

**CARACTERIZAÇÃO DO LÓCUS *CDKN2A* E DOS  
GENES *CDK4* E *MC1R* EM PACIENTES COM  
CRITÉRIOS CLÍNICOS PARA O DIAGNÓSTICO  
DA SÍNDROME DO MELANOMA FAMILIAL E  
MELANOMA MÚLTIPLO ESPORÁDICO**

**ALEXANDRE LEON RIBEIRO DE ÁVILA**

**Tese de doutorado apresentada à Fundação  
Antônio Prudente para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro**

**Co-Orientador: Dr. Gilles Landman**

**São Paulo**

**2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ávila, Alexandre Leon Ribeiro

**Caracterização do locus *CDKN2A* e dos genes *CDK4* e *MC1R* em pacientes com critérios clínicos para o diagnóstico da síndrome do melanoma familiar e melanoma múltiplo esporádico** / Alexandre Leon Ribeiro de Ávila – São Paulo, 2010.

92p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. MELANOMA/genética. 2. SÍNDROMES NEOPLÁSICAS HEREDITÁRIAS. 3. GENES CDKN2. 4. SÍNDROME DO NEVO DISPLÁSICO

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente a todos os colegas, colaboradores e estudantes que participaram deste projeto e tornaram possível a realização desta tese.

Em especial, agradeço aos meus orientadores, Dra. Dirce e Dr. Gilles, que deste o início acreditaram no potencial deste projeto e lutaram para que ele se concretizasse. Eu tive o privilégio de ser orientado pela Dra. Dirce, que teve a paciência de me mostrar os primeiros passos dentro da Genética e da Biologia Molecular, sempre com uma visão otimista, focada na organização para se atingir bons resultados. Também fui muito feliz com meu co-orientador, Dr. Gilles, grande articulador, foi o primeiro a falar sobre o GenoMEL e o grande idealizador de tudo.

Algumas pessoas tiveram uma participação especial em todo o processo, tendo contribuído muito com seu trabalho e dedicação. Meu muito obrigado à Dra. Bianca, a enfermeira Luciana e aos biólogos Gustavo e Bianca. Agradeço em especial a Dra. Gisele, que além de contribuir com seu conhecimento e trabalho se mostrou uma grande amiga e incentivadora desde o início. Extendo meus agradecimentos a todos os integrantes do departamento da Oncologia Cutânea, em especial ao Dr. João Duprat que apoiou e incentivou meu trabalho desde quando ainda se restringia ao um ambulatório de especialidades. Também contei com o apoio pessoal e científico do departamento de Oncogenética, dirigido pela Dra. Isabel, e do departamento de Patologia, dirigido pelo Dr. Fernando Soares. Ao Hospital A.C. Camargo agradeço por ter me aberto as portas logo que concluí a residência e ser minha segunda casa há mais de 6 anos.

Desde o início, contei com o suporte financeiro da FAPESP, sem o qual não teria sido possível a realização deste trabalho. Também recebi apoio do consórcio GenoMEL que se dedica ao estudo da genética do Melanoma Familiar em todo o mundo.

Aqui, nos meus agradecimentos, dedico um lugar especial a todas os pacientes que aceitaram participar deste projeto, e confiaram suas vidas e histórias, muitas das vezes tristes, acreditando que poderiam colaborar para o bem de outras pessoas. Vocês são o sentido de tudo.

Finalmente agradeço a minha família e amigos, que de maneira incondicional me apoiaram.

## RESUMO

Ávila ALR. **Caracterização do locus *CDKN2A* e dos genes *CDK4* e *MC1R* em pacientes com critérios clínicos para o diagnóstico da Síndrome do Melanoma Familiar e Melanoma Múltiplo Esporádico.** São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

A Síndrome do Melanoma Familiar (SMF) é uma síndrome rara de predisposição ao câncer associada preponderantemente ao locus *CDKN2A*. Algumas poucas famílias no mundo apresentam mutações no gene *CDK4*, relacionado a mesma via molecular da pRb. Fatores relacionados ao fenótipo e polimorfismos do gene *MC1R* modulam de desenvolvimento de melanoma nestes pacientes. Os objetivos deste trabalho são pesquisar as mutações germinativas do locus *CDKN2A* e do gene *CDK4*, além de caracterizar os polimorfismos dos gene *MC1R* em famílias brasileiras com diagnóstico clínico de Síndrome do Melanoma Familiar (SMF) e em pacientes com Melanoma Múltiplo Esporádico (MME) e descrever os fatores de risco pessoais e ambientais de melanoma em probandos e familiares. Foram incluídos 50 probandos que preencheram os critérios clínicos, sendo 32 para SMF e 18 para MME. A metodologia incluiu o seqüenciamento direto dos 4 éxons do locus *CDKN2A*, do éxon 2 do gene *CDK4* e do éxon único do gene *MC1R*. Foram encontradas 8 mutações germinativas e uma alteração no locus *CDKN2A*. Nenhuma mutação foi detectada no gene *CDK4*. Uma ampla variedade de polimorfismos do *MC1R* foi encontrada em 87% dos pacientes pesquisados. As mutações patogênicas p.Pro48Thr e c.-34G>T foram as mais freqüentes, sendo detectadas em 3 probandos cada uma. Cada um dos demais probandos apresentaram as mutações p.Gly101Trp e c.IVS-105A>G. A alteração p.Val84Met nunca descrita na literatura foi detectada em um dos probandos e tem potencial patogênico incerto. Estudos adicionais de segregação e funcionais são necessários. Este estudo é o quarto estudo realizado na América Latina a respeito da definição das mutações dos genes de predisposição ao Melanoma Familiar e Melanoma Múltiplo Esporádico, sendo o único com critérios de seleção que seguem o padrão dos outros estudos descritos na literatura.

## SUMMARY

Ávila ALR. [Characterization of the *CDKN2A*, *CDK4* and *MC1R* genes in patients with clinical criteria for the diagnosis of Familial Melanoma Syndrome and Multiple Sporadic Melanoma]. São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Familial Melanoma Syndrome (FMS) is a rare cancer predisposition syndrome mainly associated to *CDKN2A* locus. Few families in the world harbor *CDK4* gene mutations, related to the same Rb protein pathway. Both phenotype related features and *MC1R* polymorphisms can modulate melanoma risk in these patients. The aims of this study are evaluate the presence of *CDKN2A* and *CDK4* germline mutations, characterize *MC1R* polymorphisms in Brazilian families with clinical diagnosis to the FMS and in patients with Sporadic Multiple Melanoma (EMM), and also describe the personal and environment melanoma risks in probands and relatives. The 50 probands included met the clinical criteria, 32 with FMS and 18 with EMM. The methodology was direct sequencing of the 4 exons of *CDKN2A* locus, exon 2 of *CDK4* gene and the intronless *MC1R* gene. It was found 8 germline mutations and an alteration in *CDKN2A* locus. No mutation was detected in *CDK4* gene. A large variety of *MC1R* polymorphisms were found in 87% of the analyzed patients. The p.Pro48Thr and c.-34G>T pathogenic mutations were the most frequent, each of them detected in 3 probands. The other two probands had p.Gly101Trp and c.IVS-105A>G mutations. The alteration p.Val84Met was never reported in the English literature. It was detected in on proband and its pathogenic potential remains to be determined. Additional segregation and functional studies are needed. This is the forth study regarding to the FMS and MME conducted in Latin America, and is the only with inclusion clinical criteria following the standards of other studies reported in the literature.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Incidência de câncer no Brasil, segundo estimativa do INCA para 2010.....	1
<b>Figura 2</b>	Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2010 pelo INCA.....	2
<b>Figura 3</b>	Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010 pelo INCA.....	2
<b>Figura 4</b>	Sobrevida de pacientes com melanoma de acordo com o índice de Breslow.....	3
<b>Figura 5</b>	Sobrevida de pacientes com melanoma de acordo com a presença de doença linfonodal.....	4
<b>Figura 6</b>	Sobrevida de pacientes com melanoma de acordo com a presença de metástases.....	4
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática do locus <i>CDKN2A</i> .....	8
<b>Figura 8</b>	Representação esquemática da atuação da proteína P16 (INK4A) na via de sinalização da proteína do retinoblastoma (RB).....	9
<b>Figura 9</b>	Representação esquemática da atuação da proteína P14 (ARF) na via de sinalização da proteína da proteína P53.....	11
<b>Figura 10</b>	Representação esquemática do receptor 1 da melanocortina.....	14

<b>Figura 11</b>	Porcentagem de famílias com mutações no CDKN2A de acordo com a idade média de diagnóstico do melanoma (em anos) para cada um dos grupos (Total, América do Norte, Austrália e Europa)..	19
<b>Figura 12</b>	Porcentagem de famílias com mutações no CDKN2A de acordo com o número de pacientes com melanoma na família em cada um dos grupos (Total, América do Norte, Austrália e Europa).....	20
<b>Figura 13</b>	Porcentagem de famílias com mutações no CDKN2A de acordo com o número de pacientes com melanoma múltiplo na família em cada um dos grupos (Total, América do Norte, Austrália e Europa)..	21
<b>Figura 14</b>	Porcentagem de famílias com mutações no CDKN2A de acordo com o número de pacientes com melanoma múltiplo na família em cada um dos grupos (Total, América do Norte, Austrália e Europa)..	22
<b>Figura 15</b>	Diagrama representativo da localização dos fragmentos amplificados em relação aos iniciadores com sua respectiva região coberta de cada éxon do <i>CDKN2A</i> .....	31
<b>Figura 16</b>	Diagrama representativo da localização do fragmento amplificado em relação aos iniciadores, com sua respectiva região coberta dos éxons do gene <i>CDK4</i> .....	32
<b>Figura 17</b>	Diagrama representativo da localização do fragmento amplificado em relação aos iniciadores com sua respectiva região coberta dos éxons do gene <i>MC1R</i> .....	32
<b>Figura 18</b>	Frequência de mutações de acordo com o número de afetados na família.....	43
<b>Figura 19</b>	Frequência de mutações de acordo com número de casos de melanoma múltiplo.....	44



<b>Figura 20</b>	Freqüência de mutações de acordo com a idade de diagnóstico do primeiro melanoma primário em probandos.....	45
<b>Figura 21</b>	Freqüência de mutações de acordo com o número de indivíduos afetados na família com câncer de pâncreas.....	46
<b>Figura 22</b>	Heredograma da família 06.....	50
<b>Figura 23</b>	Heredograma da família 44.....	50
<b>Figura 24</b>	Heredograma da família 33.....	51
<b>Figura 25</b>	Heredograma da família 17.....	52
<b>Figura 26</b>	Heredograma da família 18.....	53
<b>Figura 27</b>	Heredograma da família 36.....	53
<b>Figura 28</b>	Heredograma da família 05.....	54
<b>Figura 29</b>	Heredograma da família 46.....	55
<b>Figura 30</b>	Heredograma da família 47.....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Seqüências nucleotídicas dos 7 pares de iniciadores do <i>CDKN2A</i> , <i>CDK4</i> e <i>MC1R</i> o éxon amplificado e tamanho.....	32
<b>Tabela 2</b>	Reagentes utilizados na reação de PCR do <i>CDKN2A</i> .....	34
<b>Tabela 3</b>	Reagentes utilizados na reação de PCR do <i>MC1R</i> .....	34
<b>Tabela 4</b>	Programas de PCR utilizados para amplificação dos fragmentos do <i>CDKN2A</i> .....	35
<b>Tabela 5</b>	Programas de PCR utilizados para amplificação dos fragmentos do <i>MC1R</i> .....	36
<b>Tabela 6</b>	Concentrações finais dos reagentes das reações de seqüenciamento.	37
<b>Tabela 7</b>	Programas definidos para cada par de iniciadores de acordo com sua temperatura ótima de anelamento.....	37
<b>Tabela 8</b>	Resultados moleculares dos probandos e sua relação com os números de melanomas no probando e de afetados na família.....	41
<b>Tabela 9</b>	Perfil de mutações em probandos com melanoma familiar e número de indivíduos afetados e tumores relacionados.....	48
<b>Tabela 10</b>	Rastreamento das alterações detectadas nos probandos nos seus respectivos familiares.....	57
<b>Tabela 11</b>	Caracterização do fenótipo dos probandos quanto ao fototipo, cor dos olhos, cor dos cabelos e presença de efélides no tronco.....	60
<b>Tabela 12</b>	Caracterização do Fenótipo quanto aos nevos.....	62

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Melanoma Familiar – Breve Histórico.....	6
1.2	Região 9p21 (locus <i>CDKN2A</i> ).....	8
1.3	Gene <i>CDK4</i> .....	12
1.4	Gene <i>MC1R</i> (Receptor 1 da Melanocortina.....	13
1.5	Risco de Melanoma e Fenótipo.....	15
1.6	Melanoma Familiar no Mundo e na América Latina.....	18
1.7	Melanoma Múltiplo.....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1	Objetivos Gerais.....	25
2.2	Objetivos Específicos.....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1	Critérios de Inclusão dos Pacientes.....	26
3.2	Procedimentos para Seleção e Contato com os Pacientes.....	27
3.3	Coleta e Processamento das Amostras de Sangue Periférico .....	28
3.4	Separação dos Leucócitos .....	29
3.5	Purificação do DNA.....	29
3.6	Quantificação e Qualidade do DNA Genômico.....	30
3.7	Avaliação do Locus <i>CDKN2A</i> .....	31
3.8	Avaliação das Amostras dos Pacientes .....	36
3.9	Análise de Resultados .....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1	Resultados Moleculares .....	40
4.2	Análise do Fenótipo dos Probandos.....	59
4.3	Análise Histopatológica dos Melanomas Primários dos Probandos.....	63

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>

### **ANEXOS**

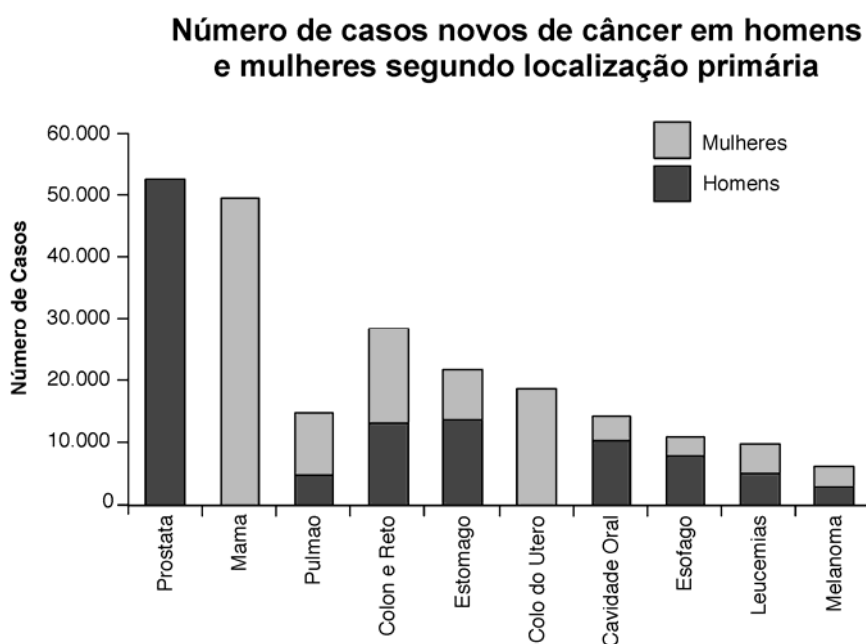
**Anexo 1** Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa

**Anexo 2** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Anexo 3** Heredogramas

## 1 INTRODUÇÃO

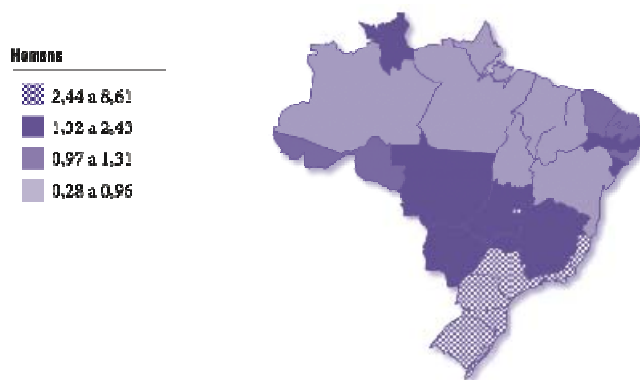
O melanoma é um câncer derivado de melanócitos, que são células procedentes da crista neural, encontradas fundamentalmente na camada basal da epiderme, e que se encarregam da produção do pigmento melânico. É um tumor com baixa incidência, porém com alta letalidade. Embora represente apenas 4% de todas as neoplasias dermatológicas, ele é responsável por 80% das mortes por câncer de pele (MILLER e MIHM 2006). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer, INCA, estimou que em 2010 ocorrerão 5.930 casos novos de melanoma, sendo 2.960 em homens e 2.970 em mulheres, representado 1,22% de todas as neoplasias (Figura 1).



