos e a seguir os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 300rpm, descartando-se o sobrenadante.

A seguir, realizou-se a lise dos leucócitos, através da adição de solução de lise (NaCl 4M; Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,5 M pH8,0 e H_2O ultra-pura q.s.p. 100ml); 48 μL de SDS 10% e 50 μL de Proteinase K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A solução foi transferida para banho seco e mantida a 37°C por 16 horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 300 rpm. O sobrenadante, contendo o DNA foi transferido para um tubo Eppendorf autoclavado. Adicionou-se dois volumes de etanol absoluto gelado, sendo o tudo invertido diversas vezes, até se observar a precipitação do DNA.

O DNA precipitado foi retirado com auxílio de uma ponteira plástica e transferido para um microtubo contendo 1mL de etanol 70%, para então ser centrifugado por 5 minutos a 6000rpm. Desprezou-se o etanol, deixando o tubo secar a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em TE (400 μL). A concentração

do DNA foi calculada em ng/uL através de espectrofotômetro (GeneQuant-Amersham Biosciences).

4.4 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

O método escolhido foi a Reação em cadeia da Polimerase, do inglês: PCR- *Polymerase Chain Reaction*, seguida de digestão por enzima de restrição (do inglês, RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Por meio desta metodologia foi possível amplificar uma determinada região do DNA, utilizando-se iniciadores (*primers*) específicos. Então, o *amplicon* (resultante da reação da PCR) foi submetido à digestão enzimática. Cada enzima reconhece uma sequência de nucleotídeos específica. De acordo com o alelo de cada polimorfismo, foi possível identificar os genótipos (gel de agarose) dos indivíduos, observando os fragmentos de DNA após a reação enzimática. As reações de PCR foram realizadas com os reagentes, nas seguintes concentrações finais: 1X tampão da enzima *Taq DNA polimerase* (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP Mix, 0,3 mM de *Primer Forward*, 0,3 mM de *Primer Reverse*, 1U enzima *Taq DNA polimerase*, amostras de DNA com concentração entre 100 a 200 ng e água ultrapura estéril em volume suficiente para completar 20 μ L. Estas condições foram válidas para a amplificação de *ERCC1 C/T*, *XPC C/A*, *XPC PAT+*, *XPC Lys939Gln*, *XPG Asp1104His*. Para a amplificação de *XPA G/A*, foram utilizados de 1mM de $MgCl_2$ e 0,2 mM de iniciadores e 2,5% de DMSO.

As amostras foram amplificadas no termociclador (PCR *System 9700*-Applied Biosystem), onde as condições de reação foram otimizadas para: 1 ciclo de

94°C por 5 minutos para desnaturação completa do DNA, seguido de 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s de temperatura de anelamento dos iniciadores e 30s a 72°C para amplificação da sequência alvo. Após o término dos 40 ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para a observação dos *amplicons*, as amostras foram submetidas a eletroforese (1h a 120V) em gel de agarose 1,5%, já corado previamente com brometo.

O gel foi transferido para transiluminador sob luz UV e em seguida fotografado utilizando-se o equipamento *Image Master* (Pharmacia Biotech), disponível no laboratório de Oncologia Experimental do Grupo de Adesão Celular e Câncer, da FMUSP. Todos os géis continham um marcador de peso molecular 100pb (pares de base) (Invitrogen) para confirmação da amplificação de fragmento com tamanho esperado para determinado gene.

Exceto para a identificação do polimorfismo *XPC PAT* (no qual a reação foi alelo específica, onde tamanhos diferentes de *amplicons* -diferença de 83pb- indicavam diferentes genótipos), as amostras foram submetidas a reação de digestão enzimática, utilizando-se 1 μ g do produto amplificado, 1X tampão da enzima a ser utilizada, 1U da enzima específica para cada polimorfismo e água ultrapura estéril na quantidade suficiente para completar 10 μ L de reação. A reação de digestão enzimática foi realizada em banho seco, por cerca de 2 horas, onde a temperatura variou de acordo com a ideal para cada enzima (Quadro 5). Após o término da reação, o produto obtido foi observado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e submetido a eletroforese por cerca de 1h a 120V. Em seguida o gel foi visualizado e fotografado. A genotipagem das amostras foi anotada de acordo com o

padrão de restrição obtido e previamente determinado. Um marcador molecular de 100pb (Invitrogen) também foi utilizado 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.

Quadro 5 - Relação dos genes e dos respectivos SNPs (a temperatura de anelamento utilizada, o tipo de enzima -RFLP- e o tamanho esperado em pares de bases (pb) das bandas para cada genótipo).

Gene	Primers 5'-3'	Temp °C	RFLP	Tamanho esperado (pb)		
<i>ERCC1</i> C/T	F- GAGGTGCAAGAAGAGGTGGA R- GCAGAGCTCACCTGAGGAAC	59	<i>BsrDI</i>	CC 208	CT 208/128/80	TT 128/80
<i>XPA</i> G/A	F- TCAGAAAGGCCGGTCCGT R- CTGGCGCAGCATCAGTGC	58	<i>Msp I</i>	GG 109/96	GA 139/109/36	AA 139/96
<i>XPC</i> C/A	F- AAATGACCTGGGCCTGTTTG R- GGCAGGAAGAGGTACACATTC	63	<i>Fau I</i>	CC 160/43	CA 203/160/43	AA 203
<i>XPC</i> PAT+	F – TAGCACCCAGCAGTCAAAG R - TGTGAATGTGCTTAATGCTG	56	—	(-/-) 266	(+/-) 344/266	(+/+) 344
<i>XPC</i> Lys939Gln	F- GGAGGTGGACTCTCTTCTGATG R- TAGATCCAAGCAGATGACC	58	<i>Pvu II</i>	LysLys 765	LysGln 765/585/180	GlnGln 585/180
<i>XPG</i> Asp1104His	F- GACCTGCCTCTCAGAATCATC R- CCTCGCACGTCTTAGTTTCC	59	<i>Nla III</i>	AspAsp 272	AspHis 272/227/45	HisHis 227/45

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*, F: *forward*; R: *reverse*; pb: pares de base

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e os genótipos foram calculados por contagem de alelos e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado por meio de teste do χ^2 .

Foram realizados quatro tipos diferentes de análises: considerando-se os três genótipos estudados isolados (homozigotos selvagens, heterozigotos e homozigotos raros), Análise Dicotomizada Dominante, considerando-se um grupo com a ausência do alelo raro (homozigotos selvagens) e um com a presença do alelo raro (heterozigotos + homozigotos raro), Análise Dicotomizada Recessiva, considerando-se um grupo com a presença do alelo selvagem (homozigotos selvagens + heterozigotos) e um com a ausência do alelo selvagem (homozigotos raros) e Análise de Alelos, considerando-se o alelo selvagem e o alelo raro independentemente.

Para verificar se houve diferença na média de idade entre os diferentes grupos, inicialmente foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Como a variável dependente idade obedeceu à normalidade, foram utilizados testes paramétricos. O teste ANOVA de uma via foi utilizado na comparação da média de idade entre genótipos e o teste *t-Student* foi utilizado para as análises com grupos de Genótipos Dicotomizados Dominante e Recessivo e Alelos.

O teste do χ^2 foi utilizado para verificar se houve diferença de sexo entre os diferentes grupos estudados para todas as análises. Além disso, este teste também foi utilizado para verificar associações entre os genótipos/alelos e os seguintes dados clínicos (local de acometimento, tipo histológico, classificação de Clark, classificação de Breslow, tipo de crescimento, índice mitótico (IM), ulceração,

regressão, satelitose, estadiamento, linfadenectomia, presença de outros tumores de pele, presença de tumores internos e pesquisa de linfonodo sentinela).

Foram calculados os resíduos ajustados para cada frequência genotípica a fim de confirmar aquelas que apresentaram diferenças significativas (foram considerados significantes, os valores de resíduos ajustados maiores que 2,0 e menores que -2,0).

O desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos foi calculado usando o *software Haploview* (BARRETT et al. 2005), calculando-se o parâmetro D' . Foram estimadas as frequências dos haplótipos pelo algoritmo EM (*Expectation-Maximization*). O teste do χ^2 foi utilizado para comparar a frequência de cada haplótipo entre afetados e não afetados pelas variáveis clínicas estudadas.

Foram realizados modelos de regressão logística univariada utilizando as variáveis clínicas como variável dependente e os genótipo/alelos associados como variáveis independentes.

A análise de sobrevivência utilizou o método de Kaplan-Meier, com obtenção de curvas de sobrevivência. As curvas foram comparadas mediante a realização do teste log-rank Mantel-Cox. Essa análise utilizou como eventos a morte (sobrevida global) e recidiva da doença (sobrevida livre de doença).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS® 18.0 e a hipótese nula foi rejeitada com valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS CLÍNICOS

Foram analisados 127 prontuários de pacientes do Hospital A.C. Camargo, portadores de melanoma, com diagnóstico entre 2004 e 2006 (em um paciente, o diagnóstico foi em 2002 e em dois, em 2003). Seis pacientes foram excluídos, pelo fato dos prontuários não apresentarem os dados necessários para o estudo.

Dentre os 121 pacientes incluídos no estudo, 60 (49,6%) eram do sexo feminino e 61 (50,4%) do sexo masculino. A média de idade dos pacientes foi de 49,39 anos, sendo o mais jovem com 14 anos e o mais velho com 78 anos.

Quanto à localização dos melanomas, 52,9% foram observados em membros; 29,7% no tronco, 12,4% em região de cabeça e pescoço e 5% em mais de um local (não necessariamente sincrônicos) (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência da localização anatômica dos melanomas

Local	N	Frequência (%)
Membros	64	52,9
Tronco	36	29,7
Cabeça e pescoço	15	12,4
Mais de um local	6	5,0

N: número de pacientes

Quanto aos achados histopatológicos: 74,4% eram do tipo extensivo superficial; 9,92% do tipo indeterminado; 4,95% *in situ*; 4,13% do tipo spitzóide;

3,3% do tipo nodular; 1,65% do tipo lentigo maligno melanoma e 1,65% do tipo desmoplásico.

Em relação ao Breslow, a média da espessura tumoral foi de 0,69mm, sendo o menor valor 0,2mm e o maior, 6,8mm. Quarenta e sete por cento dos pacientes apresentaram Breslow menor do que 0,75mm, 19% entre 0,75 e 1,5mm, 24% entre 1,5 e 4mm e 3,3% maior do que 4mm. Os melanomas *in situ*, somaram 6,6% e nestes pacientes o Breslow não foi calculado (não classificável) (Figura 6).

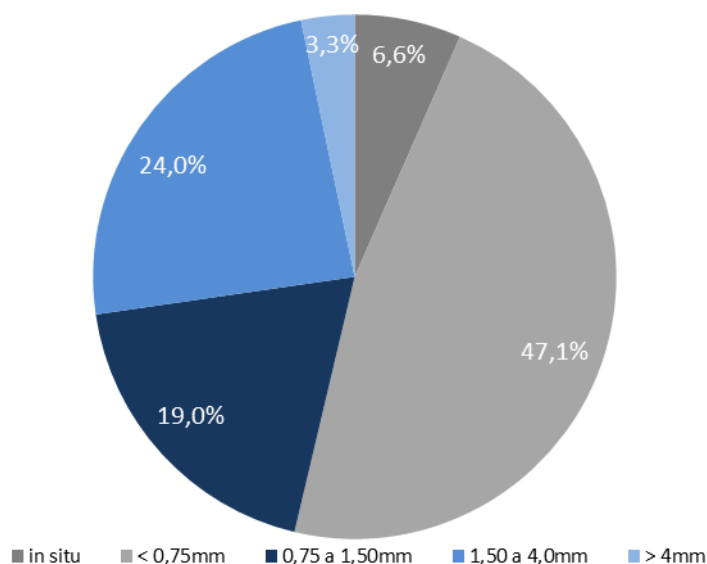


Figura 6 - Frequência de pacientes com melanoma segundo a espessura tumoral (Breslow).

Já em relação ao Clark: 47,1% dos pacientes tinham Clark III; 23,2% Clark II; 17,4% Clark IV; 5,8% Clark indeterminado; 4,9% *in situ* e 1,6% Clark V.

Quanto ao tipo de crescimento 67,8% apresentaram crescimento vertical; 17,3% crescimento radial e 14,9% indeterminado.

Em relação ao IM: 43,6% dos pacientes tiveram IM igual a zero e 56,4% tinham IM maior do que zero (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência do Índice Mitótico (IM)

IM	N	Frequência (%)
0	45	43,6
>0	58	56,4

IM: Índice Mitótico; N: número de pacientes

Quanto à presença ou não de regressão: 75,2% tinham presença de regressão negativa; 11,6% indeterminado e 13,2% positiva.

Já quanto à presença ou não de ulceração: 81% negativa; 4,13% não determinada, 7,4% positiva e 6,6% não classificável, pelo fato de serem melanomas *in situ* (Figura 7).

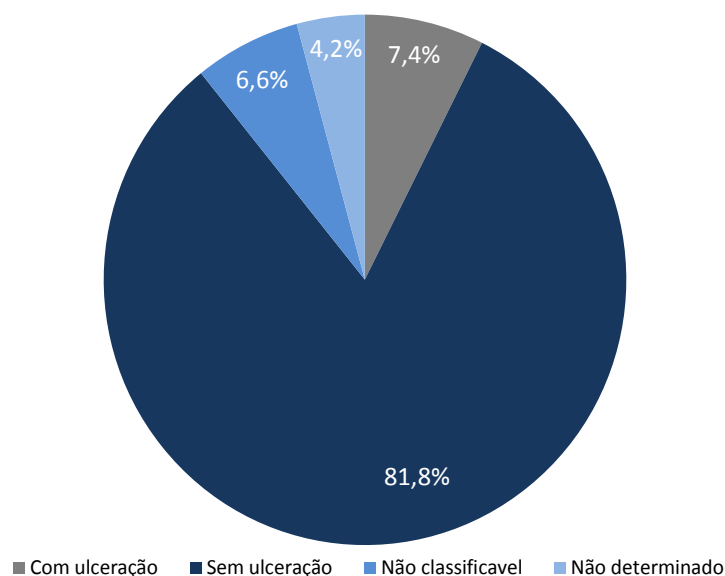


Figura 7 - Gráfico demonstrando a frequência de pacientes com ou sem a presença de ulceração do melanoma.

Foi avaliado o estadiamento dos pacientes no momento do diagnóstico sendo: 6,6% estágio 0 (zero); 63% estágio I (IA e IB); 28% estágio II (IIA, IIB, IIC); 2,4% estágio III (IIIA, IIIB, IIIC) (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência do estadiamento dos pacientes ao diagnóstico

Estádio	N	Frequência (%)
0	8	6,6
I	76	63
II	34	28
III	3	2,4

N: número de pacientes

Todos os pacientes foram submetidos à ampliação das margens cirúrgicas do melanoma. Já a pesquisa de linfonodo sentinela foi realizada em 63 pacientes (52,07%), sendo que sete pacientes (11,1%), tiveram o linfonodo sentinela positivo, realizando-se então, o esvaziamento linfonodal da região acometida. Em um paciente foi optado pelo esvaziamento linfonodal sem a pesquisa do linfonodo sentinela.

Foram observadas doze (9,9%) recidivas após tratamento cirúrgico do melanoma, sendo cinco linfonodais; oito à distância e uma metástase em trânsito (alguns pacientes apresentaram mais de um tipo de recidiva). As metástases observadas foram: pulmonar (quatro pacientes); hepática (três pacientes); cerebral (dois pacientes), óssea (três pacientes), tecido celular subcutâneo (dois pacientes), mamas (um paciente), retal (um paciente). Quanto ao tratamento após a recidiva: dois pacientes foram submetidos à radioterapia; seis pacientes à quimioterapia; três realizaram linfadenectomia e um paciente realizou exérese cirúrgica de nódulo pulmonar.

Em relação ao estado atual dos pacientes, 73,6% estão vivos sem doença; 16,5% indeterminado; 5% foram a óbito pelo melanoma; 2,5% estão vivos com

metástases de melanoma; 0,8% foram a óbito por câncer de mama; 0,8% foram a óbito por câncer de pulmão; 0,8% foram a óbito por câncer de próstata (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência do estado atual dos pacientes

Estado atual	N	Frequência (%)
Vivo sem doença	89	73,6
Vivo com doença	3	2,5
Óbito por melanoma	6	5,0
Óbito câncer pulmão	1	0,8
Óbito câncer mama	1	0,8
Óbito câncer próstata	1	0,8
Indeterminado	20	16,5

N: número de pacientes

Quanto ao desenvolvimento de outros tumores de pele: 56,2% não tiveram outro câncer de pele; 19% tiveram carcinoma basocelular ou espinocelular; 10,8% tiveram nevos atípicos; 3,3% tiveram outro melanoma, 1,6% tiveram CBC + nevos atípicos, 0,8% tiveram outro melanoma + nevos atípicos, 0,8% outros tumores de pele e 7,5% indeterminado.

Oito pacientes (6,6%) apresentaram tumores em órgãos internos.

6.2 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

O genótipo mais frequente em homozigose rara foi o de *ERCC1*, com frequência de 32,3% nos pacientes com melanoma, seguido por *XPA*, *XPC C/A* e *XPC PAT+*, com 24,79%. Já o gene que apresentou menor frequência de

homozigotos raros foi o *XPG*, com 6,61%. Levando-se em consideração o Modelo Dicotomizado Dominante, a frequência de homozigotos raros + heterozigotos mais frequente foi de 74,38% para o gene *XPA* G/A. Os segundos mais prevalentes foram o *XPC* C/A e o *ERCC1*, com 71,9%. Já o menos frequente foi o de *XPG*, com frequência de 47,93%.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para avaliar se a frequência genotípica dos genes estudados foi constante. Todos os polimorfismos dos genes estudados estavam em equilíbrio, exceto para *XPC* PAT+ e *ERCC1*, cujos alelos raros apareceram em 56% e 44%, respectivamente, na população estudada. (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de indivíduos para cada genótipo, frequências genotípicas e alélicas e resultado do teste χ^2 (Equilíbrio de Hardy Weinberg)

Gene	Genótipo	N	Frequência (%)	MAF (%)	H-W (χ^2)	H-W (p)
<i>ERCC1</i> C/T	CC	34	28,09	0,52	5,098	0,02*
	CT	48	39,67			
	TT	39	32,23			
<i>XPA</i> G/A	G/G	31	25,62	0,50	0,008	0,92
	G/A	60	49,59			
	A/A	30	24,79			
<i>XPC</i> C/A	CC	34	28,10	0,48	0,391	0,53
	CA	57	47,11			
	AA	30	24,79			
<i>XPC</i> PAT+	-/-	45	37,19	0,44	6,279	0,01*
	-/+	46	38,02			
	+/+	30	24,79			
<i>XPC</i> Lys939Gln	LysLys	39	32,23	0,45	1,210	0,27
	LysGln	54	44,63			
	LysGln	28	23,14			
<i>XPG</i> Asp1104His	Asp/Asp	63	52,07	0,27	0,210	0,65
	Asp/His	50	41,32			
	His/His	8	6,61			

N: número de pacientes; MAF: *Minor allele frequency* (frequência do alelo raro); H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; * p<0,05

6.3 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS *VERSUS* VARIÁVEIS CLÍNICAS

6.3.1 Comparação da média de idade entre os diferentes genótipos

O objetivo desta análise foi avaliar se a média de idade ao diagnóstico variou entre os diferentes genótipos. De acordo com os resultados, quando os três genótipos foram considerados, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de idade para estes genótipos (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto raro) para os polimorfismos estudados (ANOVA; $p > 0,05$).

Para os Modelos Dicotomizados, apenas para o polimorfismo *XPA G/A*, Modelo Dicotomizado Recessivo (homozigotos selvagens + heterozigotos *versus* homozigotos raros) houve diferença estatisticamente significativa (teste t; $p = 0,046$). Os pacientes portadores da variante rara apresentaram média de idade de diagnóstico menor (45,55 anos, $\pm 12,2$), comparados aos portadores dos alelos selvagens + heterozigotos (51,16 anos, $\pm 13,1$). A Tabela 6 e as Figuras 8-10 apresentam as médias de idade $\pm$ desvio padrão (DP), separadas por genótipos para todos os polimorfismos estudados.

Tabela 6 – Médias de idade $\pm$ desvio padrão, separadas por genótipos para os polimorfismos estudados

Polimorfismo	Média de idade em homozigotos selvagens – anos ($\pm$ DP)	Média de idade em heterozigotos – anos ($\pm$ DP)	Média de idade em homozigotos raros – anos ($\pm$ DP)	Média de idade em Dicotomizado Dominante – anos ($\pm$ DP)		Média de idade em Dicotomizado Recessivo – anos ($\pm$ DP)	
				Homozigotos selvagens	Heterozigotos + Homozigotos raros	Homozigotos selvagens + Heterozigotos	Homozigotos raros
<i>ERCCI</i>	49,56 ($\pm$ 14,4)	50,70 ($\pm$ 12,1)	48,95 ($\pm$ 13,6)	49,91 ($\pm$ 12,7)	49,91 ($\pm$ 12,7)	50,22 ($\pm$ 13,3)	48,95 ($\pm$ 13,6)
<i>XPA G/A</i>	52,00 ($\pm$ 13,0)	50,73 ($\pm$ 13,4)	45,55 ($\pm$ 12,6)	52,00 ($\pm$ 12,7)	49,04 ($\pm$ 13,3)	51,16 ($\pm$ 13,1)	45,55 ($\pm$ 12,2)*
<i>XPC C/A</i>	49,33 ($\pm$ 12,9)	50,19 ($\pm$ 12,0)	49,60 ($\pm$ 15,7)	49,33 ($\pm$ 12,9)	49,99 ($\pm$ 13,3)	49,88 ($\pm$ 12,3)	49,60 ($\pm$ 15,7)
<i>XPC PAT+</i>	47,70 ($\pm$ 13,8)	50,78 ($\pm$ 12,1)	51,47 ($\pm$ 13,9)	47,70 ($\pm$ 13,8)	51,03 ($\pm$ 12,7)	49,26 ($\pm$ 13,0)	51,47 ($\pm$ 13,9)
<i>XPC Lys939GLn</i>	48,63 ($\pm$ 12,5)	50,30 ($\pm$ 13,5)	50,46 ($\pm$ 15,7)	48,63 ($\pm$ 12,5)	50,35 ($\pm$ 13,5)	49,60 ($\pm$ 13,0)	50,46 ($\pm$ 13,8)
<i>XPG Asp1104His</i>	52,02 ($\pm$ 13,4)	47,39 ($\pm$ 12,8)	47,25 ($\pm$ 13,3)	52,02 ($\pm$ 13,4)	47,37 ($\pm$ 12,6)	49,99 ($\pm$ 13,3)	47,25 ($\pm$ 12,3)

DP: desvio padrão, *p<0,05

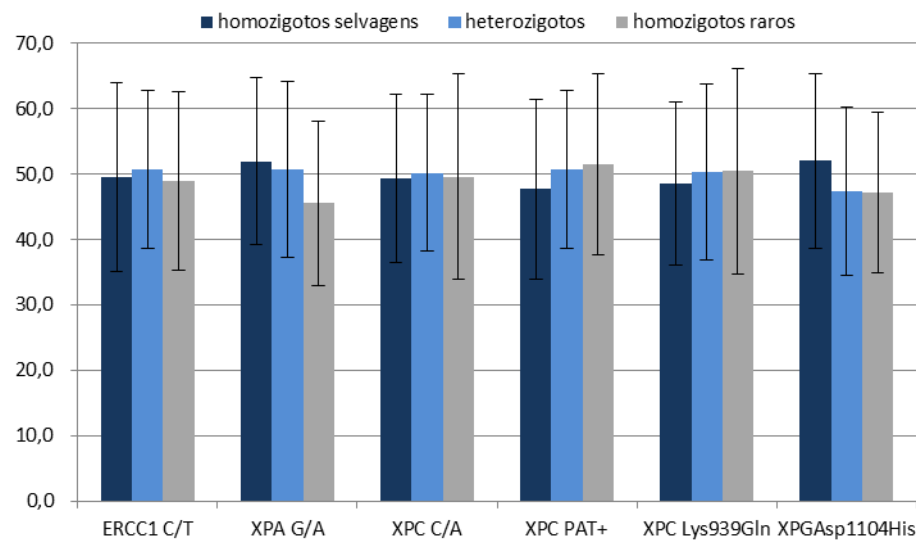


Figura 8 - Gráfico mostrando as médias de idade para cada genótipo dos polimorfismos estudados. As barras de erro representam o desvio padrão.

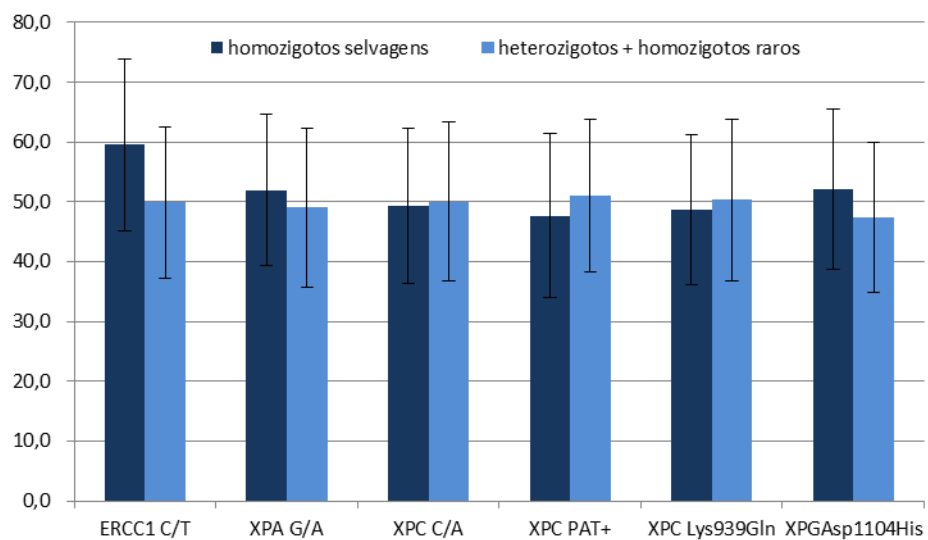


Figura 9 - Gráfico mostrando as médias de idade para cada genótipo no Modelo Dicotomizado Dominante. As barras de erro representam o desvio-padrão.