**Fonte:** Ministério da Saúde (2009)

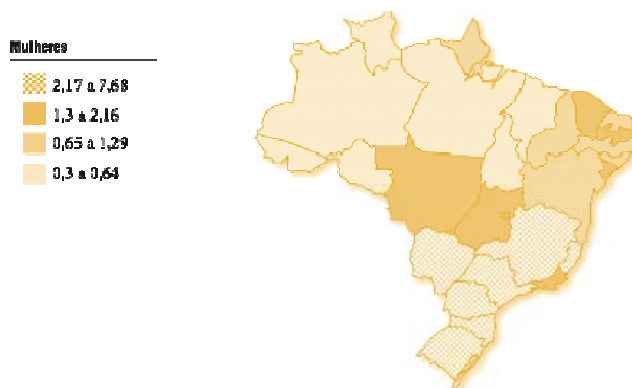
**Figura 1** – Incidência de câncer no Brasil, segundo estimativa do INCA para 2010.

As maiores taxas de incidência bruta, tanto em homens quanto em mulheres, encontram-se na região Sul, onde se observa um expressivo crescimento deste tumor em populações de pele branca. Nas regiões norte e nordeste o número de casos é menor, não só por fatores relacionados a pigmentação da pele, mas também pela subnotificação (Figuras 2 e 3).



Fonte: Ministério da Saúde (2009)

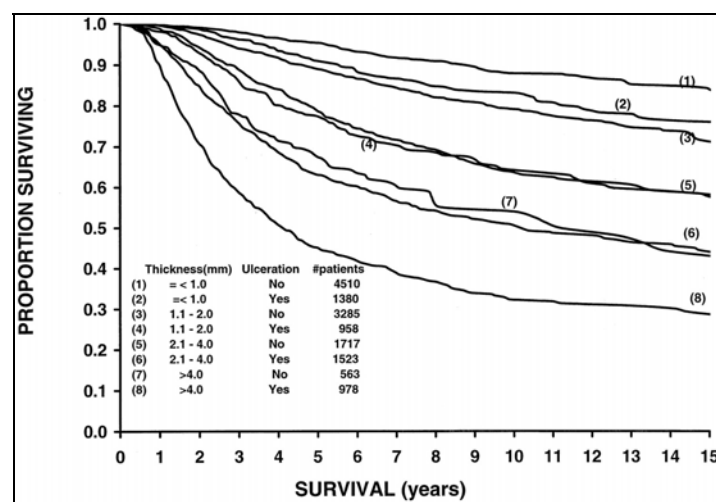
**Figura 2** – Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2010 pelo INCA.



Fonte: Ministério da Saúde (2009)

**Figura 3** – Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010 pelo INCA.

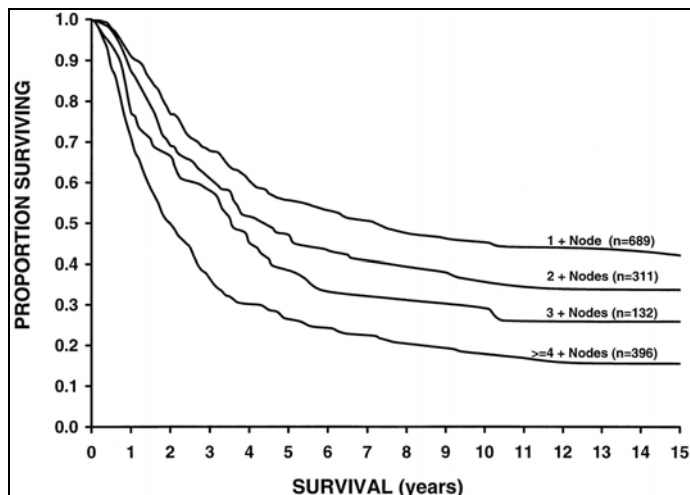
Algumas variáveis determinam o prognóstico de pacientes com melanoma. A principal delas é uma variável histológica, conhecida como índice de Breslow, que representa em milímetros a invasão da derme pelo tumor. Segundo o índice de Breslow, os melanomas são divididos em 4 categorias, que se correlacionam com o aumento da mortalidade. Pacientes com melanomas de até 1 mm tem o melhor prognóstico. Já pacientes com melanomas com índice de Breslow superior a 4 mm tem evolução pior, geralmente pela possibilidade de doença sistêmica (Figura 4).



Fonte: BALCH et al. (2001)

**Figura 4** – Sobrevida de pacientes com melanoma de acordo com o índice de Breslow.

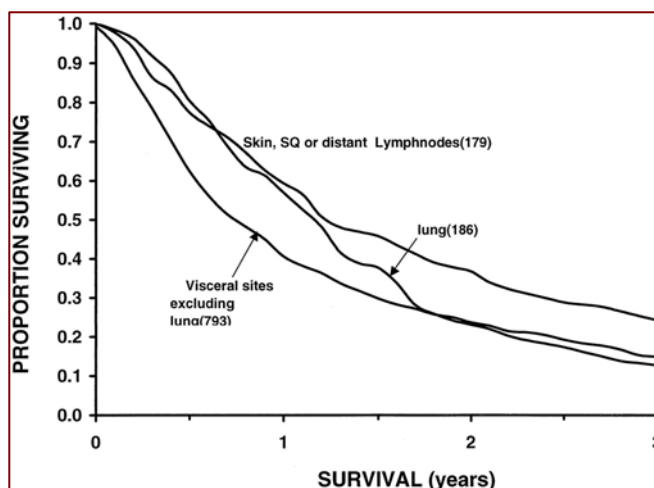
Outro fator que sabidamente se correlaciona com o prognóstico destes pacientes é a presença de metástases loco-regionais. Neste caso a piora da sobrevida acompanha o número de linfonodos comprometidos (Figura 5).



Fonte: BALCH et al. (2001)

**Figura 5** – Sobrevida de pacientes com melanoma de acordo com a presença de doença linfonodal.

Finalmente a presença de metástases a distância caracteriza os pacientes que evoluem com o pior prognóstico. Diversos sítios podem ser acometidos, dentre eles pele, subcutâneo e linfonodos fora do território do melanoma primário, pulmão, cérebro e vísceras abdominais (Figura 6).



Fonte: BALCH et al. (2001)

**Figura 6** – Sobrevida de pacientes com melanoma de acordo com a presença de metástases.



Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à sua detecção precoce. Para o melanoma localizado, a sobrevida em 05 anos é de 96%, enquanto com metástases regionais ou à distância, a sobrevida em 05 anos passa para 14%. Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73% , enquanto para os países em desenvolvimento, a sobrevida média é de 56%. A média mundial é estimada em 69% (Ministério da Saúde 2009).

O papel da luz solar na patogênese do melanoma foi proposta pela primeira vez por MCGOVERN em 1952. Atualmente está evidente que a radiação UV é pelo menos em parte, responsável pelo desenvolvimento do melanoma. No entanto, por que existe considerável variação de incidência em melanomas em todo o mundo a evidência epidemiológica da luz solar como causadora do melanoma é conflitante (LENS e DAWES 2004). A radiação solar UV tem um efeito mutagênico direto sobre o DNA cutâneo pelo estímulo de constituintes celulares da pele para produzir fatores de crescimento, reduzindo as defesas imunológicas cutâneas, e promovendo as espécies reativas de oxigênio de melanina (CHANG et al. 2009).

Virtualmente todos os estudos epidemiológicos concluíram que a pigmentação cutânea é um fator de risco para o melanoma. Mais de 95% dos melanomas são diagnosticados em populações de pele branca e, portanto, a maior parte da evidência epidemiológica se deriva do observado nestas populações (WEIR et al. 2004). A pele clara, os cabelos vermelhos e as efélides são características fenotípicas associadas com queimaduras solares, incapacidade de bronzear e são indicadores de aumento do risco para desenvolvimento do melanoma. Pouco se

conhece sobre os fatores de risco para o melanoma nos indivíduos de pele escura (PIPITONE et al. 2002).

O melanoma se desenvolve em consequência do acúmulo de uma série de anormalidades genéticas dentro do melanócito. Estas anormalidades genéticas atuam em vias que levam a proliferação celular e evasão da apoptose. Nestas circunstâncias, o melanócito fica predisposto ao acúmulo de mutações, uma vez que os mecanismos de checagem e reparo do DNA não estão operantes, permitindo que ocorram todos os aspectos do fenótipo maligno, incluindo a neoformação de vasos sanguíneos, evasão da resposta imunológica, a invasão tumoral e metástases (SATYAMOORTHY e HERLYN 2002). Os eventos moleculares que explicam o desenvolvimento do melanoma têm sido apenas parcialmente caracterizados e só um reduzido número de genes envolvidos foram identificados.

## **1.1 MELANOMA FAMILIAL – BREVE HISTÓRICO**

Há quase dois séculos se sabe da existência de famílias com predisposição ao melanoma. Em 1820, Norris e colaboradores, citado por GREENE (1999, p.1654), publicaram o primeiro caso de melanoma da literatura. Se tratava de uma família na qual dois membros tinham o diagnóstico de melanoma e vários familiares apresentavam nevos de tamanho aumentado. Em 1978, CLARK et al. publicaram 6 famílias com predisposição ao melanoma com vários familiares com nevos de aspecto diferente do habitual, os quais foram descritos como potenciais precursores do melanoma (Clark descreveu a transformação de um dos nevos em melanoma neste trabalho, salvo melhor juízo). Este quadro clínico foi mais tarde descrito como

Síndrome do Nevo Displásico (GREENE et al. 1980). Em paralelo, LYNCH et al. (1978) descreveram a mesma síndrome com o nome de Síndrome *Familial Atypical Multiple-Mole Melanoma Syndrome* (FAMMM). Esta síndrome também é conhecida como Síndrome do Nevo Atípico (BISHOP et al. 1994).

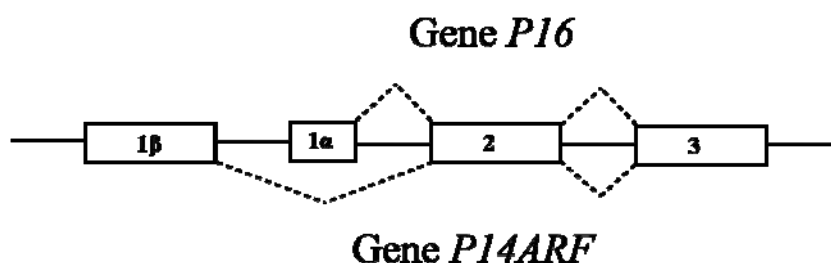
Na década de 80 foram descritas algumas raras famílias nos Estados Unidos, Europa e Austrália com múltiplos casos de melanoma e tendência a mais de um tumor primário (BISHOP et al. 2007). Acreditava-se que esta agregação familiar de tumores era devido ao resultado da interação entre presença de suscetibilidade hereditária, exposição solar, além de outros genes que modulavam a resposta da pele ao sol. Através de estudos de segregação, foi visto que o padrão de suscetibilidade era compatível com uma herança autossômica dominante, com penetrância incompleta. Em 1994, o locus *CDKN2A* foi mapeado no cromossomo 9p21 (KAMB et al. 1994; NOBORI et al. 1994) e na seqüência foi demonstrado que os membros afetados de algumas destas famílias apresentavam mutações germinativas no locus *CDKN2A* no cromossomo 9p21 (HUSSUSSIAN et al. 1994).

A partir de então, ficou claro que havia diversas alterações gênicas envolvidas na hereditariedade dos famílias que apresentavam agregação de casos de melanoma. Estas alterações estavam relacionadas principalmente ao genes do ciclo celular. Primeiramente as vias de sinalização p16/CDKs/pRb e p14ARF/p53 foram implicadas. Mais recentemente, outros genes relacionados à via de produção da melanina, principalmente o *MC1R*, foram também envolvidos. Estes genes são responsáveis por características do fenótipo relacionados com proteção da pele a exposição ambiental aos raios ultra-violeta.

## 1.2 REGIÃO 9p21 (LÓCUS *CDKN2A*)

Na região 9p21, que compreende 35 kb do genoma humano, é onde estão localizados dois *loci* supressores de tumor, o *CDKN2A* e o *CDKN2B*, estando entre os *loci* mais frequentemente inativados no câncer (LOWE et al. 2003). Estes dois *loci* podem ser conjuntamente modulados por uma região próxima conhecida como domínio regulatório (DR). Isto se dá através do recrutamento de histonas diacetilases e heterocromatização, culminando no silenciamento de toda a região (GONZALEZ et al. 2006).

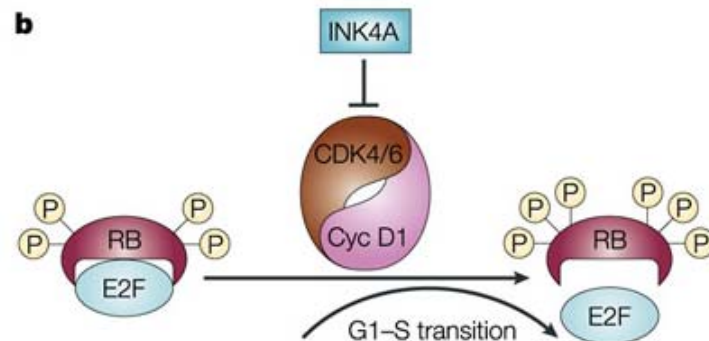
O *locus CDKN2A* (MIM: 600160) é o principal responsável pelos casos de melanoma hereditário. Neste *locus* encontram-se dois genes, *P16* e *P14ARF*, que codificam duas proteínas distintas, porém inter-relacionadas, envolvidas no controle do ciclo celular, P16 e P14 (QUELLE et al. 1995). Estas proteínas são derivadas do *CDKN2A* como resultado de dois promotores diferentes. A proteína P16 é codificada a partir dos éxons 1 $\alpha$ , 2 e 3, enquanto que a proteína P14 é formada a partir de um *splicing* alternativo do éxon 1 $\beta$  com os éxons 2 e 3 (Figura 7).