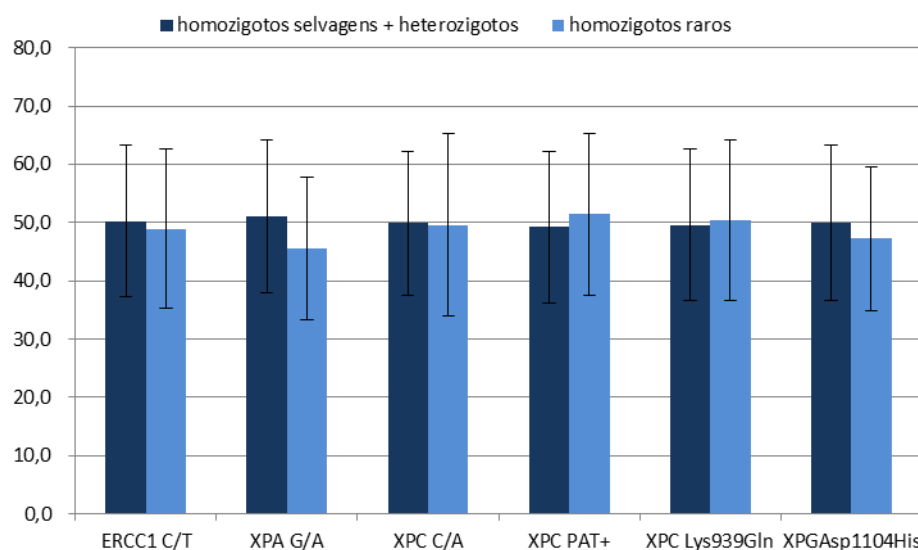


Figura 10 - Gráfico mostrando as médias de idade para cada genótipo no Modelo Dicotomizado Recessivo. As barras de erro representam o desvio-padrão; * $p < 0,05$.

6.4 COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS ENTRE OS DIFERENTES GÊNEROS

Foi realizado o teste χ^2 para avaliar se houve diferença na frequência dos genótipos entre os gêneros.

De acordo com os resultados, houve uma associação entre sexo e o polimorfismo do gene XPG Asp1104His, no Modelo Dicotomizado Dominante. Foi observado que portadores do genótipo heterozigoto + homozigoto raro apresentaram uma maior prevalência de pacientes do sexo masculino (60,3%) (teste χ^2 ; $p = 0,036$).

6.5 ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS COM DADOS DE EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA

As variáveis clínicas avaliadas foram: localização do tumor, subtipo histológico, níveis de Clark e Breslow, tipo de crescimento, presença de ulceração ou regressão, IM, presença de satelitose, estadiamento ao diagnóstico, necessidade de pesquisa de linfonodo sentinela, necessidade de linfadenectomia, presença de outros tumores de pele e presença de tumores primários em órgãos internos. Os resultados serão apresentados separadamente para cada polimorfismo estudado.

6.5.1 *ERCC1 C/T*

Em relação a este polimorfismo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada em relação aos dados clínicos.

6.5.2 *XPA G/A*

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o polimorfismo *XPA G/A* e o tipo de crescimento, de modo que, pacientes portadores do genótipo homozigoto selvagem tiveram maior frequência de melanoma com crescimento radial (52,4%) do que vertical (teste χ^2 ; $p=0,041$) (Tabela 7). Este resultado também foi encontrado para o Modelo Dicotomizado Dominante que demonstrou que portadores do genótipo homozigoto selvagem apresentaram mais melanoma com crescimento radial (52,4%) e, por outro lado, pacientes com presença do alelo raro (heterozigotos + homozigotos raros), apresentaram mais crescimento vertical do tumor (76,8%) (teste χ^2 ; $p=0,009$) (Tabela 8).

Tabela 7 – Resultado da associação entre os genótipos do polimorfismo *XPA* G/A e Crescimento.

		Genótipo N (%)			p
Variável		GG	AG	AA	
Crescimento	Radial	11 (52,4)	7 (33,3)	3 (14,3)	0,041
	Vertical	19 (23,2)	42 (51,2)	21 (25,6)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

Tabela 8 – Resultado da associação entre os genótipos (Modelo Dicotomizado Dominante) do polimorfismo *XPA* G/A e Crescimento.

		Modelo Dicotomizado Dominante N (%)		p
Variável		GG	AG+AA	
Crescimento	Radial	11 (52,4)	10 (47,6)	0,009
	Vertical	19 (23,2)	63 (76,8)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

6.5.3 *XPC* C/A

O polimorfismo do *XPC* C/A foi associado ao IM, de modo que, observamos uma maior frequência de pacientes heterozigotos (63,6%) com IM igual a zero, do que IM>0 e maior frequência dos homozigotos selvagens (37,5%) com IM>0 do que IM=0 (teste χ^2 ; $p=0,041$) (Tabela 9). Para o Modelo Dicotomizado Dominante, pacientes heterozigotos + homozigotos raros apresentaram maior frequência (81,1%) de IM igual a zero em comparação com IM>0 (teste χ^2 ; $p=0,035$) (Tabela 10). Para o Modelo Dicotomizado Recessivo, encontramos associação com o tipo histológico, no qual portadores do alelo selvagem (homozigotos selvagens + heterozigotos) apresentavam maior frequência (80%) de subtipo histológico extensivo superficial quando comparado com outros subtipos (teste χ^2 ; $p=0,04$) (Tabela 11).

Tabela 9 – Resultado da associação entre os genótipos do polimorfismo *XPC C/A* e Índice Mitótico.

		Genótipo N (%)			p
Variável		CC	CA	AA	
Índice Mitótico	0,0	8 (18,2)	28 (63,6)	8 (18,2)	0,041
	>0,0	21 (37,5)	22 (39,3)	13 (23,2)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.**Tabela 10** – Resultado da associação entre os genótipos (Modelo Dicotomizado Dominante) do polimorfismo *XPC C/A* e Índice Mitótico.

		Modelo Dicotomizado Dominante N (%)		p
Variável		CC	CA+AA	
Índice Mitótico	0,0	8 (18,2)	36 (81,8)	0,035
	>0,0	21 (37,5)	35 (62,5)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.**Tabela 11** – Resultado da associação entre os genótipos (Modelo Dicotomizado Recessivo) do polimorfismo *XPC C/A* e Tipo Histológico.

		Modelo Dicotomizado Recessivo N (%)		p
Variável		CC+CA	AA	
Subtipo Histológico	Extensivo Superficial	72 (80,0)	18 (20,0)	0,040
	Outros	13 (59,1)	9 (40,9)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

6.5.4 *XPC PAT+*

O polimorfismo do gene *XPC PAT+* foi associado ao subtipo histológico, de maneira que, no Modelo Dicotomizado Recessivo, os pacientes homozigotos selvagens + heterozigotos apresentaram maior frequência de crescimento extensivo superficial (80%) do que outros subtipos histológicos (59,1%) (teste χ^2 ; $p=0,040$)

(Tabela 12).

Este polimorfismo também foi associado ao estadiamento. Quando comparados os genótipos isoladamente, os homozigotos selvagens apresentaram maior frequência de estádios II e III (51,4%) do que estágio I, enquanto que a maior parte dos heterozigotos (46,1%) apresentou estágio I (teste χ^2 ; $p=0,039$) (Tabela 13). Já no Modelo Dicotomizado Dominante, foi observado que dentre os pacientes heterozigotos + homozigotos raros, a maior parte (71,1%) apresentou estágio I, quando comparados aos estádios II e III (teste χ^2 ; $p=0,02$) (Tabela 14).

Tabela 12 – Resultado da associação entre os genótipos (Modelo Dicotomizado Recessivo) do polimorfismo *XPC* PAT+ e Tipo Histológico.

Modelo Dicotomizado Recessivo N (%)				
Variável		(-/-) + (-/+)	+/+	p
Subtipo Histológico	Extensivo Superficial	72 (80,0)	18 (20,0)	0,040
	Outros	13 (59,1)	9 (40,9)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

Tabela 13 – Resultado da associação entre os genótipos do polimorfismo *XPC* PAT+ e Estadiamento.

Genótipo N (%)					
Variável		-/-	-/+	+/+	p
Estadiamento	I	22 (28,9)	35 (46,1)	19 (25,0)	0,039
	II+III	19 (51,4)	9 (24,3)	9 (24,3)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

Tabela 14 – Resultado da associação entre os genótipos (Modelo Dicotomizado Dominante) do polimorfismo *XPC* PAT+ e Estadiamento.

Modelo Dicotomizado Dominante N (%)			
Variável	-/-	(-/+) + (+/+)	p
Estadiamento	I	22 (28,9)	0,020
	II+III	19 (51,4)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

6.5.5 *XPC* Lys939Gln

O polimorfismo do gene *XPC* Lys939Gln foi associado ao subtipo histológico. Observou-se que dentre os pacientes homozigotos raros, houve maior frequência de subtipos histológicos diferentes do extensivo superficial (45,5%) em comparação com o subtipo histológico extensivo superficial (teste χ^2 ; $p=0,020$) (Tabela 15).

Tabela 15 – Resultado da associação entre os genótipos do polimorfismo *XPC* Lys939Gln e Tipo Histológico.

Genótipo N (%)				
Variável	LysLys	LysGln	GlnGln	p
Subtipo Extensivo Superficial	32 (35,6)	43 (47,8)	15 (16,7)	0,020
Histológico Outros	6 (27,3)	6 (27,3)	10 (45,5)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

6.5.6 *XPG* Asp1104His

Em relação ao polimorfismo do gene *XPG* não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre este polimorfismo e os dados clínicos avaliados.

6.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE ALELOS E DADOS DE EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA

As mesmas análises também foram realizadas buscando-se associações entre as frequências alélicas e as variáveis clínicas estudadas.

6.6.1 *ERCC1* C/T

Para o polimorfismo *ERCC1* C/T não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os alelos e os dados clínicos avaliados.

6.6.2 *XPA* G/A

A análise dos alelos do SNP do gene *XPA* G/A, demonstrou que houve associação com o Breslow. Dentre os pacientes com alelos raros, houve maior frequência (77,3%) de níveis de Breslow entre 1,5 e 4mm do que outros níveis (teste χ^2 ; $p=0,043$) (Tabela 16). Houve também associação com o tipo de crescimento tumoral (radial ou vertical). Entre os pacientes com alelos selvagens, houve maior frequência de crescimento radial (69%) do que vertical (teste χ^2 ; $p=0,019$) (Tabela 17). Dentre os pacientes com alelos raros, a maior parte (70%) apresentou ulceração positiva (teste χ^2 ; $p=0,04$) (Tabela 18).

Tabela 16 - Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo *XPA* G/A e Breslow.

		Alelos N (%)		
Variável		G	A	p
Breslow	<1,00mm	85 (55,2)	69 (44,8)	0,043
	1,00-1,50mm	24 (50,0)	24 (50,0)	
	1,50-4,00mm	5 (22,7)	17 (77,3)	
	>4,00mm	4 (50,0)	4 (50,0)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

Tabela 17 – Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo *XPA* G/A e Crescimento.

		Alelos N (%)		
Variável		G	A	P
Crescimento	Radial	29 (69,0)	13 (31,0)	0,019
	Vertical	80 (48,8)	84 (51,2)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

Tabela 18 – Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo *XPA* G/A e Ulceração.

		Alelos N (%)		
Variável		G	A	p
Ulceração	Negativa	106 (54,1)	90 (45,9)	0,040
	Positiva	6 (30,0)	14 (70,0)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

6.6.3 *XPC* C/A

A análise dos alelos do polimorfismo de *XPC* C/A demonstrou que houve associação com o local do melanoma. Dentre os pacientes com alelos selvagens, a maior parte (60,5%) apresentou melanoma em membros, quando comparado a outras

regiões (teste χ^2 ; $p= 0,036$) (Tabela 19). Também houve associação com o estadiamento, de modo que, dentre os pacientes com alelos raros, houve maior frequência (83,3%) de estádios III do que os demais estádios (teste χ^2 ; $p=0,044$) (Tabela 20).

Tabela 19 - Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo *XPC C/A* e Localização.

		Alelos N (%)		
Variável		C	A	p
Localização	Face	11 (36,7)	19 (63,3)	0,036
	Tronco	41 (47,7)	45 (39,5)	
	Membros	69 (60,5)	45 (39,5)	
	+ de 1 local	4 (33,3)	8 (66,7)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

Tabela 20 - Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo *XPC C/A* e Estadiamento.

		Alelos N (%)		
Variável		C	A	p
Estadiamento	I	74 (48,7)	78 (51,3)	0,044
	II	42 (61,8)	26 (38,2)	
	III	1 (16,7)	5 (83,3)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

6.6.4 *XPC PAT+*

A análise dos alelos do polimorfismo de *XPC PAT+* demonstrou que houve associação com o local do melanoma. O teste χ^2 demonstrou que, dentre os pacientes

com o alelo selvagem, 66,7% apresentaram melanoma em membros (teste χ^2 ; $p=0,007$) (Tabela 21).

Tabela 21 – Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo *XPC* PAT+ e Localização.

		Alelos N (%)		
Variável		-	+	p
Localização	Face	12 (40,0)	18 (60,0)	0,007
	Tronco	44 (51,2)	42 (48,8)	
	Membros	76 (66,7)	38 (33,3)	
	+ de 1 local	4 (33,3)	8 (66,7)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

6.6.5 *XPC* Lys939Gln

A análise dos alelos do polimorfismo do gene *XPC* Lys939Gln demonstrou haver associação com os subtipos histológicos do melanoma, de maneira que, entre os portadores de alelos selvagens, a maior parte (59,4%) apresentou subtipo extensivo superficial em relação aos outros tipos histológicos (teste χ^2 ; $p=0,026$) (Tabela 22).

Tabela 22 - Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo *XPC* Lys939Gln e Tipo Histológico.

		Alelos N (%)		
Variável		Lys	Gln	p
Tipo Histológico	Extensivo Superficial	107 (59,4)	73 (40,6)	0,026
	Outros	18 (40,9)	26 (59,1)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

6.6.6 *XPG* Asp1104His

Os alelos do polimorfismo do gene *XPG* Asp1104His apresentaram associação com o estadiamento ao diagnóstico. Dentre os pacientes portadores de alelos selvagens, houve maior frequência (77%) de estágio I e menor frequência (33,3%) de estágio III (teste χ^2 ; $p=0,023$). Dentre os pacientes com alelo raro, a maior parte (66,7%) tinha estágio III em comparação aos outros estádios (Tabela 23).

Tabela 23 - Resultado da associação entre os alelos do polimorfismo *XPG* Asp1104His e Estadiamento.

		Alelos N (%)		
Variável		Asp	His	p
Estadiamento	I	117 (77,0)	35 (23,0)	0,023
	II	45 (66,2)	23 (33,8)	
	III	2 (33,3)	4 (66,7)	

N: número de pacientes; $p \leq 0,05$.

6.7 MODELO DE REGRESSÃO LOGÍSTICA UNIVARIADA – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS/ALELOS E VARIÁVEIS CLÍNICAS

Baseado nos resultados obtidos da análise de qui quadrado, foi possível identificar genótipos ou alelos associados com os dados de evolução clínica ($p < 0,05$). Assim, foram realizados modelos de regressão logística univariada utilizando as variáveis clínicas como variável dependente e os genótipo/alelos associados como variáveis independentes.

Em relação ao tipo de crescimento tumoral, no Modelo Dicotomizado Dominante, os heterozigotos + homozigotos raros do polimorfismo do *XPA* G/A demonstraram ser fator de risco para o crescimento vertical (OR 3,474; 1,344 - 9,897 95% IC; p=0,011). O mesmo resultado foi encontrado em relação ao alelo raro deste mesmo polimorfismo que demonstrou ser fator risco para o crescimento vertical do tumor (OR 2,342; 1,138 - 4,823 95% IC; p=0,021).

Em relação ao IM, no Modelo Dicotomizado Dominante, os heterozigotos + homozigotos raros do polimorfismo do *XPC* C/A demonstraram ser fator protetor para o IM>0 (OR 0,370; 0,145 – 0,946 95% IC; p=0,038).

Já em relação ao Estadiamento, no Modelo Dicotomizado Dominante, os heterozigotos + homozigotos raros do polimorfismo do *XPC* PAT+ demonstraram ser fator protetor para o estágio II+III (OR 0,386; 0,171 - 0,870; p=0,022).

Em relação ao subtipo histológico, no Modelo Dicotomizado Recessivo, os homozigotos raros dos polimorfismos do *XPC* C/A, PAT+ e Lys939Gln, demonstraram ser fatores de risco para outros subtipos histológicos (OR 2,769; 1,024 - 7,486 95% IC; p=0,045; OR 2,769; 1,024 - 7,486 95% IC; p=0,045; OR 3,556; 1,089 - 11,611 95% IC; p=0,036, respectivamente).

Já em relação a ulceração, o alelo raro do polimorfismo *XPA* G/A demonstrou ser fator de risco para a presença de ulceração (OR 2,748; 1,014 - 7,446 95% IC; p=0,047)

A Tabela 24 mostra os resultados da regressão logística juntamente com os valores de OR para cada genótipo/alelo analisado.

Tabela 24 - Resultado da regressão logística – modelo de associação entre variáveis clínicas e os genótipos/alelos analisados.

Variável	Modelo	Polimorfismo	p	OR	IC 95%	
					Inferior	Superior
Crescimento	Genótipos	<i>XPA</i> G/A(hetero)	0,025*	3,474	1,166	10,349
		<i>XPA</i> G/A (homo raro)	0,053	4,053	0,980	16,757
	MDD	<i>XPA</i> G/A (hetero + homo raro)	0,011*	3,647	1,344	9,897
	Alelo	<i>XPA</i> G/A (alelo raro)	0,021*	2,342	1,138	4,823
Índice Mitótico	Genótipos	<i>XPC</i> IV11(hetero)	0,017*	0,299	0,112	0,803
		<i>XPC</i> IV11 (homo raro)	0,433	0,619	0,187	2,054
	MDD	<i>XPC</i> IV11 (hetero + homo raro)	0,038*	0,370	0,145	0,946
Estadiamento	Genótipos	<i>XPC</i> PAT+ (hetero)	0,013*	0,298	0,114	0,774
		<i>XPC</i> PAT+ (homo raro)	0,240	0,548	0,201	1,495
	MDD	<i>XPC</i> PAT+ (hetero + homo raro)	0,022*	0,386	0,171	0,870
Subtipo Histológico	Genótipos	<i>XPC</i> 15 (hetero)	0,635	0,744	0,220	2,522
		<i>XPC</i> 15 (homo raro)	0,036*	3,556	1,089	11,611
	MDR	<i>XPC</i> PAT+ (homo raro)	0,045*	2,769	1,024	7,486
	MDR	<i>XPC</i> IV11 (homo raro)	0,045*	2,769	1,024	7,486
	MDR	<i>XPC</i> 15 (homo raro)	0,028*	2,117	1,083	4,140
Ulceração	Alelo	<i>XPA</i> G/A (alelo raro)	0,047*	2,748	1,014	7,446

MDD: Modelo Dicotomizado Dominante; MDR: Modelo Dicotomizado Recessivo; IC: Intervalo de Confiança; OR: *Odds Ratio*; *p<0,05

6.8 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE *XPC*

Foi realizada análise de haplótipos para verificar associação dos polimorfismos de *XPC* Lys939Gln (rs2228001), *XPC* C/A (rs2279017) e *XPC* PAT+ (in/del) (rs72163318), apresentados nesta mesma ordem, com as variáveis de evolução clínica. De acordo com as análises, houve desequilíbrio de ligação entre os três polimorfismos estudados, com $D' = 0,89$ (Figura 11). Somente esses polimorfismos foram incluídos na análise, pois estão localizados fisicamente próximos no mesmo cromossomo, com distância total de 8 kb entre eles.

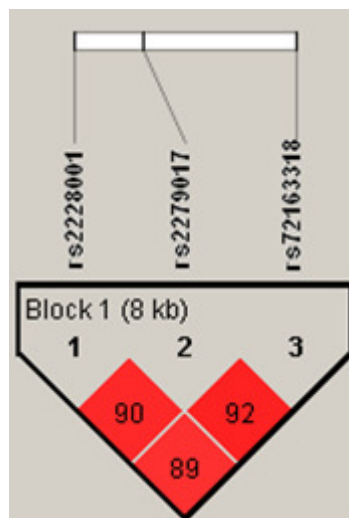


Figura 11 - Representação esquemática do programa *Haploview*. A imagem mostra a formação de um bloco contendo os três polimorfismos estudados, que se apresentam em desequilíbrio de ligação, com $D' = 0,89$.

As frequências observadas para os haplótipos ACA (alelos selvagens de todos os polimorfismos) e CAT (contendo os alelos raros de todos os polimorfismos),

foram de 48,6% e 40,4%, respectivamente. Os demais haplótipos apresentaram frequência de 3,4% para AAA (alelos selvagens Lys939Gln e PAT+ e alelo raro C/A), 2,9% para CAA (dois alelos raros Lys939Gln e C/A e alelo selvagem PAT+), 1,7% para AAT (alelos raros C/A e PAT+ e alelo selvagem Lys939Gln) e 1,3% para CCA (alelo raro Lys939Gln e alelos selvagens PAT+ e C/A). Observamos uma diferença estatisticamente significativa entre o haplótipo AAT ($p=0,04$) e a presença de regressão tumoral e entre o CCA e presença de tumores de órgãos internos ($p<0,001$). O Anexo 2 apresenta os resultados das associações entre os haplótipos e todas as variáveis clínicas estudadas.

6.9 ASSOCIAÇÃO ENTRE SOBREVIDAS GLOBAL E LIVRE DE DOENÇA E OS POLIMORFISMOS ESTUDADOS

Por meio da curva de Kaplan-Meier, foram analisadas a sobrevida global e livre de doença nos pacientes nos diferentes polimorfismos estudados. A análise foi realizada para os três modelos propostos: nos diferentes genótipos separadamente (homozigotos selvagens x heterozigotos x homozigotos raros), Modelo Dicotomizado Dominante (homozigotos selvagens x heterozigotos + homozigotos raros) e Modelo Dicotomizado Recessivo (homozigotos selvagens + heterozigotos x homozigotos recessivos). Contudo, em nenhuma análise foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p\leq 0,05$). O tempo médio de seguimento dos pacientes foi de 48 meses $\pm$ 19.

7 DISCUSSÃO

O melanoma é o câncer de pele mais letal e sua incidência vem aumentando em todo o mundo ao longo dos anos e nos Estados Unidos, em 2012, foram estimados 76.750 novos casos de melanoma (SIEGEL et al. 2012).

A exposição aos raios UV, atua como um fator de risco chave para o desenvolvimento da doença. A via NER é responsável pelo reparo de dois tipos de dano ao DNA causados pelos raios UV, os dímeros de pirimidina e fotoprodutos 6-4 (POVEY et al. 2007).

O XP é uma doença autossômica recessiva rara, descrita por Moriz Kaposi em 1874 (HEBRA e KAPOSÍ 1874). Em 1968, James Cleaver reportou a deficiência nos genes de reparo por excisão de nucleotídeos, através de estudo em cultura de fibroblastos, o que deu base para a correlação entre exposição solar, dano ao DNA, mutações somáticas e câncer de pele (CLEAVER et al. 1968; DIGIOVANNA e KRAEMER 2012).

Os pacientes portadores de XP possuem mutações em genes de reparo da via NER, aumentando a incidência de câncer não melanoma em 10.000 vezes e em 2.000 vezes para melanoma, em indivíduos menores de 20 anos, demonstrando a importância do reparo do DNA para a prevenção do câncer (BRADFORD et al. 2011; DIGIOVANNA e KRAEMER 2012). Seguindo este raciocínio, polimorfismos da via NER, poderiam diminuir a capacidade de reparo do DNA danificado e levar ao aumento do risco para desenvolvimento de câncer de pele.

Alguns estudos demonstraram a correlação entre polimorfismos dos genes da via NER e câncer de pele. Um estudo realizado por BACCARELLI et al. (2004), demonstrou que os polimorfismos do gene *XPD* podem aumentar o risco para melanoma em pacientes com idade maior de 50 anos e portadores do SNP Asp312Asn, em pacientes com ausência de nevos displásicos, mas portadores do SNP Lys751Gln e naqueles com pouca capacidade de bronzeamento e portadores dos dois SNPs: 312Asn e 751Gln. Outro estudo realizado na Alemanha avaliou a presença de três polimorfismos no gene *XPC*: PAT+; substituição de citosina por adenina (*XPC* C/A; rs2279017) e Lys939Gln (rs2228001) e observou uma associação com o aumento do risco de melanoma quando ajustado para fatores como idade, tipo de pele e número de nevos (BLANKENBURG et al. 2005b). Em estudo de LI et al. 2006, os autores encontraram associação entre o aumento do risco do melanoma cutâneo e variantes polimórficas do *XPD*, 751Gln e 312Asn, quando comparados aos demais genótipos. GAO et al. (2013), demonstraram que os haplótipos composto de três SNPs de *ERCC1*: C/T, C/G e G/C, foram mais frequente em caucasianos com melanoma do que em caucasianos saudáveis ou afroamericanos.