**Figura 7** – Representação esquemática do locus *CDKN2A*.

Estas duas proteínas formadas, apesar de compartilharem os éxons 2 e 3, não tem nenhuma correspondência quanto à seqüência de aminoácidos, porque a tradução é feita utilizando-se uma janela de leitura diferente (GHIORZO et al. 2006).

A proteína P16 é uma potente inibidora das quinases CDK4 e CDK6, exercendo desta maneira papel supressor tumoral (SERRANO et al. 1993). Em células normais, a proteína P16 compete com a ciclina pela ligação com as quinases CDK4 e CDK6, diminuindo a formação do complexo ciclina-CDK. Uma menor quantidade de CDK estará ativada, levando a uma diminuição da fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb). Uma redução de pRb fosforilada resulta em menor liberação do fator de transcrição E2F, que é necessário para que a célula entre na fase S e inicie a replicação do seu material genético. Isto resulta na parada do ciclo celular no ponto de restrição G1 (Figura 8).



Fonte: CHIN et al. (2003).

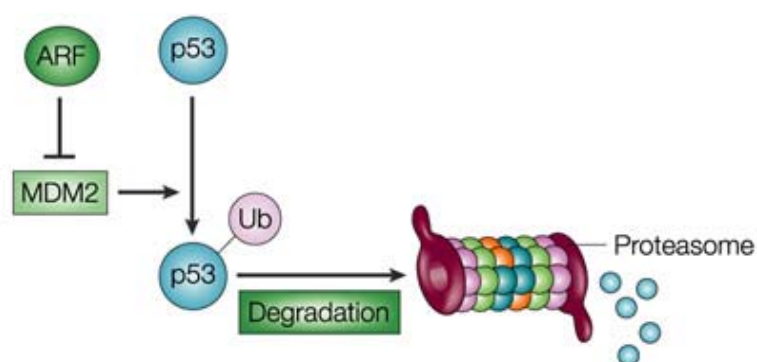
**Figura 8** – Representação esquemática da atuação da proteína P16 (INK4A) na via de sinalização da proteína do retinoblastoma (RB).

Desta maneira, mutações com inativação de P16 resultarão em comprometimento de toda a via, levando à incapacidade de interrupção do ciclo celular no ponto de restrição G1 (LILISCHKIS et al. 1996; SHERR e ROBERTS

1999; HAFERKAMP et al. 2009). A P16 pode inibir a atividade das CDKs de duas maneiras distintas. Primeiramente exercendo uma competição inibitória com seu substrato natural, que é a ciclina. Vale ressaltar que o sítio de ligação da P16 é distinto do da ciclina, mas quando ocorre a ligação P16-CDK, ocorre uma alteração conformacional da enzima que impede a ligação da ciclina. A P16 também pode se ligar ao complexo ciclina-CDK já formado, distorcendo o sítio catalítico da quinase e inibindo assim sua atividade. A atividade das CDKs é controlada principalmente pelas ciclinas, cujos níveis flutuam durante o ciclo celular, resultando em formação e ativação dos complexos ciclina-CDK. A CDK só tem atividade se estiver firmemente ligada à ciclina, sendo que esta ligação causa liberação do sítio catalítico que estava bloqueado, resultando em ativação parcial da CDK. A fosforilação do resíduo de treonina ativa ainda mais a enzima por mudança conformacional, aumentando a habilidade da enzima de se ligar a seus substratos protéicos. A inativação da CDK inibe sua habilidade de fosforilar a proteína do retinoblastoma. Devido a sua importante função como reguladoras do ciclo celular, outras proteínas homólogas, P15 (p15INK4b), P18 (p18INK4c) e P19 (p19INK4d), codificadas por outros genes, formam juntamente com a P16 (p16/INK4a) uma classe de inibidores do ciclo celular conhecida como INK (INK4 e 6 - *inhibitors of the cyclin-dependent kinases*, CDK4 e CDK6) (SHARPLESS 2005).

O gene *P14ARF* é o outro gene do locus *CDKN2A*. Mutações somáticas e deleções neste gene já foram descritas em uma grande variedade de tumores. Seu produto, a proteína P14 é um potente supressor tumoral, atividade em grande parte devida à sua habilidade em regular a via da P53, interrompendo o ciclo celular ou promovendo apoptose após dano do DNA. A P14 age principalmente através da

MDM2 (mouse double minute 2 protein), que é uma proteína com função de E3 Ubiquitina Ligase, responsável pela ubiquitinação da P53 e direcionamento para sua degradação no proteassomo (KIM e SHARPLESS 2006; RIZOS et al. 2007). A P14 se liga a MDM2, seqüestrando-a da P53, levando a um acúmulo de P53, que acarreta em interrupção do ciclo celular no ponto G2-M, permitindo que haja reparo do DNA danificado ou indução de apoptose (MILLER e MIHM 2006) (Figura 9).



**Fonte:** CHIN et al. (2003).

**Figura 9** – Representação esquemática da atuação da proteína P14 (ARF) na via de sinalização da proteína da proteína P53.

Apesar de fortes evidências bioquímicas e genéticas mostrarem que a função de a P14 é dependente de P53, existem relatos de atuações de P14 aparentemente independentes de P53 (SHERR e WEBER 2000; MCKELLER et al. 2002). Além disso, já se sabe que P14 interage com múltiplas proteínas, além de MDM2, como por exemplo E2F-1, MDMX, HIF-1 $\alpha$ , topoisomerase I, MYC e nucleofosmina (NPM). A interação melhor caracterizada é entre P14 e NPM, que é uma proteína encontrada no núcleo e que está envolvida em vários processos celulares, como processamento de ribossomos e duplicação de centrômeros. Há relatos de que mutações em NPM comprometem a via P14-TP53 tanto por levar a uma

instabilidade de TP14 quanto por causar um seqüestro de TP14 no citoplasma, onde fica impedido de inativar MDM2. Assim ocorre uma diminuição dos níveis de P53, favorecendo a proliferação celular e impedindo a apoptose em resposta a estímulos oncogênicos e estresse celular (LINDSTRÖM e ZHANG 2006).

### 1.3 GENE *CDK4*

Um subgrupo muito menor de famílias com predisposição hereditária ao melanoma podem apresentar mutação na quinase 4 dependente de ciclina, *CDK4*. Até o momento apenas duas famílias americanas (ZUO et al. 1996), duas francesas (SOUFIR et al. 1998), uma norueguesa, uma australiana, uma inglesa (MOLVEN et al. 2005), duas letonianas (PJANOVA et al. 2007, 2009) e uma italiana (MAJORE et al. 2008). Esta proteína com atividade de quinase, como já explicado, é normalmente passível de inibição pela P16 (COLEMAN et al. 1997). Entretanto na presença de mutação que ocorre exclusivamente no códon 24 (Arg24His e Arg24Cys), esta enzima se torna resistente ação inibitória do p16 e funciona como um oncogene de padrão de herança autossômico dominante. O códon 24 se trata de um *hotspot* deste gene, codificando a porção da *CDK4* responsável pelo sitio de ligação com a P16. As poucas famílias que apresentam esta mutação têm o mesmo fenótipo das famílias com mutações germinativas no *P16* (LIN et al. 2006).



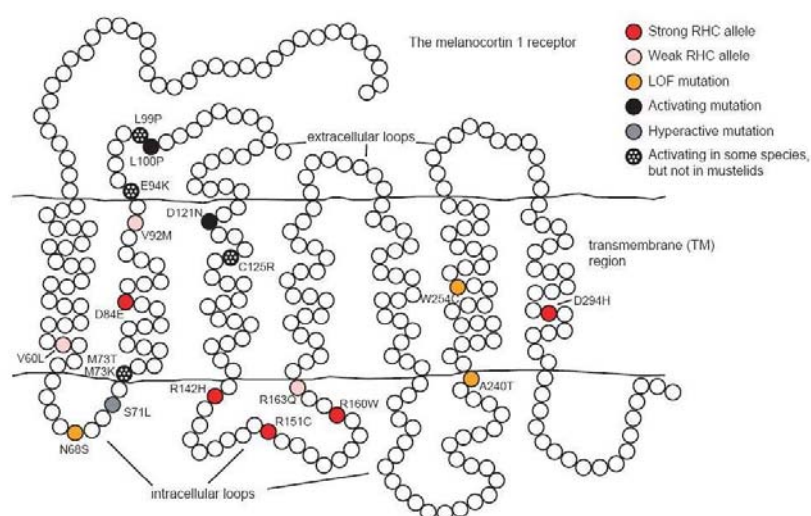
#### 1.4 GENE *MC1R* (RECEPTOR 1 DA MELANOCORTINA)

Outras características que conferem predisposição ao melanoma estão relacionadas ao fenótipo, tais como os tipos de pele mais claras e que não se bronzeiam, representadas pelos fototipos I e II de Fitzpatrick (FITZPATRICK 1988) tendência a efélides, contagem de nevos e presença de nevos atípicos. Apesar de mais de 120 genes serem responsáveis pela coloração da pele, o gene *MC1R* é considerado um dos principais (SAVAGE et al. 2007).

O gene *MC1R* está localizado no cromossomo 16q24.3, tem único éxon formado por 953 pb (GANTZ et al. 1993). O  $\alpha$ -receptor 1 da melanocortina é um tipo de receptor transmembrana acoplado a proteína G. Seus agonistas são o hormônio estimulante do melanócito ( $\alpha$ -MSH) e o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Quando ativado, o *MC1R* leva em última análise a produção de eumelanina através do aumento dos níveis da tirosinase.

Algumas variantes do *MC1R* (Arg151Cys, Arg160Trp e Asp294His) foram inicialmente relacionadas a indivíduos ruivos, de pele clara e incapazes de se bronzear e são conhecidos como “Alelos R”. Estão associados com aumento de 2,2 vezes no risco de melanoma. Mesmo após ajuste pela cor do cabelo e pelo fototipo da pele, carreadores destes Alelos R que apresentam pele mais escura e que se bronzeiam, mantêm o aumento do risco (PALMER et al. 2000). Além do aumento do risco, estes três alelos estão associados a aumento da penetrância das mutações do locus *CDKN2A*. Em um estudo a penetrância bruta foi de 50% da mutação do locus *CDKN2A*, com idade média de 58,1 anos para o desenvolvimento de melanoma. Na presença de um destes alelos R, a penetrância bruta subiu para 84% e a idade média

para desenvolvimento de melanoma caiu para 37,8 anos (BOX et al. 2001). Além dos Alelos R, uma outra variante do *MC1R* foi associada a aumento de risco para o melanoma. Este alelo, p.D84E, confere risco aumentado de 16,1 vezes para o diagnóstico de melanoma, sendo independente da cor do cabelo e do fototipo (KENNEDY et al. 2001) (Figura 10).



**Figura 10** – Representação esquemática do receptor 1 da melanocortina. Em vermelho estão os alelos que conferem maior risco para o melanoma. Em rosa claro, os alelos que conferem baixo risco. A amarelo mutações relacionadas a perda de função do receptor.

Localizado no mesmo cromossomo 16q24.3 está outro gene, *TUBB3*, ou  $\beta$ -tubulina de classe III. Este gene sabidamente exerce papel na diferenciação neuronal. Recentemente foi demonstrado que a proteína *TUBB3* é também expressa não apenas em melanócitos epidérmicos normais mas também em melanomas malignos primários. Além disso, um estudo mostrou que a perda de expressão induzida por histona deacetilase se correlacionou com quimio-sensibilidade ao placlitaxel em células de melanoma maligno (AKASAKA et al. 2009).

## **1.5 RISCO DE MELANOMA E FENÓTIPO**

### **A. NEVOS ATÍPICOS (DISPLÁSICOS)**

Com relação ao fenótipo, as características mais relacionadas a maior risco de desenvolvimento de melanoma incluem presença de nevos atípicos, síndrome do nevo atípico (SNA), presença de nevos melanocíticos múltiplos, presença de múltiplas efélides, incapacidade de bronzear, cabelos ruivos ou loiros, olhos azuis ou verdes, presença de dano actínico cutâneo e história prévia de câncer de pele não melanoma (SLADE et al. 1995; YOUL et al. 2002; TSAO et al. 2004; GANDINI et al. 2005; MILLER e MIHM 2006; BERWICK et al. 2009).

Embora ainda haja controvérsias quanto à nomenclatura, à definição clínica e aos padrões histopatológicos, genéticos e moleculares dos nevos atípicos (MILLER e MIHM 2006), vários estudos bem conduzidos demonstram que os mesmos são marcadores de risco para a ocorrência de melanoma (RIGEL et al. 1988; CAREY et al. 1994; SLADE et al. 1995; NAEYAERT e BROCHEZ 2003; TSAO et al. 2004; MILLER e MIHM 2006; BERWICK et al. 2009). Através de um estudo populacional, BATAILLE et al. (1996), estimaram que 15-20% dos indivíduos saudáveis têm pelo menos um nevo atípico, em comparação a 40-50% dos pacientes com melanoma. Além de marcadores de risco, os nevos atípicos podem ser também precursores de melanoma (NAEYAERT e BROCHEZ 2003; MILLER e MIHM 2006). O diagnóstico clínico do nevo atípico baseia-se em dois critérios maiores: lesão com diâmetro maior que cinco mm e componente plano mais evidente que o componente papuloso. Dentre os critérios menores: contornos assimétricos, bordas mal definidas e pigmentação variável, ao menos dois devem estar presentes para o

diagnostico clinico (TUCKER et al. 1997). A magnitude do risco é variável entre os portadores de nevos (RIGEL et al. 1988; KRAEMER et al. 1993; SLADE et al. 1995; MILLER e MIHM 2006). O espectro de risco varia desde indivíduos com nevos atípicos esporádicos, sem história pessoal ou familiar de melanoma, até extremo oposto onde se situam indivíduos pertencentes a famílias com dois ou mais membros que tiveram melanoma, configurando a chamada síndrome do nevo atípico e melanoma familiar (FAMMM, em língua inglesa: familial atypical multiple-mole melanoma syndrome) (LYNCH et al. 1978; RIGEL et al. 1988; KRAEMER et al. 1993; SLADE et al. 1995; MILLER e MIHM 2006).

NEWTON et al. (1993) definiram a síndrome do nevo atípico (SNA) através de um sistema de pontuação, atribuindo um ponto para cada um dos seguintes fatores: 1) dois ou mais nevos clinicamente atípicos; 2) mais que 100 nevos nos pacientes entre 20 e 50 anos; 3) mais que 50 nevos nos pacientes com idade menor que 20 anos ou maior que 50 anos; 4) mais que um nevo nas nádegas ou no dorso do pé; 5) nevo na região anterior do escalpo; 6) uma ou mais lesões pigmentadas na íris. Pacientes com pontuação maior ou igual a três apresentam o fenótipo da síndrome do nevo atípico. Quanto maior a pontuação do paciente, maior o risco de desenvolvimento de melanoma (NEWTON et al. 1993).