Em um estudo anterior realizado por nosso grupo, com o objetivo de estudar os polimorfismos nos genes da via NER na população brasileira, GONÇALVES et al. (2011), analisaram polimorfismos em casos e controles para melanoma. Os polimorfismos da via NER avaliados foram: *ERCC1* C/T, *XPA* G/A, *XPC* C/A, *XPC* PAT+, *XPC* Lys939Gln e *XPG* Asp1104His. Em relação aos polimorfismos *ERCC1* C/T e *XPA* G/A, os resultados não indicaram que os alelos variantes, apresentassem associação positiva para o risco do melanoma. Quanto aos polimorfismos *XPC* C/A e *XPC* PAT+, a análise demonstrou que tanto os indivíduos heterozigotos quanto os

homozigotos para o alelo polimórfico apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento do melanoma. Já o polimorfismo *XPC* Lys939Gln, apresentou aumento do risco para desenvolvimento de melanoma apenas nos pacientes com genótipo GlnGln. Por fim, em relação ao polimorfismo *XPB* Asp1104His, demonstrou-se um efeito protetor em relação ao melanoma naqueles indivíduos com genótipo HisHis.

Outros estudos mostraram que a presença de polimorfismos em genes de reparo do DNA pode influenciar a evolução do melanoma. LIU et al. (2005) avaliaram o impacto dos SNPs *XPB* Lys751Gln e *ERCC1* C/T e identificaram uma associação entre a variante rara de *ERCC1* e sobrevida global. Já SCHRAMA et al. (2011) identificaram os SNPs *XPB* Lys751Gln e *XPB* Asp1104His como fatores prognósticos independentes para a evolução do melanoma. O genótipo raro *XPB* HisHis foi associado com diminuição de sobrevida. Já para o *XPB*, foi observado um significativo impacto do genótipo raro *XPB* GlnGln com pior prognóstico comparado com pacientes com genótipo selvagem *XPB* LysLys. LI et al. (2013), associaram os seguintes polimorfismos ao aumento do risco de morte por melanoma: *XPD* (rs28720291), *XPB* (rs4150314), *XPC* (rs2470458) e *XPB* (rs50871).

Em nosso estudo, comparamos a evolução da doença em pacientes do Hospital A.C. Camargo com melanoma em relação à presença de polimorfismos nos genes *ERCC1*, *XPB*, *XPC* e *XPB*.

7.1 ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS CLÍNICOS

Dentre os 121 pacientes estudados houve um equilíbrio em relação aos gêneros: 60 pacientes (49,6%) eram do sexo feminino e 61 (50,4%) do sexo masculino, diferentemente de outros estudos. Em um estudo realizado em Londrina, a prevalência de melanomas em mulheres foi de 54,46% e de 46,54% em homens (GON et al. 2001). Outro estudo realizado por NASER (2011) encontrou 56% dos casos de melanoma em mulheres e 44% em homens.

A média de idade dos pacientes neste estudo foi de 49,39 anos, sendo pacientes mais jovens quando comparados à literatura. O paciente mais jovem tinha 14 anos, idade precoce para o aparecimento da doença e o mais velho, 78 anos. NASER (2011) encontraram 66,3% dos casos de melanoma acima dos 50 anos e AVILÉS-IZQUIERDO et al. (2012) encontraram uma média de idade de 58,5 anos. Outro estudo realizado por SIEGEL et al. (2012) encontrou uma média de idade de 63 anos para homens e 56 para mulheres. Já MCLOONE et al. (2013) encontraram uma média de idade de 57,6 anos (34 a 74 anos).

Nosso estudo detectou que a maior parte dos melanomas localizou-se em membros (52,9%), seguido do tronco (29,7%), cabeça e pescoço (12,4%) e mais de um local (5%). Porém, NASER (2011) encontraram resultados diferentes, onde 47% dos melanomas apareceram em tronco e 35,9% em membros. Segundo um estudo realizado por CALLENDER et al. (2011), os melanomas de cabeça e pescoço e tronco apresentaram pior prognóstico. Neste estudo, os melanomas de cabeça e pescoço apresentaram uma menor incidência de linfonodo sentinela positivo, porém as sobrevidas global e livre de doença e foram menores. Este fato pode ser associado

a uma grande incidência de linfonodos falsos negativos em tumores desta região (CALLENDER et al. 2011). Os melanomas de tronco apresentaram maior incidência de linfonodos sentinelas positivos (CALLENDER et al. 2011).

Quanto aos subtipos histológicos, o extensivo superficial foi o mais prevalente (74,4%). O segundo tipo histológico mais frequente na literatura, o nodular, responsável por 15 a 30% dos casos, apareceu em apenas 3,3% dos casos no nosso estudo. Já o lentigo maligno melanoma, que segundo a literatura é responsável por 5% dos casos de melanoma, apareceu em 1,65% dos casos. Subtipos histológicos raros como o spitzóide e o desmoplásico apareceram com frequências altas, 4,13% e 1,65%, respectivamente. O melanoma *in situ* ocorreu em 4,95% e o indeterminado, em 9,92%. BORGES et al. (2007) encontraram 61,6% de casos de melanoma extensivo superficial, enquanto NASER (2011) encontraram 51,6% de casos de melanoma extensivo superficial, 37% nodular, 6% acral, 5,4% lentigo maligno melanoma. Em um estudo realizado no Texas, por FORMAN et al. (2008), o subtipo lentigo maligno melanoma foi responsável por 56% dos casos, enquanto o extensivo superficial, por 29%.

A média da espessura tumoral (Breslow) encontrada no nosso estudo foi de 0,69mm. A maior parte dos pacientes teve Breslow menor que 0,75mm (47%). O segundo mais frequente (24%) foi entre 1,5 e 4mm, seguido por 19% entre 0,75 e 1,5mm e 3,3% maior de 4mm. Neste estudo quase metade dos pacientes apresentaram melanoma fino (menor que 1mm), que é considerado um melanoma com melhor prognóstico. Contudo, NASER (2011) identificaram 41,3% dos melanomas entre 0 e 0,5mm; 25% entre 0,5 e 1mm; 9,73% entre 1 e 1,5mm; 4,42% entre 1,5 e 2mm e 23,3% maior de 2mm.

Neste presente estudo, 67,8% dos pacientes apresentaram crescimento vertical do melanoma, o que já demonstra um tipo de tumor mais infiltrativo ao diagnóstico, enquanto 17,3% tiveram crescimento radial.

Em relação ao IM, 56,4% tiveram IM>0 e 43,6%, igual a zero. A presença de pelo menos uma mitose já é considerada como um fator de pior prognóstico do melanoma e a partir da 7ª edição do AJCC, o IM>0 é indicação para pesquisa de linfonodo sentinela. Segundo ROACH et al. (2010), pacientes com IM>6 mitoses/mm² foram relacionados a um Breslow mais espesso, presença de ulceração e duas vezes mais linfonodo sentinela positivo do que o grupo com IM<6.

Até 2009, a presença de regressão era considerada um dos fatores de indicação de pesquisa de linfonodo sentinela. Portanto, para os pacientes deste estudo, cujos diagnósticos ocorreram, em sua maioria, entre 2004 e 2006, a presença da regressão levou a pesquisa do linfonodo sentinela. Apenas 13,2% dos pacientes deste estudo, tiveram presença de regressão positiva. Alguns consideram que a presença de regressão pode subestimar o verdadeiro Breslow ao diagnóstico, já outros sugerem que houve resposta imune ao tumor, sendo, portanto, um fator de bom prognóstico (BURTON et al. 2011). Segundo REQUENA et al. (2009), a regressão inicia-se com infiltrado inflamatório, mas isto só indica que houve resposta imune ao tumor, porém não se sabe se esta resposta será efetiva para bloquear o crescimento tumoral.

A presença de ulceração já era considerada, antes de 2009, como um fator de indicação de linfonodo sentinela e ainda permanece como um fator de pior prognóstico. Neste estudo, apenas 7,4% dos pacientes tiveram ulceração positiva. BALCH et al. (2009) observaram que a sobrevida de pacientes com melanoma

ulcerado é menor comparando-se com pacientes com melanoma e mesmo Breslow, porém não ulcerado, mas é similar a pacientes com Breslow maior, porém não ulcerado. Como exemplo, a sobrevida em 5 anos em pacientes com um tumor T3a (não ulcerado) é 79%, enquanto que pacientes com tumor T2b (ulcerado) é 82% (BALCH et al. 2009).

A maioria dos pacientes deste estudo apresentou estádios IA ou IB ao diagnóstico (63%) e 28% apresentaram estádios IIA, IIB ou IIC, ou seja, grande parte dos pacientes deste estudo apresentaram estádios iniciais da doença, que apresentam melhor prognóstico. Segundo BALCH et al. (2009), a sobrevida em 5 e 10 anos em pacientes T1a (estádio IA) foi 97% e 93%, respectivamente, enquanto que para os pacientes T4b (estádio IIC), foi 53% e 39%.

De modo geral, a maioria dos pacientes estudados apresentaram características clínicas de bom prognóstico como: subtipo histológico extensivo superficial, Breslow menor que 0,75mm, ulceração e regressão negativas e estágio I ao diagnóstico. As únicas exceções foram o crescimento vertical e o IM>0 que são fatores de pior prognóstico.

Quanto ao tratamento realizado, todos os pacientes foram submetidos a ampliação das margens cirúrgicas, segundo a preconização do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN): melanoma *in situ*, ampliação de margens em 0,5cm; Breslow < ou = 1mm, ampliação em 1 cm; Breslow entre 1,01 a 2mm, ampliação em 1 a 2 cm; Breslow > 2,01, ampliação em 2 cm. A pesquisa do linfonodo sentinela foi realizada em 52,07% dos pacientes. Segundo a NCCN, desde 2009, as indicações para pesquisa de linfonodo sentinela são: Breslow > ou = 0,75mm, IM>0 ou ulceração positiva. Destes pacientes que realizaram a pesquisa do

linfonodo sentinela, em 11,1% a pesquisa foi positiva, realizando-se então, o esvaziamento da cadeia linfonodal acometida. Segundo BALCH et al. (2009), a sobrevida em 5 anos, em pacientes N1a (1 linfonodo com micrometástase), foi 70%, enquanto em pacientes N3 (4 ou mais linfonodos ou metástase em trânsito ou satelitose e metástase linfonodal), foi 39%.

Neste estudo, apenas 9,9% dos pacientes tiveram recidivas, sendo a maioria à distância (66,6%), 41,6% em cadeias linfonodais de drenagem do melanoma e 8,3% de metástases em trânsito (dois pacientes tiveram mais de um tipo de metástase). Os órgãos mais acometidos por metástases foram: pulmão (quatro pacientes) e fígado (três pacientes). Estes pacientes receberam variados tipos de tratamento e alguns, mais de um tipo: cirúrgico, quimioterápico ou radioterápico. Em um estudo realizado por MERVIC (2012), com 7.338 pacientes, 16,8% dos homens e 13% das mulheres tiveram metástases, totalizando 1.078 pacientes. Quanto às metástases à distância em neste estudo, 12,4% eram homens e 8,7%, mulheres. A metástase mais prevalente foi em cadeias linfonodais de drenagem (50,9%), seguido por metástase à distância, 25,3% e satelitoses ou meta em trânsito, 23,7%. Segundo BALCH et al. (2009), a sobrevida em 1 ano em pacientes M1a (metástase em pele, subcutâneo ou linfonodos à distância), foi 62%; em pacientes M1b (metástase pulmonar), foi 53% e em M1c (metástase em outros órgãos), foi 33%. Já segundo SIEGEL et al. (2012) a sobrevida em 5 anos para pacientes com melanoma localizado é de 98,2%, enquanto para aqueles com metástase regional e à distância é, respectivamente, 61,7% e 15,2%.

Até a última análise de dados dos prontuários, a maioria dos pacientes estudados (73,6%) estava viva e sem doença. Apenas 5% dos pacientes tiveram óbito pelo melanoma e 2,5%, estavam vivos, porém com metástases de melanoma.

7.2 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS *VERSUS* VARIÁVEIS CLÍNICAS

7.2.1 Comparação da média de idade entre os polimorfismos

A comparação das médias de idade foi realizada entre os diferentes genótipos isoladamente (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto raro) e entre os genótipos nos Modelos Dicotomizado Dominantes (homozigoto selvagem *versus* heterozigotos e homozigotos raros) e Dicotomizados Recessivos (homozigotos selvagens e heterozigotos *versus* homozigotos raros). Neste estudo, apenas o Modelo Dicotomizado Recessivo do polimorfismo do *XPA* G/A apresentou diferença estatisticamente significativa entre as médias de idade ($p=0,046$). Os homozigotos raros apresentaram uma média de idade menor ($45,55 \pm 12,2$ anos) em relação aos homozigotos raros + heterozigotos ($51,16 \pm 13,1$ anos), demonstrando que, neste estudo, a variante rara foi associada ao aparecimento mais precoce da doença (Tabela 6). Não há na literatura associação entre o polimorfismo do gene *XPA* G/A e idade precoce de aparecimento do melanoma.