O risco de desenvolver melanoma não está associado apenas às características qualitativas dos nevos (típicos *versus* atípicos) do indivíduo, mas também com a quantidade total de nevos melanocíticos (GREENE 1999). Embora o número de nevos atípicos esteja diretamente relacionado com o número total de nevos melanocíticos comuns (NAEYAERT e BROCHEZ 2003), sabe-se que apresentar mais de cem nevos melanocíticos comuns na idade adulta ou mais de cinquenta na

infância ou após 50 anos de idade aumenta, de forma independente, o risco de desenvolver melanoma. Uma vez que a maior parte dos melanomas surge *de novo* e apenas cerca de 30-40% *de nevo*, nevos melanocíticos são considerados, principalmente, marcadores de risco (BEVONA et al. 2003).

## **B. FOTOTIPO E CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS RELACIONADAS**

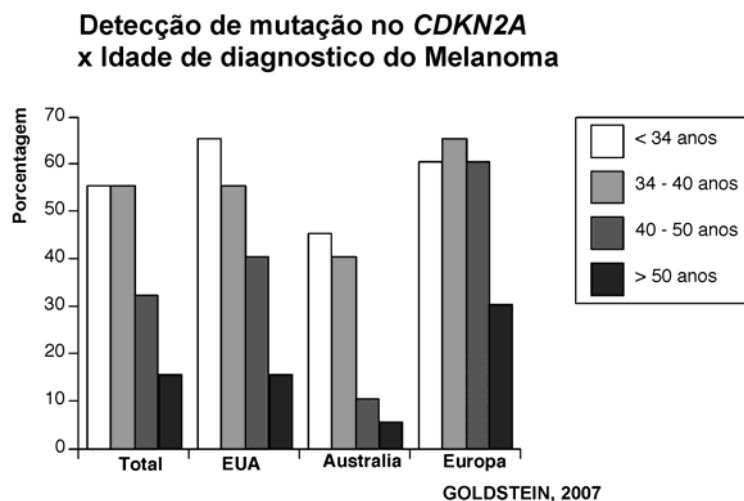
A sensibilidade da pele à exposição solar é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma, carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular (XU et al. 2006). O conceito de classificação do tipo de pele quanto à reação à exposição solar foi criado em 1975 por Fitzpatrick, citado em FITZPATRICK (1988) e determina a resposta da pele à radiação ultravioleta quanto à probabilidade de queimadura solar e capacidade de bronzeamento, variando numa escala de I a VI, onde os pacientes com fototipo I são aqueles de pele clara que sempre apresentam queimadura solar e jamais se bronzeiam e os de fototipo VI são aqueles de pele escura que jamais se queimam e sempre se bronzeiam (ROBERTS 2009).

Embora a presença de múltiplas efélides, olhos claros (azuis, cinza ou verdes), cabelos claros (loiros ou ruivos) sejam características constitucionais que geralmente se inter-relacionam, tornando difícil avaliar sua contribuição individual para o risco de câncer cutâneo, em meta-análise realizada por BLISS et al. (1995) essas características aparecem como fatores independentes para o risco de melanoma.

## 1.6 MELANOMA FAMILIAL NO MUNDO E NA AMÉRICA LATINA

O estudo destes genes envolvidos na predisposição ao melanoma tem sido realizado por diferentes grupos da Europa, Austrália, América do Norte e América Latina. Estes grupos se juntaram para formar o GenoMEL, consórcio que tem o objetivo de identificar genes de suscetibilidade ao melanoma além de avaliar a interação gene-ambiente e acessar o risco de melanoma e outros tumores da síndrome relacionados a alterações nestes genes. Em sua última publicação, 385 famílias com três ou mais membros afetados, provenientes de 17 grupos participantes foram estudadas quanto a alterações no *CDKN2A* (GOLDSTEIN et al. 2007c).

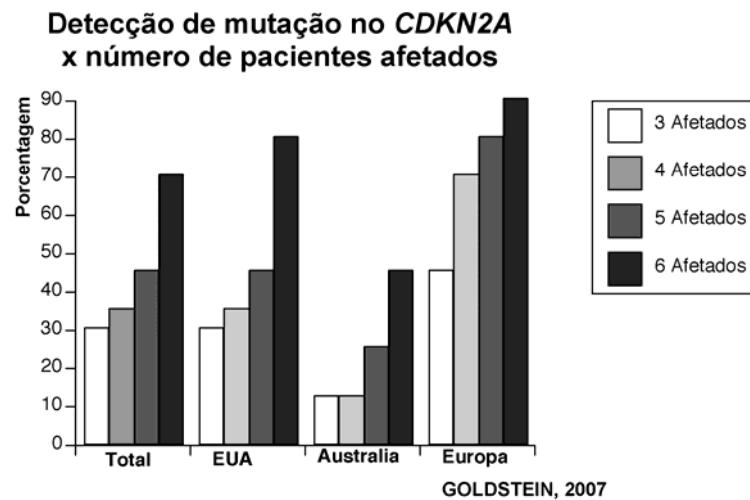
No total, 39% das famílias tiveram mutações detectadas no *CDKN2A*, variando de 20% (32/162) na Austrália, 45% (29/65) nos América do Norte, e 57% (89/157) na Europa. Este estudo tem limitações quanto a amostragem das famílias. Por não ser um estudo de base populacional, cada centro participante obteve dados dos membros da família em diferentes níveis. Ainda, foram incluídas apenas famílias com 3 ou mais afetados, selecionando um de risco maior comparado ao tanto com estudos populacionais ou com outras séries de pacientes não selecionados. Neste estudo foram identificados 4 fatores que interferiram na frequência de mutações no *CDKN2A*. O primeiro deles foi a idade média de diagnóstico do primeiro melanoma. Para se explorar a interferência desta variável com a frequência de mutações no *CDKN2A*, foram definidos quartis (<34, 34 – 40, >40 – 50, >50 anos). Todos os grupos mostraram significativo decréscimo na frequência de mutações com o aumento da idade média de diagnóstico do melanoma (Figura 11).



Fonte: GOLDSTEIN et al. (2007c).

**Figura 11** – Porcentagem de famílias com mutações no *CDKN2A* de acordo com a idade média de diagnóstico do melanoma (em anos) para cada um dos grupos (Total, América do Norte, Austrália e Europa).

Um segundo fator identificado que interferia na frequência de mutações foi o número de afetados por melanoma em uma família. A frequência de mutações aumentou significativamente a medida que o número de indivíduos afetados por melanoma aumentava em uma família. O maior aumento na detecção de mutação em famílias norte-americanas e australianas ocorreu quando se passava de 5 para 6 afetados na família. Já nas famílias europeias, o maior aumento foi visto em famílias com 4 ou mais afetados (Figura 12).

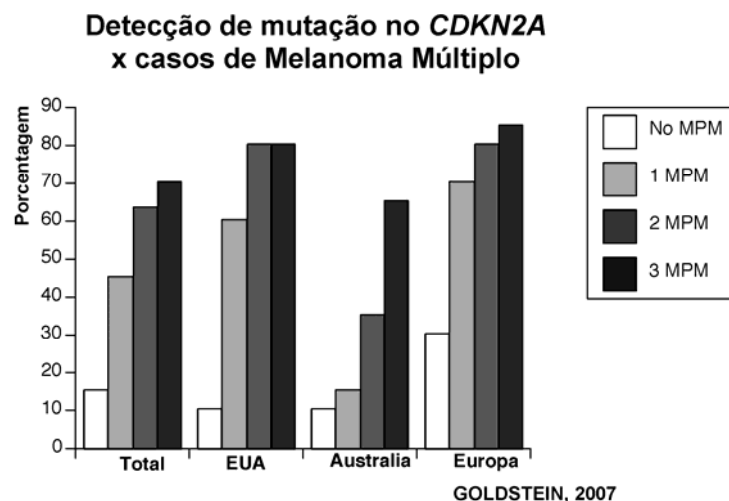


Fonte: GOLDSTEIN et al. (2007c).

**Figura 12** – Porcentagem de famílias com mutações no *CDKN2A* de acordo com o número de pacientes com melanoma na família em cada um dos grupos (Total, América do Norte, Austrália e Europa).

O número de pacientes com melanoma múltiplo na família também foi um fator preditor de mutações no *CDKN2A*. A presença de um único paciente com melanoma múltiplo na família produziu um aumento dramático na frequência de mutação em famílias norte-americanas e europeias. Na Austrália, o mesmo efeito só foi alcançado quando em famílias com dois casos de melanoma múltiplo (Figura 13).



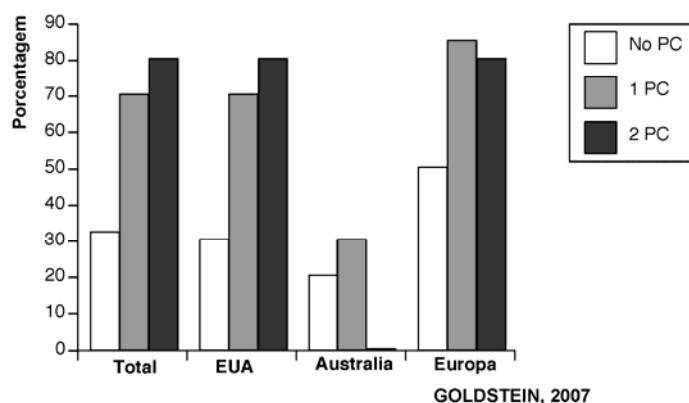


Fonte: GOLDSTEIN et al. (2007c).

**Figura 13** – Porcentagem de famílias com mutações no *CDKN2A* de acordo com o número de pacientes com melanoma múltiplo na família em cada um dos grupos (Total, América do Norte, Austrália e Europa).

O último fator analisado neste estudo que interferia na frequência de mutações foi a presença de familiares com câncer de pâncreas. Esta variável se correlacionou com a presença de mutações no *CDKN2A* em famílias norte-americanas e europeias, onde a presença de um familiar com câncer de pâncreas elevava para mais que 75% a frequência de mutações. Na Austrália, no entanto, apenas 3 entre 9 famílias com pelo menos um caso de câncer de pâncreas apresentava mutação (Figura 14).

### Detecção de mutação no *CDKN2A* x casos de Câncer de Pâncreas



Fonte: GOLDSTEIN et al. (2007c).

**Figura 14** – Porcentagem de famílias com mutações no *CDKN2A* de acordo com o número de pacientes com melanoma múltiplo na família em cada um dos grupos (Total, América do Norte, Austrália e Europa).

Ainda sobre este estudo do GenoMEL, as mutações mais prevalentes variam de acordo com o continente em estudo. Na Europa, a mutação c.225\_243del19 é a mais prevalente (18/89), seguida pela p.R112\_L113insR (11/89) e p.G101W (10/89). Na Austrália as mutações p.M53I (5/32), p.R24P, p.L32P, c.IVS2-105A→G (todas 3/29) e na América do Norte as mutações c.-34G→T (5/29), p.G101W (4/29), p.V126D (4/29) são as mais frequentes (GOLDSTEIN et al. 2007c).

Pouco se sabe quanto à frequência de mutações no *CDKN2A* na América Latina. Recentemente foi publicado um estudo com 06 famílias do Uruguai, tendo sido detectado as mutações c.-34G>T, p.Gly101Trp e p.E88X, além de uma mutação nova p.E88X, que estava associada ao melanoma hereditário em duas famílias não relacionadas (LARRE BORGES et al. 2009). Apesar de pequeno, este estudo revelou elevada frequência de mutações (5/6, 83%), enfatizando que as diferenças étnicas são importantes no estudo do *CDKN2A*.

No Brasil, apenas dois estudos sobre as alterações no *CDKN2A* em famílias com predisposição ao melanoma foram publicados até o momento. No primeiro deles, realizado pelo Departamento de Genética Médica da USP de Ribeirão Preto, foram considerados 22 pacientes com um critério amplo de inclusão: mais de um membro afetado na família ou mais de um melanoma ou melanoma diagnosticado em indivíduos abaixo de 50 anos. Foi detectada a mutação p.Pro48Thr em um indivíduo (1/22) que apresentava 3 membros na família afetado (HUBNER e RAMOS 2006). O segundo estudo foi realizado pelo grupo de genética da UFRGS, tendo sido analisadas 20 famílias com 02 ou 3 membros afetados e 15 probandos com melanoma múltiplo, sem história familiar. Foram detectadas 02 mutações no grupo com melanoma familiar (2/20) e uma variante não patogênica foi detectada entre os pacientes com melanoma múltiplo. A mutação c.-34G/T foi detectada em uma família na qual o probando havia apresentado 3 melanomas primários, além de um familiar de primeiro e outro de terceiro grau afetados e a mutação M53I em uma família cujo probando também apresentou melanoma múltiplo e tinha um familiar de primeiro grau afetado (ASHTON-PROLLA et al. 2008).

## **1.7 MELANOMA MÚLTIPLO**

Alguns pacientes oncológicos podem apresentar mais que um tumor primário do mesmo tipo histológico. No caso do melanoma, a probabilidade de ocorrência ao acaso de mais de um primário no mesmo paciente é muito menor do que o número de pacientes com melanoma múltiplo (MONZON et al. 1998). Este fenômeno pode ser explicado por exposição prolongada a um agente carcinogênico, por predisposição genética ou por ambos. Estes casos têm sido relacionados às mesmas mutações do locus *CDKN2A* encontradas nos pacientes com melanoma familiar. Uma grande parte

dos pacientes com melanoma múltiplo não tem relato de familiares afetados. Muitas vezes, no entanto, esta é uma informação de difícil obtenção mesmo em pacientes altamente motivados, e desta maneira uma história familiar de melanoma pode não ser conhecida.

A frequência de mutação no locus *CDKN2A* encontrada em pacientes com melanoma múltiplo varia de 8,3 a 47,8% (MONZON et al. 1998, MACKIE et al. 1998, HASHEMI et al. 2000, AUROY et al. 2001, MANTELLI et al. 2002, BLACKWOOD et al. 2002, PUIG et al. 2005). Dentre os fatores que influem na detecção de mutações no locus *CDKN2A* nestes pacientes, a história familiar é o mais importante. A detecção de mutação em pacientes com melanoma múltiplo e história de melanoma entre os familiares é maior (7,5 a 35,5%) quando comparados aos pacientes sem história familiar de melanoma (0 a 8,2%) (MONZON et al. 1998, MACKIE et al. 1998, HASHEMI et al. 2000, AUROY et al. 2001, MANTELLI et al. 2002, BLACKWOOD et al. 2002, PUIG et al. 2005). Além deste fator, as mutações são mais frequentes em pacientes com 3 ou mais melanomas (39,1%) quando comparados aos pacientes com apenas 2 melanomas (10%). A idade do diagnóstico do primeiro melanoma também influi na detecção de mutações no locus *CDKN2A*, sendo menos nos mutados (32,88 anos) que nos não mutados (45,84 anos) (PUIG et al. 2005).