7.2.2 Análise dos gêneros entre os diferentes polimorfismos

A distribuição entre homens e mulheres no grupo estudado foi homogênea, sendo 49,6% de mulheres e 50,4% de homens. De acordo com a análise da distribuição entre os sexos e os polimorfismos estudados, apenas em relação ao polimorfismo do gene *XPG* Asp1104His (Modelo Dicotomizado Dominante) foi observado diferença estatisticamente significativa. Ocorreu maior prevalência de pacientes heterozigotos + homozigoto raros do sexo masculino (60,3%), comparados

ao sexo feminino, (teste χ^2 ; $p=0,036$), demonstrando que pacientes portadores de pelo menos um alelo raro, foram em sua maior parte, os homens. Não há relatos na literatura de associação entre o polimorfismo do gene *XPG* Asp1104His e maior prevalência do melanoma no sexo masculino.

7.3 ANÁLISE DO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

O teste de Hardy-Weinberg permite avaliar se as frequências genotípicas observadas estão dentro do valor esperado na população. Sabe-se que dentro de determinadas condições, estes valores permanecem constantes com o passar das gerações, independentemente do alelo ser raro ou frequente. Dentre as condições necessárias para o equilíbrio ser mantido, podemos citar: reprodução sexuada, escolha aleatória do parceiro, a população estudada não sofrer processo evolutivo, nem seleção natural, mutações ou migrações (MAYO 2008).

Dentre os genes estudados, dois SNPs não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg: o *ERCC1* ($p=0,02$) e *XPC* PAT+ ($p=0,01$). Nestes dois genes, os alelos raros estavam em frequência maior do que a esperada. Isso pode ser explicado devido ao fato da população estudada apresentar apenas indivíduos afetados (pacientes com melanoma). Em um estudo caso-controle realizado em parceria com o Hospital A.C.Camargo, no qual os pacientes deste estudo atual também fizeram parte da casuística, foi avaliada a associação entre os polimorfismos e o risco de melanoma e não foi observado nenhum desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg GONÇALVES et al. (2011).

7.4 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS E DADOS DE EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA

Na análise do polimorfismo do gene *XPA* G/A, no Modelo Dicotomizado Dominante, a presença de pelo menos um alelo raro foi associado a tumores mais infiltrativos ao diagnóstico (crescimento vertical) (Tabela 8). Não há relatos na literatura, associando o polimorfismo *XPA* G/A e crescimento vertical do melanoma.

Para o polimorfismo do *XPC* C/A, no Modelo Dicotomizado Dominante, a presença do alelo raro conferiu um fator de melhor prognóstico da doença, ou seja, IM=0 (Tabela 10). Não há relatos na literatura, associando o *XPC* C/A e IM.

Dentre os polimorfismos *XPC* C/A e PAT+, a presença de um alelo selvagem foi associada ao subtipo histológico extensivo superficial (Tabelas 11 e 12). Em relação ao *XPC* Lys939Gln, Modelo Dicotomizado Recessivo, a presença de dois alelos raros foi associada a subtipos histológicos diferentes daquele mais comum, o extensivo superficial. Não há relatos na literatura, associando polimorfismos do *XPC* e subtipos histológicos.

Em relação ao estadiamento, no polimorfismo de *XPC* PAT+, no Modelo Dicotomizado Dominante, a presença de pelo menos um alelo raro estava ligada ao diagnóstico da doença em estágio inicial (estádio I) (Tabela 14). Não há relatos na literatura associando *XPC* PAT+ e estágio do melanoma.

Para as demais variáveis clínicas não houve associação ($p>0,05$).

7.5 ANÁLISE DOS ALELOS E DADOS DE EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA

Os alelos foram isolados para observar se independentes, eles poderiam exercer influência sobre alguma característica do indivíduo.

Na análise dos alelos do polimorfismo *XPA* G/A, nossos resultados demonstraram fatores prognósticos ruins relacionados ao alelo raro de *XPA* G/A. A presença do alelo raro, foi associada a um Breslow mais elevado (acima de 1mm), demonstrando um tumor mais infiltrativo ao diagnóstico (Tabela 16). A maioria dos pacientes com crescimento radial (menos infiltrativo) não apresentou alelo raro, reafirmando que a presença do alelo raro, confere um tumor mais infiltrativo ao diagnóstico (Tabela 17). Além disso, esse alelo também foi associado à presença de ulceração, um fator de pior prognóstico da doença (Tabela 18). Portanto, neste estudo, a presença do alelo raro *XPA* G/A, parece conferir um tumor mais infiltrativo e ulcerado, de pior prognóstico. Não há relatos na literatura, associando *XPA* G/A e estes fatores de pior prognóstico.

Os resultados dos polimorfismos de *XPC* C/A e PAT+ demonstraram que os pacientes com alelo selvagem apresentaram maior frequência de melanoma em membros em relação a outros locais (Tabela 19). Não há relatos na literatura, associando polimorfismos do *XPC* e localização do melanoma.

Em relação ao estadiamento, a análise dos alelos do polimorfismo do *XPC* C/A demonstrou que os pacientes que apresentaram o alelo raro deste polimorfismo, apresentaram um estágio mais avançado ao diagnóstico (III) (Tabela 20). Um resultado semelhante foi obtido em relação aos alelos do polimorfismo do gene *XPG*

Asp1104His (Tabela 23). Um estudo realizado por SAKANO et al. (2006), demonstrou que para o polimorfismo *XPG* Asp1104His, no genótipo AspHis + HisHis (Modelo Dicotomizado Dominante), o estágio pT1 (mais avançado) foi mais prevalente do que o estágio pTa (mais inicial) em pacientes com tumores de bexiga, principalmente no grupo mais jovens (< ou = 71 anos).

A análise dos alelos do polimorfismo do gene *XPC* Lys939Gln demonstrou que a presença do alelo selvagem foi associada ao subtipo histológico extensivo superficial. Não há relatos na literatura, associando este polimorfismo a subtipos histológicos do melanoma.

Para as demais variáveis clínicas não houve associação ($p > 0,05$).

7.6 ANÁLISE DA REGRESSÃO LOGÍSTICA UNIVARIADA ASSOCIANDO GENÓTIPOS/ALELOS *VERSUS* VARIÁVEIS CLÍNICAS

A análise dos resultados da regressão logística univariada corroborou os resultados previamente citados.

A presença do alelo raro do polimorfismo do *XPA* G/A demonstrou ser fator de risco para fatores de pior prognóstico do melanoma como: crescimento vertical e presença de ulceração.

Por outro lado, a presença do alelo raro do *XPC* C/A demonstrou ser fator protetor em relação ao IM>0, que é um fator de pior prognóstico e a presença do alelo raro do *XPC* PAT+ demonstrou ser fator protetor em relação ao estágio mais avançado da doença ao diagnóstico (II+III).

Já em relação aos polimorfismos do *XPC* C/A, PAT+ e Lys939Gln, no Modelo Dicotomizado Recessivo, os homozigotos raros demonstraram ser fator de risco para outros subtipos histológicos, ou seja, diferentes daquele mais comum, o extensivo superficial. Não encontramos na literatura estudos prévios que descreveram os polimorfismos *XPA* G/A, *XPC* C/A, PAT+ e Lys939Gln como fatores de risco e/ou protetor para estas variáveis clínicas.

7.7 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE *XPC*

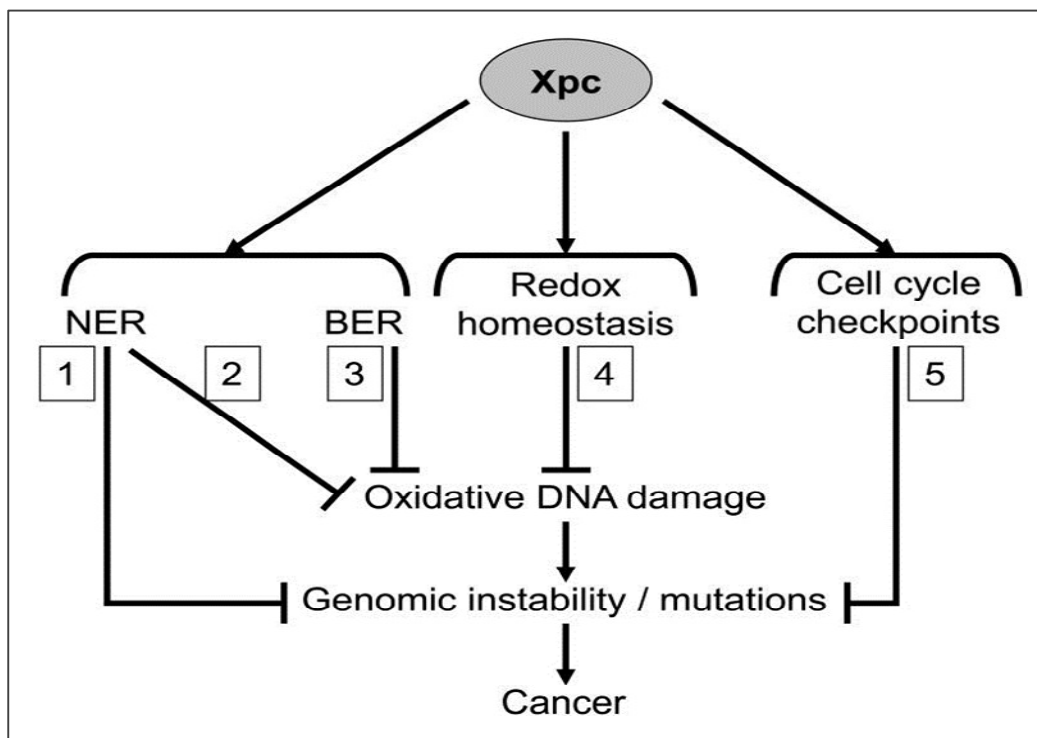
A análise de haplótipos para polimorfismos do *XPC* Lys 939Gln, C/A e PAT+, mostrou que houve desequilíbrio de ligação com $D' = 0,89$, ou seja, os haplótipos analisados segregam conjuntamente.

Houve diferença estatisticamente significativa para o haplótipo AAT (alelos raros de C/A e PAT+ e alelo selvagem de Lys939Gln), em relação à presença de regressão tumoral, ou seja, a presença deste haplótipo, com dois alelos raros (C/A e PAT+) e um alelo selvagem (Lys939Gln), foi associada à regressão tumoral. A regressão tumoral é um fator prognóstico controverso. Estudos como o realizado por OLÁH et al. (2003) demonstraram associação entre regressão e metástase linfonodal, porém outros estudos não encontraram tal associação como aquele realizado por FONTAINE et al. (2003). Até 2009, a regressão era considerada um dos fatores para indicação de pesquisa de linfonodo sentinela em melanoma, porém foi excluído após o consenso da AJCC de 2009, sendo substituída por IM. Um estudo realizado por YUN et al. (2011) demonstrou que a presença de regressão em uma área de

crescimento radial, adjacente a uma área de crescimento vertical no melanoma primário, está associado a linfangiogênese e invasão linfática. Este estudo também demonstrou que a regressão total em tumores de crescimento radial está associada a menor tempo para o aparecimento da primeira metástase e para a morte específica por melanoma, o que não ocorreu em pacientes com regressão parcial (YUN et al. 2011).

O haplótipo CCA (alelo raro Lys939Gln e alelos selvagens PAT+ e C/A), por sua vez, foi relacionado à presença de tumores primários em órgãos internos ($p < 0,001$). Os tumores em órgão internos estão associados a danos oxidativos e alguns estudos demonstraram a associação de polimorfismos do *XPC* e estes tumores (MELIS et al. 2011). FRANCISCO et al. (2008) realizaram uma meta-análise e encontraram associação entre o polimorfismo *XPC* Lys939Gln, no Modelo Dicotomizado Recessivo e câncer de pulmão. Encontraram também associação entre os polimorfismos (alelos raros) do *XPC* Lys939Gln, Ala499Val e PAT+ e câncer de bexiga. Outra meta-análise realizada por VINEIS et al. (2009) associou polimorfismos do *XPC* ao aumento da suscetibilidade para tumores de: bexiga, mama, colorretal, pulmão e pele. Apesar das lesões por danos oxidativos serem reparadas pela via BER, o *XPC* e a via NER parecem estar envolvidos no reparo ou prevenção do dano oxidativo ao DNA (MELIS et al. 2011). Algumas lesões oxidativas podem levar a distorções na hélice do DNA e a via NER seria responsável pelo reconhecimento e reparo destes danos, porém o *XPC* parece ter funções adicionais, fora da via NER, em relação ao reparo por danos oxidativos (D'ERRICO et al. 2006; MELIS et al. 2011) (Figura 12- rotas 1 e 2). Uma das hipóteses seria que o *XPC* atuasse como um co-fator da via BER, contribuindo para a efetividade da via,

através do reconhecimento e sinalização das lesões ao DNA causadas pelos danos oxidativos (D'ERRICO et al. 2006; MELIS et al. 2011) (Figura 12- rota 3). Outros estudos apontam que a deficiência do *XPC* levaria ao acúmulo de DNAs não reparados, o que aumentaria a atividade da DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), e consequentemente das oxidases, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e acúmulo de deleções específicas no DNA mitocondrial (REZVANI et al. 2011) (Figura 12- rota 4). Por fim, segundo WU et al. (2010), o supressor tumoral e mediador de ciclo celular, p53, parece ser modulado pelo *XPC*. O *XPC* seria responsável pela estabilização do HR23B, que forma um complexo com p53, evitando a sua degradação (WU et al. 2010) (Figura 12-rota 5).



Fonte: Adaptado de MELIS et al. (2011).

Figura 12 - Esquema das funções do gene *XPC*. Além da sua função na via NER (rotas 1 e 2), o XPC parece estar envolvido na via BER (rota 3), no equilíbrio oxidativo (rota 4) e na progressão do ciclo celular (rota 5)

7.8 ANÁLISE DA SOBREVIDA

A amostra deste estudo é heterogênea para a análise da sobrevida, pois apresenta pacientes com seguimento de alguns meses a até sete anos após o diagnóstico e tratamento do melanoma. A média de seguimento dos pacientes foi de 48 meses $\pm$ 19. Para uma melhor análise das sobrevidas livre de doença e global, seria necessário que a maioria dos pacientes do estudo tivesse seguimento de pelo menos cinco anos após o diagnóstico, porém, alguns pacientes, após alguns meses do tratamento cirúrgico, não retornam para acompanhamento no hospital.

Os pacientes selecionados para o estudo foram aqueles que estavam em acompanhamento ambulatorial, evoluíram bem após a cirurgia e estavam dispostos a responder ao questionário e colher sangue para a pesquisa. Este fato pode ter selecionando pacientes com boa evolução da doença e criando, portanto, um viés na amostra deste estudo.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Algumas considerações finais sobre os resultados merecem ser mencionadas:

1. Apesar de poucos estudos correlacionando o polimorfismo do *XPA* G/A com melanoma, neste estudo a presença deste polimorfismo conferiu alguns fatores de pior prognóstico da doença, como idade mais precoce de aparecimento do tumor e crescimento vertical (mais infiltrativo). Quando analisados os alelos raros *versus* os alelos selvagens, a presença do alelo raro também conferiu fatores de pior prognóstico: Breslow acima de 1mm e ulceração positiva. Desta maneira, outros estudos em relação a este polimorfismo e a evolução do melanoma merecem atenção no futuro.
2. Nos polimorfismos estudados do *XPC* (C/A, PAT+), os homozigotos raros não estavam associados ao subtipo histológico extensivo superficial. Já a análise do polimorfismo do *XPC* Lys939Gln, os homozigotos raros foram associados a subtipos histológicos diferentes do extensivo superficial. Apesar deste estudo ser composto por uma maioria de pacientes com subtipo extensivo superficial, o outro tipo mais comum, o nodular, apareceu com uma frequência de 3,3% dos casos, que é inferior aquela esperada e por outro lado, obtivemos uma porcentagem mais alta do que o esperado para subtipos raros, como o spitzóide e o desmoplásico, que são melanomas nos quais o diagnóstico pode ser mais difícil e resultado em retardo do tratamento.

Estariam os polimorfismos do *XPC* associados a subtipos mais raros do melanoma ou não relacionados ao subtipo extensivo superficial? Novos estudos deverão ser realizados para responder esta questão.

3. Na análise dos haplótipos dos polimorfismos do *XPC*, a presença do haplótipo CCA, que contém um alelo raro (Lys939Gln), foi associada à presença de tumores de órgãos internos o que coincidiu com outros estudos que demonstraram a associação entre polimorfismos do *XPC* e tumores de órgãos internos e reafirmando a relação deste gene também com o reparo de danos oxidativos ao DNA.
4. Neste estudo não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação à sobrevida. Consideramos que para uma melhor avaliação da sobrevida seja necessária uma casuística maior e um maior período de acompanhamento dos pacientes.
5. Os pacientes do Hospital A. C. Camargo selecionados para o estudo realizado por FRANCISCO (2007), foram pacientes que estavam em acompanhamento ambulatorial e se dispuseram a responder o questionário e a colher amostra de sangue. Logo, estes pacientes estavam em bom estado geral e apresentaram boa evolução da doença, o que pode ter criado um viés nessa amostra, onde os pacientes que tiveram melhor evolução da doença foram selecionados.

A partir dos resultados apresentados, podemos chegar as seguintes conclusões referentes à população estudada:

1. O polimorfismo do *XPA* G/A está relacionado a fatores de pior prognóstico da doença.
2. Polimorfismos dos genes *XPC* PAT+ e C/A não estão associados ao subtipo histológico extensivo superficial. Em relação ao polimorfismo do *XPC* Lys939Gln, a presença do alelo raro foi relacionada a outros subtipos do melanoma, diferentes daquele mais comum, o extensivo superficial.
3. A presença do alelo raro do polimorfismo do *XPC* C/A foi relacionada ao IM=0, Modelo Dicotomizado Dominante.
4. No polimorfismo *XPC* PAT+, a presença do alelo raro foi relacionada a um estágio inicial da doença (I) ao diagnóstico, Modelo Dicotomizado Dominante.
5. A presença de pelo menos um alelo raro do polimorfismo *XPG* Asp1104His, foi associado à presença de melanoma em indivíduos do sexo masculino.
6. A presença dos alelos raros de *XPC* C/A e de *XPG* Asp1104His foi relacionada a um estadiamento mais avançado ao diagnóstico da doença.

7. Os polimorfismos do *XPC* (C/A, Lys939Gln e PAT+) apresentaram desequilíbrio de ligação.
8. A presença do haplótipo AAT dos polimorfismos estudados do *XPC* foi relacionada à presença de regressão tumoral.
9. A presença do haplótipo CCA dos polimorfismos estudados do *XPC* foi relacionada à presença de tumores de órgãos internos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutat Res** 2005; 571:153-73.

Avilés-Izquierdo JA, Lázaro-Ochaita P, Suárez-Fernández R, Márquez-Rodas I, Parra-Blanco V, Escat-Cortés JL. [Epidemiological changes in cutaneous melanoma: retrospective study of 969 cases (1996-2010).]. **Rev Clin Esp** 2013; 213:81-7.

Baccarelli A, Calista D, Minghetti P, et al. XPD gene polymorphism and host characteristics in the association with cutaneous malignant melanoma risk. **Br J Cancer** 2004; 90:497-502.

Balch CM, Soong SJ, Atkins MB, et al. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. **CA Cancer J Clin** 2004; 54:131-49; quiz 182-4.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol** 2009; 27:6199-206.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics** 2005; 21:263-5.

Benhamou S, Sarasin A. ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk. **Mutagenesis** 2002; 17:463-9.

Blankenburg S, König IR, Moessner R, et al. Assessment of 3 xeroderma pigmentosum group C gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a case-control study. **Carcinogenesis** 2005a; 26:1085-90.

Blankenburg S, König IR, Moessner R, et al. No association between three xeroderma pigmentosum group C and one group G gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma. **Eur J Hum Genet** 2005b; 13:253-5.

Borges SZ, Bakos L, Cartell A, Wagner M, Agostini A, Lersch E. Distribution of clinical-pathological types of cutaneous melanomas and mortality rate in the region of Passo Fundo, RS, Brazil. **Int J Dermatol** 2007; 46:679-86.

Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, et al. Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterizes the role of DNA repair. **J Med Genet** 2011; 48:168-76.

Burton AL, Gilbert J, Farmer RW, et al. Regression does not predict nodal metastasis or survival in patients with cutaneous melanoma. **Am Surg** 2011; 77:1009-13.

Callender GG, Egger ME, Burton AL, et al. Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1 mm or thicker. **Am J Surg** 2011; 202:659-64; discussion 664-5.

Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. **Cancer Res** 1969; 29:705-27.

Cleaver JE. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. **Nature** 1968; 218:652-6.

Cleaver JE, Lam ET, Revet I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. **Nat Rev Genet** 2009; 10:756-68.

Conley J, Lattes R, Orr W. Desmoplastic malignant melanoma (a rare variant of spindle cell melanoma). **Cancer** 1971; 28:914-36.

D'Errico M, Parlanti E, Teson M, et al. New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. **EMBO J** 2006; 25:4305-15.

DiGiovanna JJ, Kraemer KH. Shining a light on xeroderma pigmentosum. **J Invest Dermatol** 2012; 132:785-96.

Dybdahl M, Vogel U, Frentz G, Wallin H, Nexø BA. Polymorphisms in the DNA repair gene XPD: correlations with risk and age at onset of basal cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1999; 8:77-81.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:1471-4.

Faghri S, Tamura D, Kraemer KH, DiGiovanna JJ. Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterises a wide spectrum of clinical manifestations. **J Med Genet** 2008; 45:609-21.

Fitch ME, Nakajima S, Yasui A, Ford JM. In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by DDB2 gene product. **J Biol Chem** 2003; 278:46906-10.

Fontaine D, Parkhill W, Greer W, Walsh N. Partial regression of primary cutaneous melanoma. Is there an association with sub-clinical sentinel lymph node metastasis? **Am J Dermatopathol** 2003; 25:371-6.

Forman SB, Ferringer TC, Peckham SJ, et al. Is superficial spreading melanoma still the most common form of malignant melanoma? **J Am Acad Dermatol** 2008; 58:1013-20.

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

Francisco G, Menezes PR, Eluf-Neto J, Chammas R. XPC polymorphisms play a role in tissue-specific carcinogenesis: a meta-analysis. **Eur J Hum Genet** 2008; 16:724-34.

Gao R, Reece KM, Sissung T, et al. Are race-specific ERCC1 haplotypes in melanoma cases versus controls related to the predictive and prognostic value of ERCC1 N118N. **BMJ Open** 2013; 3:pii:e002030.

Garinis GA, Jans J, van der Horst GT. Photolyases: capturing the light to battle skin cancer. **Future Oncol** 2006; 2:191-9.

Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **N Engl J Med** 1999; 340:1341-8.

Gon AS, Minelli L, Guembarovski AL. Melanoma cutâneo primário em Londrina. **An Bras Dermatol** 2001; 76:413-26.

Gonçalves FT, Francisco G, de Souza SP, et al. European ancestry and polymorphisms in DNA repair genes modify the risk of melanoma: a case-control study in a high UV index region in Brazil. **J Dermatol Sci** 2011; 64:59-66.

Hebra F, Kaposi M. **On diseases of the skin including the exanthemata.** 3rd ed. London: The New Sydenham Society; 1874; 3:252-58.

Hermanson-Miller IL, Turchi JJ. Strand-specific binding of RPA and XPA to damaged duplex DNA. **Biochemistry** 2002; 41:2402-8.

Ibarrola-Villava M, Peña-Chilet M, Fernandez LP, et al. Genetic polymorphisms in DNA repair and oxidative stress pathways associated with malignant melanoma susceptibility. **Eur J Cancer** 2011; 47:2618-25.

International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. **Nature** 2005; 437:1299-320.

Kamino H. Spitzoid melanoma. **Clin Dermatol** 2009; 27:545-55.

Landi MT, Baccarelli A, Calista D, et al. Combined risk factors for melanoma in a Mediterranean population. **Br J Cancer** 2001; 85:1304-10.

Li C, Hu Z, Liu Z, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XPC, XPD, and XPG and risk of cutaneous melanoma: a case-control analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2006; 15:2526-32.

Li C, Yin M, Wang LE, et al. Polymorphisms of nucleotide excision repair genes predict melanoma survival. **J Invest Dermatol** 2013; Feb 14. [Epub ahead of print].

Liu D, O'Day SJ, Yang D, et al. Impact of gene polymorphisms on clinical outcome for stage IV melanoma patients treated with biochemotherapy: an exploratory study. **Clin Cancer Res** 2005; 11:1237-46.

Liu J, Zhang Z, Cao XL, et al. XPA A23G polymorphism and susceptibility to cancer: a meta-analysis. **Mol Biol Rep** 2012; 39:6791-9.

Magro CM, Crowson AN, Mihm MC. Unusual variants of malignant melanoma. **Mod Pathol** 2006; 19 Suppl 2:S41-70.

Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, et al. The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. **Nature** 1999; 399:700-4.

Mayo O. A century of Hardy-Weinberg equilibrium. **Twin Res Hum Genet** 2008; 11:249-56.

McLoone JK, Watts KJ, Menzies SW, Barlow-Stewart K, Mann GJ, Kasparian NA. Melanoma survivors at high risk of developing new primary disease: a qualitative examination of the factors that contribute to patient satisfaction with clinical care. **Psychooncology** 2013; Feb 5. [Epub ahead of print].

Melis JP, Luijten M, Mullenders LH, van Steeg H. The role of XPC: Implications in cancer and oxidative DNA damage. **Mutat Res** 2011; 728:107-17.

Mervic L. Time course and pattern of metastasis of cutaneous melanoma differ between men and women. **PLoS One** 2012; 7:e32955.

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. **N Engl J Med** 2006; 355:51-65.

Miller KL, Karagas MR, Kraft P, et al. XPA, haplotypes, and risk of basal and squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis** 2006; 27:1670-5.

Millikan RC, Hummer A, Begg C, et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and risk of multiple primary melanoma: the genes environment and melanoma study. **Carcinogenesis** 2006; 27:610-8.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Mullaart E, Lohman PH, Berends F, Vijg J. DNA damage metabolism and aging. **Mutat Res** 1990; 237:189-210.