As publicações até o momento basearam-se em grupos de pacientes com melanoma múltiplo, incluindo pacientes com ou sem história familiar (MONZON et al. 1998, MACKIE et al. 1998, HASHEMI et al. 2000, AUROY et al. 2001, MANTELLI et al. 2002, BLACKWOOD et al. 2002, PUIG et al. 2005). Nenhum estudo sobre mutações do locus *CDKN2A* foi feito apenas com um grupo de pacientes com melanomas múltiplos esporádicos até o momento.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

- 1) Definição do perfil de mutações germinativas do locus *CDKN2A* e do gene *CDK4* e dos polimorfismos do gene *MC1R* em pacientes com diagnóstico clínico de Síndrome do Melanoma Familiar (SMF) ou Melanoma Múltiplo Esporádico (MME) atendidos no Hospital AC Camargo;
- 2) Contribuir com o banco de dados clínicos e moleculares do GenoMEL para o estabelecimento da penetrância das mutações germinativas do locus *CDKN2A* e na determinação da influência dos fatores de risco ambientais estudados no estudo da SMF na América Latina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Identificar pacientes com SMF tratados no Hospital AC Camargo;
- 2) Descrever os fatores de risco pessoais e ambientais de melanoma em probandos e familiares, através de questionários de história clínica e de exposição ambiental;
- 3) Estabelecer a frequência de mutações do locus *CDKN2A* e do gene *CDK4* e dos polimorfismos do gene *MC1R* em pacientes e parentes de primeiro grau com diagnóstico da SMF.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

O projeto de pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A.C. Camargo, sendo aprovado em 12 de Junho de 2007 sob o número 934/07. Também foi aprovado no CONEP em 17 de dezembro de 2007, sob registro 14098 (Anexo 1).

#### **3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DOS PACIENTES**

Os critérios de inclusão no estudo foram:

1. Pacientes com Melanoma Múltiplo Esporádico (MME), ou seja, mais de 01 melanoma primário, sem história familiar de melanoma.
2. Famílias com Síndrome do Melanoma Familiar (SMF):
  - a. Dois familiares de primeiro ou segundo grau com melanoma;
  - b. Famílias com um ou mais casos de melanoma ocular e um ou mais casos de melanoma de primeiro ou segundo grau;
  - c. Famílias com um ou mais casos de melanoma e um caso de câncer de pâncreas em parentes de primeiro ou segundo grau.

### **3.2 PROCEDIMENTOS PARA SELEÇÃO E CONTATO COM OS PACIENTES**

Os pacientes foram selecionados pela equipe médica do ambulatório de Oncologia Cutânea, recebendo informações sobre a suspeita clínica da doença, e foram encaminhados ao Ambulatório de Melanoma Familiar. Este ambulatório foi criado durante o curso deste projeto, com a finalidade de oferecer um atendimento integral ao paciente com suspeita de ser portador de uma síndrome hereditária de predisposição ao Melanoma. Esta consulta seguia um roteiro pré-estabelecido:

- Elaboração do heredograma, que resume a história familiar, abrangendo o maior número possível de indivíduos e gerações;
- Avaliação de risco: Revisão da história oncológica pessoal e familiar, a partir de documentos fornecidos pelo próprio paciente, sendo aceitos laudos anatomopatológicos, atestado de óbito ou declaração médica. Se realizou a atualização dos dados existentes, como tipo histológico do tumor, idade de diagnóstico e evolução;
- Fenotipagem: realizada a partir de respostas objetivas dos pacientes a questionários. A partir deles foi possível determinar o fototipo, a cor dos olhos, dos cabelos aos 18 anos e a densidade de efélides. Além disso, todos os pacientes foram examinados por um dermatologista, primeiro para excluir a presença de melanoma. Em seguida foi realizada contagem dos nevos, de acordo com o tamanho (de 2 a 5 mm, e maiores que 5 mm) e com o tipo (sem ou com atipia clínica), e localização por seguimento corporal;

- Aconselhamento genético pré-teste: O paciente foi orientado por um oncogeneticista quanto à frequência do melanoma, fatores de risco ambientais e genéticos, relação entre o melanoma esporádico e hereditário, esclarecido quanto aos genes envolvidos, conceito de mutação herdada e estratégias de rastreamento do melanoma e dos tumores associados à síndrome. O paciente recebeu orientações específicas sobre o teste genético, seus benefícios, limitações e riscos. Foi também enfatizado o caráter confidencial do teste e voluntário da participação;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE): O paciente recebeu a opção de assinar o TCLE no momento da consulta ou em um retorno, após pensar sobre as informações dadas no aconselhamento genético. A partir deste consentimento informado, ele era considerado participante do presente estudo (Anexo 2).

### **3.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO**

As amostras de sangue periférico de cada paciente foram coletadas em dois tubos de 4 mL cada (*vacutainer* com EDTA) e levadas, imediatamente, ao laboratório para purificação de ácidos nucleicos onde foram mantidas à 4°C até o momento da purificação de DNA. O intervalo de tempo das amostras de sangue periférico armazenadas a 4°C é de no máximo de cinco dias.



Os procedimentos de separação de leucócitos e purificação de DNA foram de acordo aos estabelecidos pelo nosso Laboratório de Purificação de Ácidos Nucléicos do Hospital AC Camargo.

### **3.4 SEPARAÇÃO DOS LEUCÓCITOS**

O processamento se baseia na separação dos leucócitos através do Tris-EDTA-TE, pH 8.0 obtendo um *buffy coat* ou *pellet*. Consiste na transferência do sangue periférico de cada paciente para um tubo de 50 ml, completar com TE (pH 8,0) até 40ml, *vortex* por 2 minutos (ou até ficar homogêneo) e centrifugar a 2000 rpm por 7 minutos a temperatura ambiente; aspirar 35ml e deixar 5ml no tubo, *vortexar* o restante e adicionar 15ml de TE até completar 20ml no tubo de 50ml; *vortexar* por 2 minutos (ou até ficar homogêneo) e centrifugar 2000 rpm por 7 minutos a temperatura ambiente. Repetir os passos da aspiração, do *vortex* e da centrifugação.

Finalmente, aspirar 18 ml do lisado, *vortex* os 2 ml restantes e distribuir em 2 tubos de 1,5ml (aproximadamente, 1ml para cada tubo); centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente e desprezar o sobrenadante.

Deixar armazenado a -80°C até o momento da extração de DNA.

### **3.5 PURIFICAÇÃO DO DNA**

A partir do lisado de um dos tubos (o outro fica armazenado para confirmação de mutação, caso exista), se realiza a extração de DNA de um dos tubos,

considerando-se que 1 mL de sangue periférico tem cerca de 10 milhões de leucócitos do qual se extrai aproximadamente 20ug de DNA, resultando em aproximadamente 100 µg para cada 5 ml de sangue. Nos casos em que a extração de DNA não é realizada dentro de 5 dias, faz-se a separação dos leucócitos (*buffy coat*) e o precipitado é armazenado a -20 °C para posterior extração do DNA. Nessa condição a amostra pode ser armazenada por longos períodos.

O DNA genômico dos pacientes foi extraído usando-se o *Puregene® Blood Kit DNA Isolation* (Life Sciences, SP, Brasil), como descrito a seguir: a partir do tubo contendo o *buffy coat* de cada paciente, transferi-lo para um microtubo contendo 600ul de *Cell Lysis Solution*; vortexar em alta velocidade e deixar em banho maria à 55°C por 1 hora; adicionar 140 µl de *Protein Precipitation Solution* e vortexar; centrifugar a 2000g por 5 minutos à temperatura ambiente; transferir o sobrenadante para um novo tubo contendo 600 µl de Isopropanol 100%; misturar 50 vezes por inversão; centrifugar a 2000g por 3 minutos à temperatura ambiente; desprezar o sobrenadante; adicionar 1 ml de Etanol 75% e misturar por inversão; centrifugar a 2000g por 1 minuto a 4°C. Retirar com cuidado o sobrenadante e secar a temperatura ambiente e adicionar 30ul de *DNA Hydration Solution*. Finalmente, deixar *overnight* a temperatura ambiente e acondicionar a -20°C. Esta é a amostra usada para a pesquisa inicial de mutações.

### **3.6 QUANTIFICAÇÃO E QUALIDADE DO DNA GENÔMICO**

O DNA genômico dos pacientes foram quantificados no *NanoDrop ND-1000* e avaliados quanto a pureza através da determinação de OD 260 e 280. A avaliação

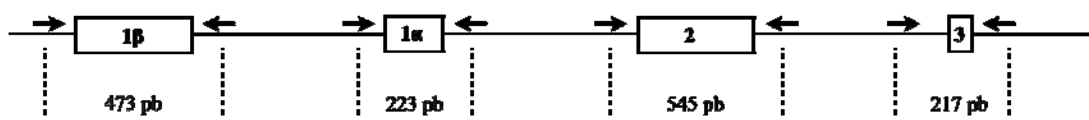
da integridade da molécula de DNA é realizada em gel de agarose 0,8% em uma corrida com duração de 60 minutos na voltagem de 100 mV. Aproximadamente um micrograma de DNA é adicionado a 4 $\mu$ l de tampão TE com 2 $\mu$ l do *Loading Buffer* 6X com glicerol. O critério de avaliação de qualidade segue os parâmetros utilizados no Banco de Ácidos Nucléicos dessa instituição. Os critérios estão descritos a seguir:

- 1 Excelente, apresenta banda única sem *smear* (aproximadamente 15.000 pb sem degradação);
- 2 Ótimo, apresenta banda única com *smear*;
- 3 Bom, não apresenta banda única e os fragmentos ficam em torno de 600 a 15 000 pb.

Esse gel é então fotografado para documentação.

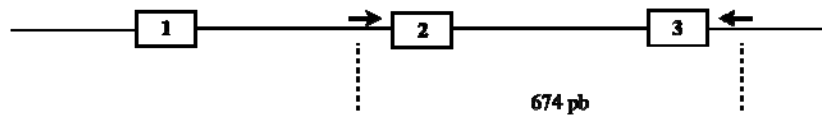
### 3.7 AVALIAÇÃO DO LÓCUS *CDKN2A*

Para este estudo, o locus *CDKN2A* foi dividido em 4 fragmentos compreendendo os 4 éxons (1 $\beta$ , 1 $\alpha$ , 2 e 3) com pequenas seqüências das regiões intrônicas (Figura 15).



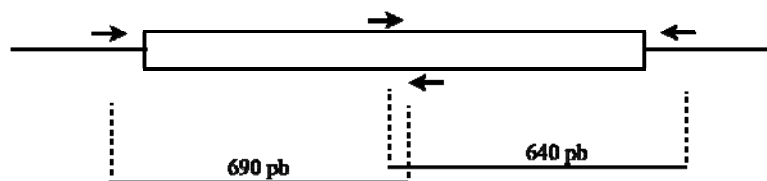
**Figura 15** - Diagrama representativo da localização dos fragmentos amplificados em relação aos iniciadores com sua respectiva região coberta de cada éxon do *CDKN2A*

Já no caso do *CDK4* apenas o códon 22 localizado no éxon 2 foi analisado, uma vez que é o *hotspot* deste gene, onde se encontra as mutações patogênicas já descritas. Desta maneira o par de iniciadores abrangia esta região.



**Figura 16** - Diagrama representativo da localização do fragmento amplificado em relação aos iniciadores, com sua respectiva região coberta dos éxons do gene *CDK4*

O gene *MC1R* não possui íntrons e é desta maneira formado por um único éxon. Apenas no caso do *MC1R* a PCR foi feita com a enzima Taq Gold<sup>®</sup> (Applied Biosystems) com um par de *iniciares* externos que gerou um fragmento de 1200 pb. Na reação de seqüenciamento um segundo par interno foi desenhado para gerar fragmentos menores de 690 e 640 pb respectivamente.



**Figura 17** - Diagrama representativo da localização do fragmento amplificado em relação aos iniciadores com sua respectiva região coberta dos éxons do gene *MC1R*.

A seqüência genômica dos genes *P16* (NM\_00007.3), *P14* (NM\_058195.2), *CDK4* (NM\_000075.2) e *MC1R* (NM\_002386.3) foram obtidas no banco NCBI/*Nucleotide*. Estas seqüências foram utilizadas como base para a elaboração

dos iniciadores, que foram desenhados nas regiões intrônicas a no mínimo 80 pb do limite éxon-íntron (Tabela 1).

**Tabela 1** - Seqüências nucleotídicas dos 7 pares de iniciadores do *CDKN2A*, *CDK4* e *MC1R*, o éxon amplificado e o tamanho.

Gene	Éxons	Primer F (5'- 3')	Primer R (3'- 5')	Amplicon
<i>CDKN2A</i>	1 $\beta$	GAGATCTTGGAGGTCCG	CCAAACAAAACAAGTGCCG	473 pb
<i>CDKN2A</i>	1 $\alpha$	GGTGCCACATTCGCTAAGTG	TCTCCCCCTCTCCGC	223 pb
<i>CDKN2A</i>	2	CACGTGAAGCCATTGC	GTCTCCCGGGCTGAAC	545 pb
<i>CDKN2A</i>	3	CACGTGAAGCCATTGC	GGTTTCTCAGAGCCTC	217 pb
<i>CDK4</i>	1	GTTGCTGCAGGCTCATAC	GGGATTTTCAGGTATGGTGC	674 pb
<i>MC1R</i>	1	GATGGAAGGAGGCAGGCATG	CGTGGTCGTAGTAGGCG	690 pb
<i>MC1R</i>	1	CCACAGCATCGTGACCC	GGATGGACTAAATGATCTCTGAAAG	640 pb

Para desenho dos iniciadores procurou-se seguir as recomendações para facilitar a extensão dos amplicons como a composição de bases C e G em torno de 60% assim como não deixar mais de duas pirimidinas entre as últimas cinco bases da extremidade 3'. Os iniciadores quase sempre começaram e terminaram com G ou C, apresentaram de 15 a 20 bases e a diferença em graus de temperatura permitida entre os pares de iniciadores foi de no máximo 2°C. Para verificar a presença de estruturas secundárias (*stem loop* e *homodimer*) foi utilizado o programa OLIGOTECH versão 1.00 (Copyright© 1995), para as quais foram permitidas temperaturas de no máximo 20°C. Todos os *iniciares* foram diluídos a uma concentração estoque de 100  $\mu$ M, de onde foram feitas alíquotas de 10  $\mu$ M, as quais foram utilizadas nas reações de PCR.

As condições de PCR para cada par de *iniciares* foram otimizadas utilizando-se inicialmente uma amostra referência. Foram realizados testes de gradiente de temperatura de anelamento. No início do projeto foi usada a enzima TaqGold<sup>®</sup> (*Applied Biosystems*) nas reações de PCR, porém devido a demora na padronização

optou-se pelo *kit* de PCR *MasterMix*<sup>®</sup> (Promega, USA). Uma vez que a concentração final do cloreto de magnésio da reação utilizando o PCR *MasterMix*<sup>®</sup> (Promega, USA) é fixa (3mM), foi necessário otimizar apenas a concentração dos iniciadores e as temperaturas de anelamento. Desta maneira, todas as reações foram feitas num volume total de 20  $\mu$ L (Tabela 2).