Naser N. Cutaneous melanoma: a 30-year-long epidemiological study conducted in a city in southern Brazil, from 1980-2009. **An Bras Dermatol** 2011; 86:932-41.

Nelson HH, Christensen B, Karagas MR. The XPC poly-AT polymorphism in non-melanoma skin cancer. **Cancer Lett** 2005; 222:205-9.

Nishi R, Okuda Y, Watanabe E, et al. Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein. **Mol Cell Biol** 2005; 25:5664-74.

Oláh J, Gyulai R, Korom I, Varga E, Dobozy A. Tumor regression predicts higher risk of sentinel node involvement in thin cutaneous melanomas. **Br J Dermatol** 2003; 149:662-3.

Povey JE, Darakhshan F, Robertson K, et al. DNA repair gene polymorphisms and genetic predisposition to cutaneous melanoma. **Carcinogenesis** 2007; 28:1087-93.

Rapin I, Weidenheim K, Lindenbaum Y, et al. Cockayne syndrome in adults: review with clinical and pathologic study of a new case. **J Child Neurol** 2006; 21:991-1006.

Reed RJ, Ichinose H, Clark WH Jr, Mihm MC Jr. Common and uncommon melanocytic nevi and borderline melanomas. **Semin Oncol** 1975; 2:119-47.

Reed R. **New concepts in surgical pathology of the skin**. New York: John Wiley & Sons; 1976. Acral lentiginous melanoma; p.89-90.

Reich DE, Cargill M, Bolk S, et al. Linkage disequilibrium in the human genome. **Nature** 2001; 411:199-204.

Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, Nagore E, Almenar S, Guillén C. [Problems in defining melanoma regression and prognostic implication]. **Actas Dermosifiliogr** 2009; 100:759-66.

Rezvani HR, Kim AL, Rossignol R, et al. XPC silencing in normal human keratinocytes triggers metabolic alterations that drive the formation of squamous cell carcinomas. **J Clin Invest** 2011; 121:195-211.

Rigel DS. Epidemiology of melanoma. **Semin Cutan Med Surg** 2010; 29:204-9.

Roach BA, Burton AL, Mays MP, et al. Does mitotic rate predict sentinel lymph node metastasis or survival in patients with intermediate and thick melanoma? **Am J Surg** 2010; 200:759-63; discussion 763-4.

Sakano S, Kumar R, Larsson P, et al. A single-nucleotide polymorphism in the XPG gene, and tumour stage, grade, and clinical course in patients with nonmuscle-invasive neoplasms of the urinary bladder. **BJU Int** 2006; 97:847-51.

Sanyal S, Festa F, Sakano S, et al. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. **Carcinogenesis** 2004; 25:729-34.

Schrama D, Scherer D, Schneider M, et al. ERCC5 p.Asp1104His and ERCC2 p.Lys751Gln polymorphisms are independent prognostic factors for the clinical course of melanoma. **J Invest Dermatol** 2011; 131:1280-90.

Shen H, Sturgis EM, Khan SG, et al. An intronic poly (AT) polymorphism of the DNA repair gene XPC and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. **Cancer Res** 2001; 61:3321-5.

Shi TY, He J, Qiu LX, et al. Association between XPF polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. **PloS One** 2012; 7:e38606.

Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **CA Cancer J Clin** 2012; 62:220-41.

Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, et al. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. **Cell** 2005; 121:387-400.

Sunesen M, Stevnsner T, Brosh RM Jr, Dianov GL, Bohr VA. Global genome repair of 8-oxoG in hamster cells requires a functional CSB gene product. **Oncogene** 2002; 21:3571-8.

Tang JY, Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G. Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. **Mol Cell** 2000; 5:737-44.

Vineis P, Manuguerra M, Kavvoura FK, et al. A field synopsis on low-penetrance variants in DNA repair genes and cancer susceptibility. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:24-36.

Wu YH, Wu TC, Liao JW, Yeh KT, Chen CY, Lee H. p53 dysfunction by xeroderma pigmentosum group C defects enhance lung adenocarcinoma metastasis via increased MMP1 expression. **Cancer Res** 2010; 70:10422-32.

Yaar M, Gilchrist BA. Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. **Clin Exp Dermatol** 2001; 26:583-91.

Yun SJ, Gimotty PA, Hwang WT, et al. High lymphatic vessel density and lymphatic invasion underlie the adverse prognostic effect of radial growth phase regression in melanoma. **Am J Surg Pathol** 2011; 35:235-42.

Zaidi MR, Day CP, Merlino G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **J Invest Dermatol** 2008; 128:2381-91.

Zhu LB, Xu Q, Hong CY, et al. XPC gene intron 11 C/A polymorphism is a predictive biomarker for the sensitivity to NP chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. **Anticancer Drugs** 2010; 21:669-73.

Anexo 1 - Modelo do protocolo utilizado para a análise dos prontuários dos pacientes

Nome:
RGH:
Data do diagnóstico:
Idade ao diagnóstico:
Local do melanoma:

Anatomo-Patológico:

1) Tipo:
2) Breslow:
3) Clark:
4) Crescimento
5) Índice Mitótico:
6) Regressão:
7) Ulceração:
8) Invasão linfática, sanguínea, perineural:
9) Satelitose:

Estadiamento ao diagnóstico:

T:			
In situ	()	IB	()
IA	()	2B	()
2A	()	3B	()
3A	()	4B	()
4A	()	IB	()

N:			
0	()		
1A	()	1B	()
2A	()	2B	()
3	()		2C ()

M:
0 ()
1 ()
2 ()
3 ()

0 ()
IA ()
IB ()
IIA ()
IIB ()
IIIA ()
IIIB ()
IIIC ()
IV ()

Tratamento realizado:

Datas dos tratamentos cirúrgicos:

- 1) Ampliação:
- 2) Linfonodo Sentinela:
- 3) Linfadenectomia:

Recidiva: Sim () Não ()

Data da recidiva:

Metástases locorregionais:

- | | |
|--------------------------|-------|
| 1) Satelitoses: | data: |
| 2) Em trânsito: | data: |
| 3) Linfonodos regionais: | data: |

Metástases a distância:

- | | |
|----------------|-------|
| 1) Pulmonar: | data: |
| 2) Óssea: | data: |
| 3) Hepática: | data: |
| 4) Cerebral: | data: |
| 5) Linfonodal: | data: |
| 6) Medular | data: |
| 7) Pleural: | data: |
| 8) Pele: | data: |
| 9) Outra: | data: |

Tratamento realizado:

- 1) Radioterapia
- 2) Quimioterapia
- 3) Perfusão isolada:
- 4) Infusão:
- 5) Cirúrgico:
- 6) Interferon:

Quimioterapia:

- 1) DTIC
- 2) DTIC + Cisplatina
- 3) DTIC + Taxol
- 4) Bioquímico

Data da última consulta:

Estado atual:

- | | |
|----------------------------|-----|
| 1) Vivo sem doença | () |
| 2) Vivo com doença | () |
| 3) Óbito por melanoma | () |
| 4) Óbito por outras causas | () |

Outros tumores de pele:

Outros tumores:

Anexo 2 - Resultado gerado pelo *software* Haploview associando os haplótipos com as variáveis clínicas

Variável	Haplótipo	Frequência (%)	χ^2	p
Crescimento	ACA	48,6	0,17	0,68
	CAT	40,4	1,02	0,31
	AAA	3,4	1,52	0,22
	CAA	2,9	1,02	0,31
	AAT	1,7	0,05	0,82
	CCA	1,3	0,27	0,61
Índice Mitótico	ACA	48,6	1,86	0,17
	CAT	40,4	0,62	0,43
	AAA	3,4	0,02	0,88
	CAA	2,9	0,03	0,87
	AAT	1,7	2,60	0,11
	CCA	1,3	1,02	0,31
Linfadenectomia	ACA	48,6	0,13	0,72
	CAT	40,4	0,19	0,66
	AAA	3,4	0,21	0,65
	CAA	2,9	0,30	0,58
	AAT	1,7	0,37	0,54
	CCA	1,3	0,22	0,64
LNS	ACA	48,6	0,48	0,49
	CAT	40,4	0,36	0,56
	AAA	3,4	0,88	0,35
	CAA	2,9	0,03	0,86
	AAT	1,7	0,02	0,90
	CCA	1,3	3,31	0,07
Outros tumores de pele	ACA	48,6	1,46	0,23
	CAT	40,4	0,40	0,53
	AAA	3,4	0,02	0,90
	CAA	2,9	0,36	0,55
	AAT	1,7	2,19	0,14
	CCA	1,3	0,94	0,33
Recidiva	ACA	48,6	0,13	0,72
	CAT	40,4	0,02	0,89
	AAA	3,4	0,09	0,77
	CAA	2,9	0,12	0,73
	AAT	1,7	1,58	0,21
	CCA	1,3	0,28	0,59

Regressão	ACA	48,6	0,003	0,96
	CAT	40,4	0,21	0,65
	AAA	3,4	0,003	0,95
	CAA	2,9	0,87	0,35
	AAT	1,7	3,86	0,049*
	CCA	1,3	0,13	0,72
Tumores órgãos internos	ACA	48,6	1,72	0,19
	CAT	40,4	0,76	0,38
	AAA	3,4	0,18	0,67
	CAA	2,9	0,64	0,43
	AAT	1,7	0,36	0,55
	CCA	1,3	12,99	0,0003*
Ulceração	ACA	48,6	0,22	0,64
	CAT	40,4	0,19	0,66
	AAA	3,4	0,69	0,41
	CAA	2,9	0,36	0,55
	AAT	1,7	0,33	0,57
	CCA	1,3	0,06	0,81
Estado atual	ACA	48,6	2,09	0,15
	CAT	40,4	1,92	0,17
	AAA	3,4	0,43	0,51
	CAA	2,9	0,36	0,55
	AAT	1,7	0,27	0,60
	CCA	1,3	0,21	0,65

Os haplótipos representam os alelos dos polimorfismos, apresentados na seguinte ordem: *XPC* Lys939Gln (rs2228001), *XPC* C/A (rs2279017) e *XPC* PAT+ (in/del) (rs72163318); *p<0,05; LNS: linfonodo sentinela

Anexo 3 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 20 de Setembro de 2011.

Ao
Dr. João Pedreira Duprat Neto

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1564/11

"Evolução clínica do melanoma cutâneo em pacientes portadores de polimorfismos selecionados em genes de reparo por excisão de nucleotídeos".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 13/09/2011, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 28/06/2011, aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Oncologia Cutânea;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Cutânea;
- Declaração de colaboração do Departamento de Radiologia e Oncologia da USP.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1564/11

Título: "Evolução clínica do melanoma cutâneo em pacientes portadores de polimorfismos selecionados em genes de reparo por excisão de nucleotídeos".

Pesquisador Responsável: Dr. João Pedreira Duprat Neto

Co-Pesquisador: Dr. Roger Chammas

Aluna: Mariane Campagnari (Mestrado)

Patrocinador: Será submetido à FAPESP.

Comentários gerais:

Será realizada a avaliação de 177 prontuários de pacientes do Hospital A.C. Camargo, portadores de Melanoma Cutâneo, diagnosticados entre 2004 e 2006. A genotipagem de 127 pacientes foi realizada na Universidade de São Paulo (USP) em estudo prévio, para os 50 restantes serão realizadas extrações de DNA dos blocos de parafina pertencentes ao Hospital A.C. Camargo e em seguida a genotipagem será realizada na USP, pelo mesmo grupo do estudo prévio citado.

Sugestões apontadas pela Comissão de Pesquisa (COPE) em parecer anterior:
Aprovado com sugestões.

Resumo: O resumo deveria ser revisto por ter informações desnecessárias e por não descrever adequadamente o estudo.

Introdução: rever o conceito de mutações em XP e a síndrome de xeroderma pigmentoso: apenas mutações patogênicas e em homozigose são responsáveis pela síndrome do XP.

Material e método: Importante descrever que trata-se de um estudo que inclui revisão retrospectiva de dados do prontuário e de dados sobre polimorfismos já analisados, além de propor a realização de um grupo suplementar.

Prazo previsto para realização do estudo (cronograma): Deve ser apresentado.

Pendências apontadas em parecer anterior (CEP):

- Trabalho relevante, porém requer aprimoramentos na escrita do projeto;
- A revisão de literatura pode ser mais atualizada e buscar mais consistência na informação sob ponto de vista científico-molecular;
- Falta carta de ciência do grupo da USP de que irão colaborar com os estudos moleculares propostos;
- Na Folha de Rosto do SISNEP, no título está faltando a palavra Clínica: "Evolução Clínica do Melanoma...", favor acrescentar.

Comentários Finais:

Todos os questionamentos apontados pelo CEP e pela COPE foram respondidos de maneira satisfatória, portanto decidimos pela aprovação final do projeto.

Parecer Final:

Projeto Aprovado.


FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Dr. Jefferson Luiz Góes
1º Vice-Coordenador

Parecer referente à Reunião do CEP de 13/09/2011.

1/1