**Tabela 2** - Reagentes utilizados na reação de PCR do locus *CDKN2A* e do gene *CDK4*.

<i>CDKN2A (p16 e p14) e do gene CDK4</i>	
Reagente	Volume ( $\mu$ L)
DNA (50 ng/mL)	1
Primer Fw (0,1 $\mu$ M)	0,4 a 0,6
Primer Rv (0,1 $\mu$ M)	0,4 a 0,6
Master Mix <sup>®</sup> (1 $\mu$ M)	10
H <sub>2</sub> O	8,4
Volume Final	20

No caso do *MC1R* em que a enzima TaqGold<sup>®</sup> (Applied Biosystems) foi usada na reação de PCR, as condições da reação estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Reagentes utilizados na reação de PCR do MC1R.

Reagente	Volume
DNA	5
Tampão 1x	2
MgSO <sub>4</sub> (2mM)	1,6
dNTP (0,2 mM)	0,4
Primer Fw (0,2 $\mu$ M)	0,4
Primer Rv (0,2 $\mu$ M)	0,4
TaqGold <sup>®</sup> (1 $\mu$ M)	0,2
H <sub>2</sub> O	10
Volume Final	20

As amplificações foram feitas usando-se o termociclador *GeneAmp*® PCR *System 9700* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). As temperaturas ótimas de anelamento para cada par de *iniciadores* foram definidas entre 50 e 63°C. Na Tabela 4, encontra-se descrito o programa de termociclagem que foi usado para amplificação dos fragmentos.

**Tabela 4** - Programas de PCR utilizados para amplificação dos fragmentos do *CDKN2A*.

<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Passo 1	95 °C	00:05:00
Passo 2	95 °C	00:00:45
Passo 3	* T.A. °C	00:00:45
Passo 4	72 °C	00:01:00
Passo 5	Voltar ao passo 2	34 x
Passo 6	95 °C	00:07:00
Passo 7	95 °C	Infinito

\* T.A. °C: Temperatura de anelamento de cada par de *iniciadores*

Após alteração de metodologia para seqüenciamento direto, as aliquotas (5,0 µL) dos produtos de PCR adicionados a 1µl do *Loading Buffer 6X* com glicerol, foram diretamente aplicadas em gel de agarose 1% corado com *Gel Red* (Invitrogen, USA) com duração aproximada de 40 minutos na voltagem de 120V.

Foi selecionada uma amostra de uma pessoa sem histórico de doença neoplásica (amostra referência), a qual foi utilizada para seqüenciamento direto para a comparação das seqüências e caracterização da mutação. Esse DNA foi extraído através do protocolo descrito. Realizou-se a amplificação de todos os éxons do *CDKN2A*, do *CDK4* e do *MC1R*. Após confirmação do tamanho de cada fragmento em gel de agarose, foram submetidos a seqüenciamento direto no aparelho ABI 3130

(Applied Biosystems), usando o kit de seqüenciamento *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram alinhadas com a seqüência depositada no banco NCBI-Nucleotide através da ferramenta blast, disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Essa seqüência foi utilizada como padrão para avaliação das seqüências dos amplicons dos pacientes.

**Tabela 5** - Programas de PCR utilizados para amplificação dos fragmentos do *MC1R*.

<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Passo 1	95 °C	0:05:00
Passo 2	95 °C	0:00:40
Passo 3	57 °C *	0:00:45
Passo 4	72 °C	0:01:30
Passo 5	Voltar ao passo 2	34 x
Passo 6	95 °C	0:07:00
Passo 7	95 °C	Infinito

\* T.A. °C: Temperatura de anelamento de cada par de *iniciares*

### 3.8 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES

As reações de seqüenciamento seguiram as seguintes etapas: o produto das reações de PCR de cada fragmento foi purificado com o uso da reação enzimática exonuclease I e fosfatase alcalina (USB/GE, SP, Brasil) na proporção de 8µl de PCR para 1µl da mistura das enzimas. A reação foi incubada por 15 minutos a 37°C, seguida da desativação das enzimas a 80°C por 15 minutos, conforme protocolo recomendado pelo fabricante. O seqüenciamento direto dos produtos de PCR de todos os éxons do *CDKN2A* de cada indivíduo foi realizado a partir de 2 µl do



volume final da purificação enzimática (aproximadamente 50ng), com os próprios *iniciares* utilizados nas respectivas reações.

Para cada reação de seqüenciamento foram utilizados 2 µl de DNA e um volume otimizado de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, SP, USA) para todos os fragmentos (Tabela 6).

**Tabela 6** - Concentrações finais dos reagentes das reações de seqüenciamento.

Reagente	Concentração Final
Água Milli-Q	qsp
<i>Save Money Buffer</i>	1 x
<i>Iniciares</i>	0,5 mM
<i>Big Dye</i> ™	1,0 µL
Produto de PCR purificado	50 ng

Os programas de termociclagem utilizados para as reações de seqüenciamento estão descritos na Tabela 7. Os fragmentos foram seqüenciados nos sentidos *forward* e *reverse*.

**Tabela 7** - Programas definidos para cada par de *iniciares* de acordo com sua temperatura ótima de anelamento.

Ciclos	Temperatura	Tempo
Passo 1	95 °C	00:01:30
Passo 2	95 °C	00:00:18
Passo 3	T.A. °C	00:00:18
Passo 4	60 °C	00:04:00
Passo 5	Voltar ao passo 2	35 x
Passo 6	4 °C	Infinito

\* T.A. °C: Temperatura de anelamento de cada par de *iniciares*

O método para purificação da reação de seqüenciamento utilizado foi por Etanol/EDTA, como sugerido pelo fabricante - *Applied Biosystems*. As amostras foram ressuspendidas em 15 µl de formamida, desnaturadas a 95°C em termociclador e imediatamente acondicionadas em gelo por 3 minutos. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático de DNA, AbiPrism 3130 da *Applied Biosystems*.

### **3.9 ANÁLISE DE RESULTADOS**

A interpretação e edição dos resultados foi realizada utilizando o *software* CLC Bio®, que é uma plataforma que permite analisar seqüências de DNA em grande escala. Combina gerenciamento dos dados obtidos do seqüenciamento com excelente visualização de gráficos e cromatogramas., Uma de suas principais vantagens é a capacidade de anelar a seqüência referencia com o amplicon e o cromatograma.

A descrição e caracterização das alterações de seqüência encontradas foi baseada nas descrições padronizadas pelo GenoMEL, descritas no banco de mutações eMelanoBase, levando-se em conta a posição da alteração na proteína, bem como a alteração de aminoácido resultante (FUNG et al. 2003).

## 4 RESULTADOS

Foram incluídos no total 50 probandos que preencheram os critérios de inclusão descritos no Material e Métodos. Dois grupos distintos de pacientes foram criados. No primeiro deles se encontravam 18 probandos com MME, ou seja com histórico comprovado de dois ou mais melanomas primários sem familiares afetados. O segundo grupo foi composto por 32 probandos que apresentavam SMF, onde o probando afetado por melanoma apresentava familiares afetados pelos tumores definidores da síndrome, a saber: melanoma, e/ou câncer de pâncreas e/ou tumor cerebral (SMF).

Nos 50 probandos foi feito estudo molecular dos quatro éxons do locus *CKDN2A* (genes *p16* e *p14*) e do éxon 2 do gene *CDK4*. Todas as mutações detectadas foram confirmadas no DNA da amostra adicional coletada de cada paciente.

Também foi realizado seqüenciamento direto do gene *MC1R* para pesquisa de polimorfismos nos 50 probandos e nos familiares convocados que aderiram a pesquisa. Estes polimorfismos não foram confirmados em amostra pareada, uma vez que esta confirmação foi feita em amostra enviada ao consórcio GenoMEL, onde a análise e suas correlações com o fenótipo serão feitas.

O grupo com os 18 probandos chamado de Melanoma Múltiplo Esporádico (MME), apresentou 48 melanomas no total. Isto representou uma média de 2,6 melanomas por paciente, variando de 2 a 4 melanomas primários identificados em

cada paciente. A idade de diagnóstico do primeiro melanoma variou nos probandos de 16 a 76 anos, com média de 43 anos.

O outro grupo era de pacientes com SMF que apresentavam história pessoal de melanoma e familiares afetados. Foram incluídos 32 pacientes que apresentavam de 1 a 4 familiares afetados (média de 1,6 familiares afetados por probando). Foram diagnosticados um total de 42 melanomas entre os probandos (média de 1,3 melanoma por probando). Neste grupo, 23 probandos (72%) apresentavam apenas 1 melanoma e 8 probandos (25%) apresentavam melanoma múltiplo, que variavam de 2 a 4 melanomas primários. Apenas 1 probando não tinha tido melanoma, e foi o único incluído no estudo por apresentar 2 familiares de primeiro e segundo grau afetados. A idade de diagnóstico dos pacientes com melanoma familiar variou de 23 a 64 anos, com média de 45 anos.

#### **4.1 RESULTADOS MOLECULARES**

Foram detectados 9 probandos com mutações no *CDKN2A* entre os 50 probandos pesquisados (18%). Entre os 18 probandos com MME apenas um era mutado (5%), ao passo que 8 eram mutados entre os 32 probandos com SMF (25%). Os 9 probandos mutados apresentavam mutação única no locus *CDKN2A*. Essas mutações afetavam o gene *P16*, que é o principal gene do locus *CDKN2A* em 8 dos 9 probandos mutados (89%), sendo que apenas um probando apresentava alteração que envolvia de maneira exclusiva o *P14*. Também apenas um probando apresentou mutação que repercutia simultaneamente nos dois genes do locus, o *P16* e o *P14* (Tabela 8).

**Tabela 8** - Resultados moleculares dos probandos e sua relação com os números de melanomas no probando e de afetados na família.

Identificação do Probando	No. Melanomas do Probando	No. Familiares Afetados	Idade de Diagnóstico	<i>P16</i>	<i>P14</i>	<i>CDK4</i>	Polimorfismo A148T	No. Polimorfismos <i>MC1R</i>
01 - MME	2	0	46	-	-	-	sim	3
03 - MME	3	0	54	-	-	-	-	2
10 - MME	2	0	44	-	-	-	-	1
19 - MME	2	0	34	-	-	-	-	2
21 - MME	2	0	56	-	-	-	sim	3
22 - MME	3	0	30	-	-	-	-	1
23 - MME	2	0	48	-	-	-	sim	2
25 - MME	2	0	16	-	-	-	-	1
29 - MME	2	0	33	-	-	-	-	2
33 - MME	4	0	33	sim	-	-	-	1
34 - MME	3	0	51	-	-	-	-	2
35 - MME	2	0	67	-	-	-	-	1
39 - MME	3	0	76	-	-	-	-	1
40 - MME	3	0	59	-	-	-	-	1
43 - MME	4	0	62	-	-	-	-	1
51 - MME	3	0	25	-	-	-	-	*
53 - MME	2	0	25	-	-	-	-	2
55 - MME	4	0	22	-	-	-	-	*
02 - SMF	3	1	31	-	-	-	-	1
04 - SMF	2	1	30	-	-	-	-	2
05 - SMF	1	2	49	sim	sim	-	sim	2
06 - SMF	1	2	48	sim	-	-	-	2
08 - SMF *	1	4	50	-	-	-	-	0
11 - SMF	1	1	51	-	-	-	-	0
12 - SMF	1	1	44	-	-	-	-	1
13 - SMF	1	1	55	-	-	-	-	1

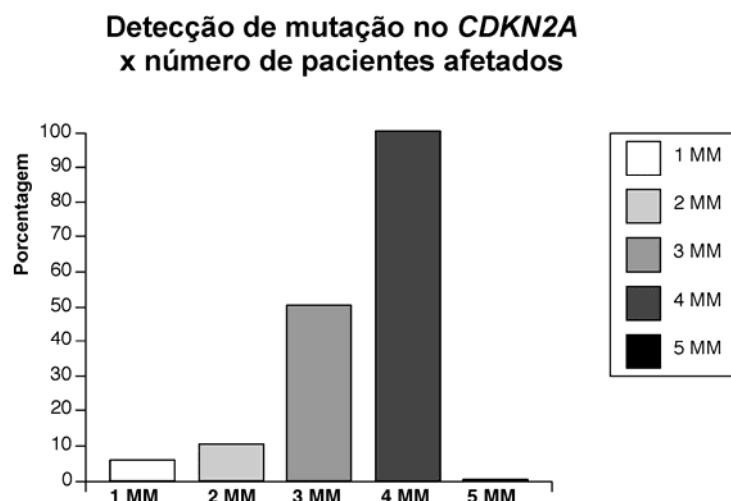
**Cont/ Tabela 8**

Identificação do Probando	No. Melanomas do Probando	No. Familiares Afetados	Idade de Diagnóstico	P16	P14	CDK4	Polimorfismo A148T	No. Polimorfismos MC1R
14 - SMF	1	1	42	-	-	-	-	1
15 - SMF	1	1	28	-	-	-	-	2
16 - SMF	1	1	64	-	-	-	sim	0
17 - SMF	2	1	23	sim	-	-	-	2
18 - SMF *	4	1	53	sim	-	-	-	2
20 - SMF	1	2	50	-	-	-	-	1
26 - SMF	1	1	52	-	-	-	-	3
27 - SMF	2	2	53	-	-	-	-	0
28 - SMF	2	1	37	-	-	-	-	1
31 - SMF *	1	2	30	-	-	-	-	0
32 - SMF	1	1	51	-	-	-	-	2
36 - SMF *	1	2	59	sim	-	-	-	1
37 - SMF *	1	1	48	-	-	-	-	1
38 - SMF	1	1	49	-	-	-	-	3
41 - SMF	1	1	46	-	-	-	-	2
42 - SMF	1	1	45	-	-	-	-	2
44 - SMF	1	2	39	sim	-	-	-	2
45 - SMF	1	1	56	-	-	-	-	0
46 - SMF	1	3	36	sim	-	-	-	3
47 - SMF	2	3	44	-	sim	-	-	2
48 - SMF	1	1	42	-	-	-	-	1
49 - SMF	1	1	44	-	-	-	-	1
50 - SMF	0	4	-	-	-	-	-	1
52 - SMF	2	2	38	-	-	-	-	*

(\*) um dos familiares afetados por melanoma múltiplo

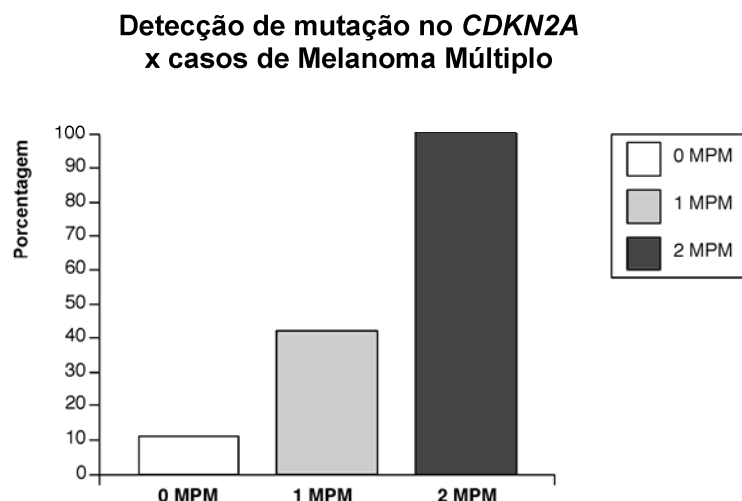
No grupo de probandos com SMF foram feitas análises na tentativa de se correlacionar a frequência de mutações com algumas variáveis clínicas.

O primeiro fator analisado foi a influência do número de familiares afetados por melanoma na frequência de detecção de mutação. Para esta análise foram consideradas 27 famílias com 2 ou mais afetados por melanoma. Cinco probandos com SMF tiveram que ser excluídos desta análise por apresentaram história de câncer de pâncreas na família como único critério de inclusão, ou seja, não havia outros casos familiares afetados por melanoma na família além do probando. Desta maneira, tivemos nesta amostra 16 famílias com 2 afetados por melanoma, sendo que dois eram mutados (12,5%). Nas famílias com 3 afetados por melanoma, a frequência foi de 71% (5/7), Finalmente um probando era mutado (25%) entre as 4 famílias com 4 afetados (Figura 18). Além disso, nas famílias em que apenas o probando era afetado, ou seja, apenas um indivíduo com melanoma múltiplo, a frequência de mutação foi de 5% (1/18) (Figura 18).



**Figura 18** – Frequência de mutações de acordo com o número de afetados na família.

O número de familiares afetados por melanoma múltiplo também foi associado a frequência de mutações. Entre as 32 famílias dos probandos com SMF, 19 não apresentavam casos de melanoma múltiplo, 12 apresentavam um caso e apenas uma família apresentava dois casos de melanoma múltiplo (Tabela 8). A frequência de mutação aumentou de 11% (2/19) nas famílias sem casos de melanoma para 42% (5/12) nas famílias que apresentavam um caso de melanoma múltiplo. A única família que dois pacientes eram afetados por melanoma múltiplo apresentava mutação (Figura 19).

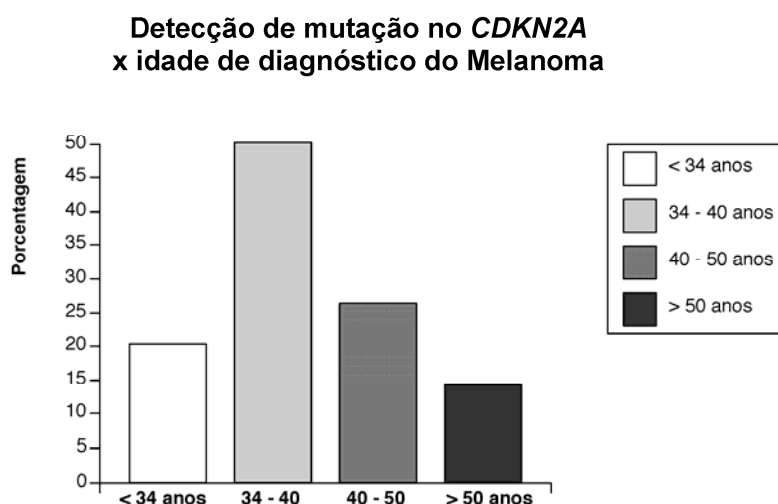


**Figura 19** - Frequência de mutações de acordo com número de casos de melanoma múltiplo.

A idade de diagnóstico do primeiro melanoma primário foi outro fator correlacionado com a frequência de mutações. Entre os probandos com SMF, a idade de diagnóstico era diferente entre os grupos de probandos mutados quando comparados com os não mutados. A idade média de diagnóstico do primeiro melanoma foi de 44 anos (variando de 23 a 70 anos) nos probandos mutados, inferior aos 50 anos (variando de 18 a 94 anos) que era a idade média dos probandos não

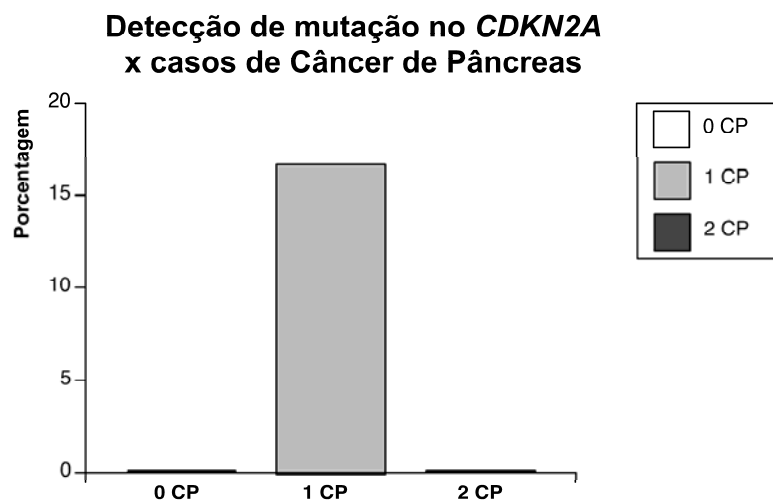


mutados. Nos probandos em que o diagnóstico do primeiro melanoma primário ocorreu antes dos 34 anos, a frequência de detecção de mutação foi de 20% (1/5). A maior frequência de detecção de mutação, 50% (2/4) foi observada entre os probandos com diagnóstico entre os 34 e 40 anos, seguidos pelos probandos diagnosticados entre 40 e 50 anos, com 27% (3/11). Finalmente probandos com diagnóstico após os 50 anos apresentavam 16% (2/12) de frequência de detecção de mutação (Figura 20).



**Figura 20** - Frequência de mutações de acordo com a idade de diagnóstico do primeiro melanoma primário em probandos.

A última variável clínica que avaliada de acordo com a frequência de mutações foi a ocorrência de câncer de pâncreas entre os familiares. Entre os 32 probandos com SMF, 26 não apresentavam familiares com câncer de pâncreas. Neste grupo nenhum paciente era mutado (0/26). Já no grupo formado por 6 probandos com familiares afetados por câncer de pâncreas, um probando apresentava mutação (1/6). Nenhum probando incluído neste estudo apresentava dois ou mais familiares com câncer de pâncreas (Figura 21).



**Figura 21** - Frequência de mutações de acordo com o número de indivíduos afetados na família com câncer de pâncreas.

O polimorfismo p.Ala148Thr que está localizado no éxon 2 que é compartilhado pelos dois genes do locus *CDKN2A* foi pesquisado em todos os probandos. Este polimorfismo foi detectado em 5 probandos (10%), 3 deles com MME e 2 com SMF. Um dos pacientes com SMF apresentava uma mutação patogênica no éxon 2 do *CDKN2A* além deste polimorfismo, porém este não foi considerado um caso de dupla mutação (Tabela 8).

Quanto ao gene *CDK4*, nenhuma mutação foi detectada no códon 24 localizado no éxon 2 entre os 50 probandos pesquisados. Este códon representa o domínio de ligação com a ciclina, sendo considerado a localização única possível de mutações patogênicas deste gene (Tabela 8).

Finalmente foi pesquisado a presença de polimorfismos no gene *MC1R*. Foram detectados polimorfismos do *MC1R* em todos os probandos com MME pesquisados. Neste grupo o número de polimorfismos por paciente variou de 1 a 3, com média de 1,6. Em apenas dois pacientes os dados dos polimorfismos do *MC1R*

não estavam disponíveis (Tabela 8). No grupo com SMF os polimorfismos do gene *MC1R* foram detectados em 25 probandos (78%), sendo que 6 probandos (19%) não apresentavam nenhum polimorfismo. A média de polimorfismos por probando neste grupo foi de 1,4 (Tabela 8).

Todos os 9 probandos apresentaram mutações nos genes do locus *CDKN2A*, com repercussão variável entre os dois genes *P16* e *P14* de acordo com o local da alteração (Tabela 9).

**Tabela 9** - Perfil de mutações em probandos com melanoma familiar e número de indivíduos afetados e tumores relacionados.

Família	Indivíduos com Melanoma (n)	Melanomas Primários (n)	Indivíduos com Ca de Pâncreas (n)	Mutações do <i>CDKN2A</i>	
				p 16 INK4A	p14ARF
2	2	4	0	Não detectada	Não detectada
4	2	3	0	Não detectada	Não detectada
5	3	4	0	p.G101W	p.R115L
6	3	4	0	p.P48T	Não detectada
8	3	4	0	Não detectada	Não detectada
11	2	2	0	Não detectada	Não detectada
12	2	1	1	Não detectada	Não detectada
13	2	1	1	Não detectada	Não detectada
14	2	1	1	Não detectada	Não detectada
15	2	2	0	Não detectada	Não detectada
16	2	2	0	p.P48T	Não detectada
17	2	3	0	c.- 34 G>T	Não detectada
18	2	5	0	Não detectada	Não detectada
20	3	3	0	Não detectada	Não detectada
26	2	2	0	Não detectada	Não detectada
27	3	3	0	Não detectada	Não detectada
28	2	3	0	Não detectada	Não detectada
31	3	4	0	Não detectada	Não detectada
32	3	3	0	Não detectada	Não detectada
36	3	3	0	c.- 34 G>T	Não detectada
37	2	2	0	Não detectada	Não detectada
38	2	2	0	Não detectada	Não detectada
41	1	1	1	Não detectada	Não detectada
42	2	2	0	Não detectada	Não detectada
44	2	2	0	p.P48T	Não detectada
45	2	2	0	Não detectada	Não detectada
46	3	3	0	IVS2 - 105 A>T	IVS2 - 105 A>T
47	3	3	1	Não detectada	p.V84M

A informação de que o *P16* é o principal gene relacionado aos casos mutados representando 89% (8/9) das mutações encontradas é enfatizada na Tabela 9. Este gene está exclusivamente envolvido em 7 dos 9 probandos mutados (probandos 6,

17, 18, 33, 36, 44 e 46). Nestes casos isso ocorre devido à mutação c.-35G>T na região promotora deste gene, a mutação p.Pro48Thr ocorrer no éxon 1 $\alpha$  que é próprio do *P16* ou a mutação intrônica c.IVS-105A>G que repercute no processo de splicing do mRNA deste gene.

Em apenas um dos 9 probandos foi detectada uma mutação localizada no éxon 2 do *CDKN2A*. Por ser um éxon compartilhado pelo *P16* e pelo *P14*, repercute nos dois genes, com os produtos protéicos p.Gly101Trp e p.Arg115Leu respectivamente (Tabela 9).

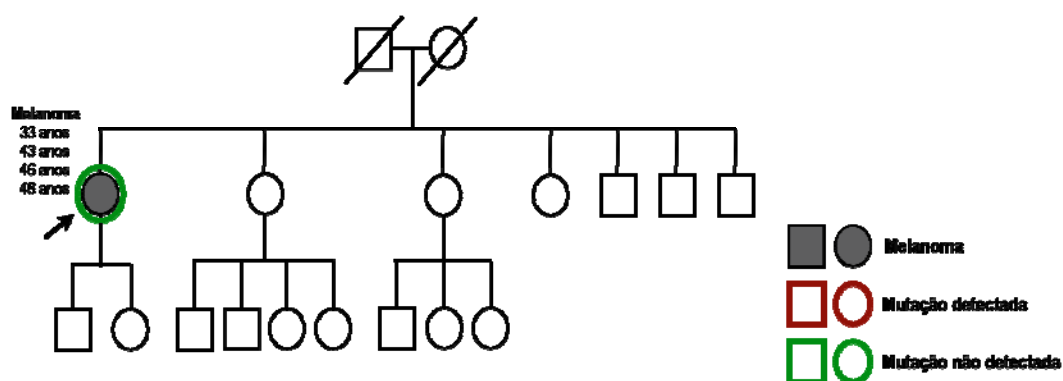
Finalmente o probando de número 47 apresentava uma variante no éxon 1 $\beta$  que afeta apenas o gene *P14*.

Três probandos apresentaram a mesma mutação p.Pro48Thr (Probandos 06, 33 e 44) e outros três probandos a mutação c.-34G>T que foram as mais freqüentes neste estudo (33% cada). A mutação p.Pro48Thr afeta o éxon 1 e por este motivo repercute apenas no *P16*. Já a mutação c.-34G>T foi encontrada no promotor do *P16*, fora da região codificante deste gene. As demais mutações p.Gly101Trp e c.IVS-105A>T e a variante p.Val84Met foram detectadas em apenas 1 probando (11%) (Tabela 9). Esta última alteração foi denominada variante por ainda não ter sido descrita na literatura, sendo seu potencial patogênico ainda incerto.

O probando da família 06 apresentava pele clara (fototipo III), olhos azuis e cabelos loiros, além de queimadura solar na infância. Tinha 43 nevos melanocíticos no total, porém não tinha nevos atípicos. Apresentou 2 melanomas invasivos, tipo extensivo superficial, aos 48 e 49 anos. Além dele, outros dois familiares de primeiro e segundo graus apresentaram melanomas invasivos diagnosticados aos 47 e 45 anos respectivamente (Figura 22).



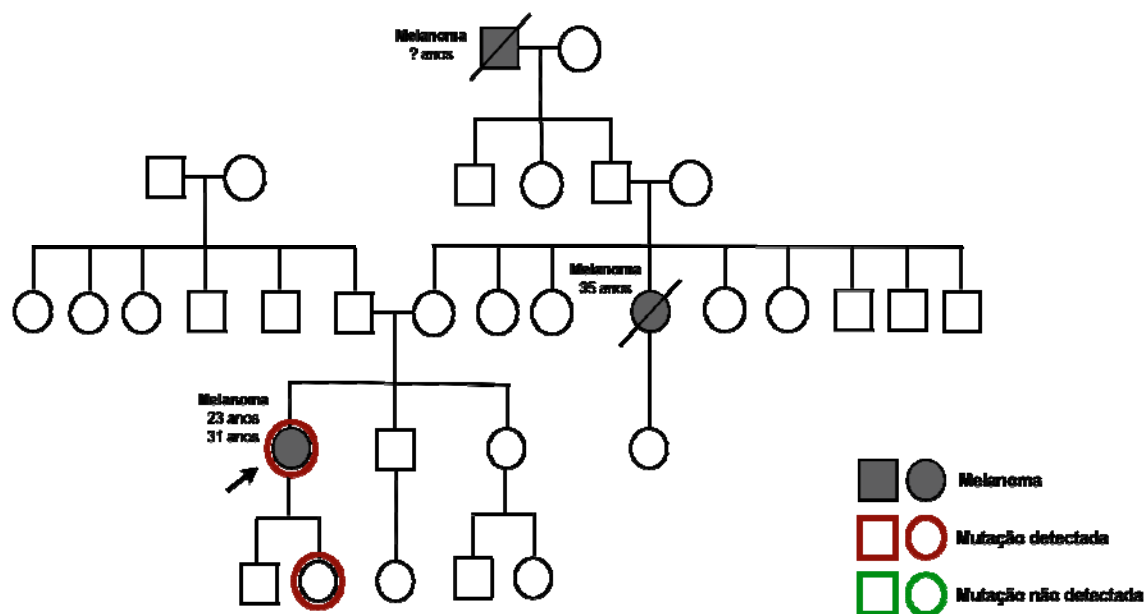
O probando 33 apresentava pele clara (fototipo II), olhos e cabelos castanhos, sem história de queimadura solar. Tinha Síndrome do Nevo Atípico, com 78 nevos melanocíticos comuns e 1 atípico. Apresentou melanoma múltiplo, sem outros casos na família. Teve 4 melanomas, destes apenas 1 invasivo, sendo o primeiro diagnosticado aos 33 anos de idade (Figura 24).



**Figura 24** - Heredograma da família 33.

A mutação c.- 34 G>T foi também identificada em 3 probandos (17, 18 e 36) (Figuras 22, 23 e 24). Estes probandos não apresentavam ascendência canadense ou inglesa, onde foi descrito o efeito fundador desta mutação. A família 17 tem ascendência brasileira conhecida, a família 18 tem ascendência portuguesa, italiana e africana.

O probando da família 17 apresentou 2 melanomas diagnosticados aos 23 e 31 anos. Além deste paciente, uma tia materna faleceu em decorrência de melanoma aos 35 anos de idade. O único familiar que compareceu para o teste genético foi a filha, que também apresentava a mesma mutação c.- 34 G>T (Figura 25).



**Figura 25** - Heredograma da família 17.

O probando da família 18 apresentava história de melanoma múltiplo, com 4 lesões primárias, sendo a primária delas diagnosticada aos 53 anos. Um outro familiar de primeiro grau, um irmão, também tinha história de melanoma múltiplo primário, com diagnóstico aos 38 e 49 anos. Este familiar também apresentou a mutação c.- 34 G>T. Além dele, outros três irmãos que foram submetidos ao teste genético se mostraram carreadores da mutação c.- 34 G>T, porém não apresentavam diagnóstico de melanoma. Os dois filhos do probando que foram pesquisados além de dois outros irmãos apresentavam pesquisa negativa da mutação c.- 34 G>T (Figura 26).



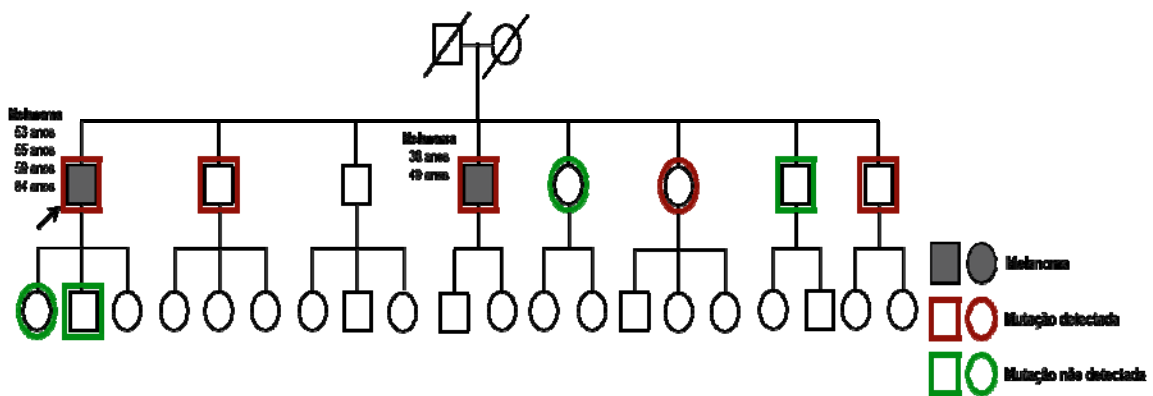


Figura 26 – Heredograma da família 18.

A família 36 apresentava 3 casos de melanoma. O probando além do filho com melanoma múltiplo diagnosticado aos 45 e 35 anos, tinha um irmão com melanoma aos 38 anos. O filho com melanoma apresentava a mesma mutação da mãe. Apenas uma sobrinha compareceu para o teste genético, porém não apresentava a mutação (Figura 27).

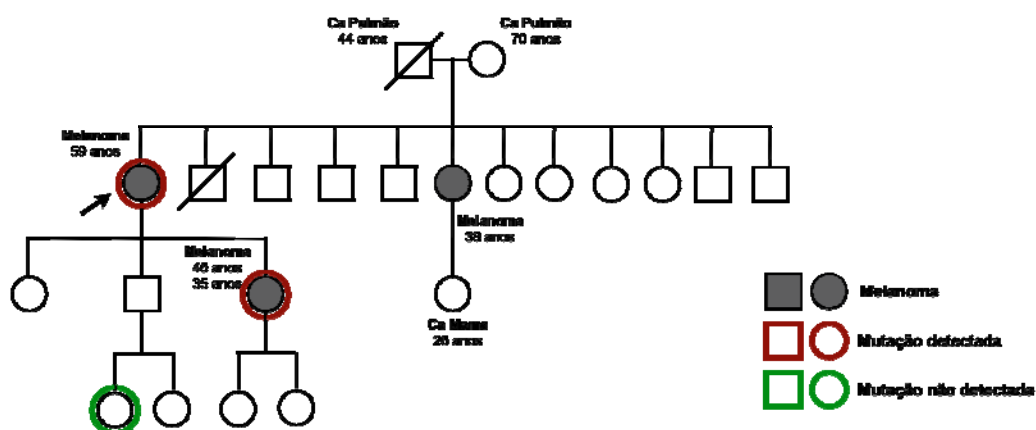
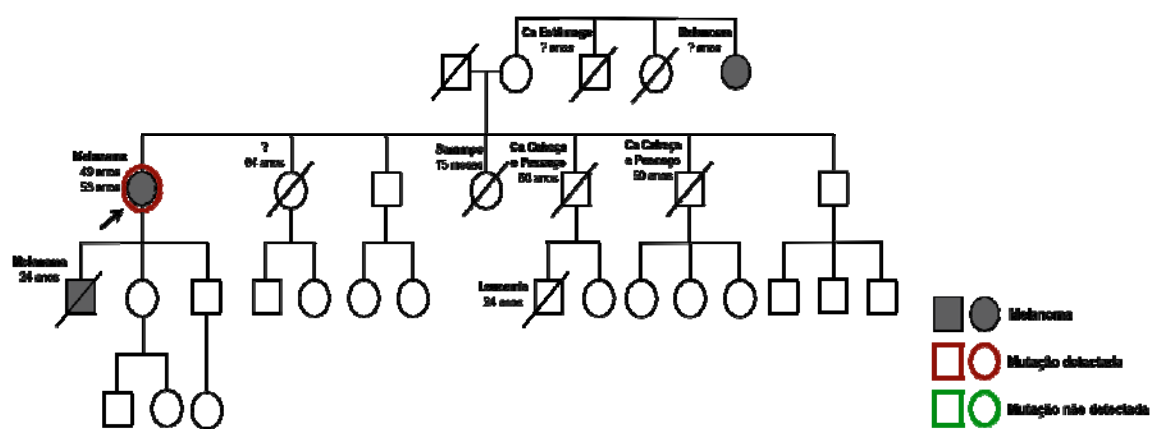


Figura 27 – Heredograma da família 36.

Neste estudo, apenas na família 5 foi detectada a mutação p.Gly101Trp. Esta família tinha ascendência italiana, onde foi descrito o efeito fundador. Nesta família, o melanoma foi diagnosticado no probando aos 49 e 53 anos, sendo o único indivíduo pesquisado nesta família. Seu filho faleceu aos 24 anos em decorrência de melanboma e seu tio materno apresentou melanoma em idade que não foi confirmada (Figura 28).



**Figura 28** – Heredograma da família 05.

A mutação IVS-105 A>G foi detectada apenas na família 46 com ascendência italiana e espanhola. Nesta família 3 um total de 3 indivíduos apresentavam melanoma e um apresentava tumor cerebral. O probando teve melanoma diagnosticado aos 35 anos, um irmão aos 42 anos e um sobrinho aos 37 anos. O caso de tumor cerebral foi diagnosticado em uma tia paterna, que veio a falecer aos 63 anos. Apenas o filho do probando compareceu para a pesquisa de mutação, que se mostrou negativa (Figura 29).

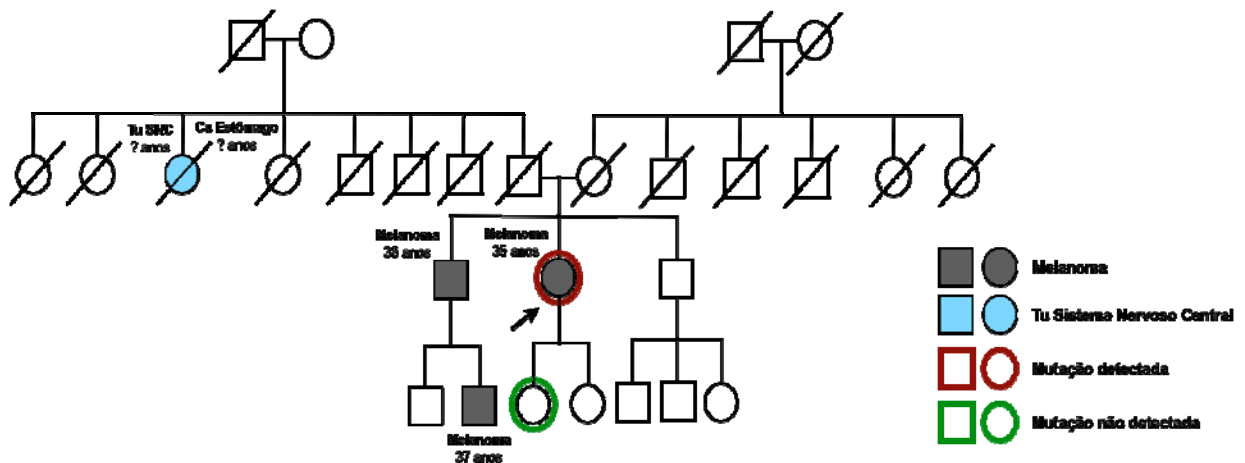


Figura 29 – Heredograma da família 46.

Finalmente, a alteração p.Val84Met foi detectada no probando 47 que tem ascendência materna húngara e história de melanoma múltiplo aos 44 e 45 anos. Um irmão teve o melanoma diagnosticado aos 48 anos, porém não apresentava a alteração. Um outro irmão era carreador da alteração sem apresentar o fenótipo de melanoma. Foram ainda testados um outro irmão, que era negativo e o pai que era positivo. Um tio paterno que representa o terceiro caso de melanoma nesta família, que foi detectado aos 75 anos, não compareceu para o teste molecular (Figura 30).

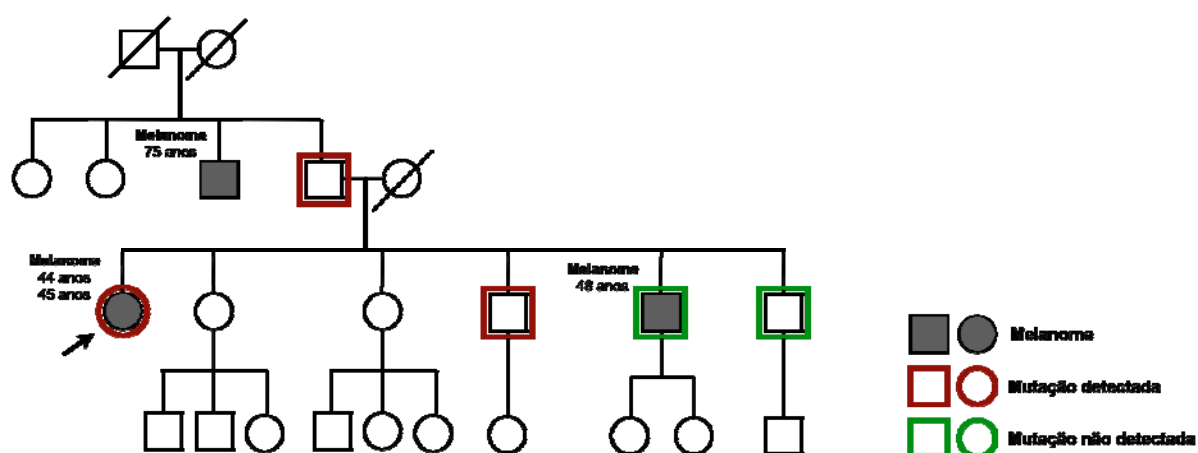


Figura 30 – Heredograma da família 47.

As mutações detectadas nos probandos foram investigadas nos familiares que atenderam à convocação para participação no estudo (Tabela 10). Nestes casos foi feita uma pesquisa específica da mutação detectada nos probandos, além de análise dos polimorfismos do gene *MC1R*. Nestes familiares o restante do locus *CDKN2A* e o gene *CDK4* não foram investigados. Foram convocados familiares com e sem melanoma, para ser analisado a relação entre o fenótipo e o dado molecular (Tabela 10).

**Tabela 10** – Rastreamento das alterações detectadas nos probandos nos seus respectivos familiares.

Família	Identificação	Melanoma	Mutação Probando	Mutação familiares	Pesquisa dos Polimorfismos do <i>MC1R</i>		
05 - SMF	05.1 (probando)	sim	p.Gly101Trp	sim	p.Val60Leu	p.Asp84Glu <sup>§</sup>	
06 - SMF	06.1 (probando)	sim	p.Pro48Thr	sim	p.Val60Leu	p.Arg151Cys*	
17 - SMF	17.1 (probando)	sim	c.-34G>T	sim	p.Val156Leu	p.Arg160Trp*	
	17.2	não		não	p.Val156Leu		
18 - SMF	18.1 (probando)	sim	c.-34G>T	sim	p.Cys35Tyr	p.Val60Leu	
	18.2	não		sim	p.Cys35Tyr	p.Val60Leu	
	18.3	não		sim	p.Cys35Tyr	p.Val60Leu	
	18.4	não		não	p.Cys35Tyr	p.Val60Leu	
	18.5	não		não	p.Gln233Gln		
33 - MME	33.1 (probando)	sim	p.Pro48Thr	sim	p.Val60Leu		
36 - SMF	36.1 (probando)	sim	c.-34G>T	sim	p.Val156Leu		
	36.2	sim		sim	p.Val156Leu		
44 - SMF	44.1 (probando)	sim	p.Pro48Thr	sim	p.Arg223Trp	p.Arg160Trp*	
	44.2	não		não	p.Arg223Trp		
	44.3	não		não	p.Arg223Trp	p.Arg160Trp*	
	44.4	não		não	p.Arg223Trp	p.Arg160Trp*	
	44.5	sim		sim	p.Arg223Trp	p.Arg160Trp*	
	44.6	não		sim	p.Arg142His	p.Arg160Trp*	
	44.7	não		não	p.Arg223Trp		
46 - SMF	46.1 (probando)	sim	c.IVS-105A>G	sim	p.Val92Met	p.Arg163Gln	p.Thr314Thr
47 - SMF	47.1 (probando)	sim	p.Val84Met	sim	p.Val60Leu	p.Arg163Gln	
	47.2	não		sim	p.Val60Leu	p.Thr314Thr	
	47.3	sim		não	p.Val60Leu	p.Arg160Trp*	
	47.4	não		não	p.Val60Leu	p.Arg160Trp*	

(<sup>§</sup>) a variante p.Asp84Glu do *MC1R* está associada a um risco de 16,1 vezes maior de melanoma

(\*) as variantes p.Arg151Cys e p.Arg160Trp do *MC1R* que estão associadas um risco 2,2 vezes maior de melanoma

Os indivíduos foram identificados primeiro pelo número da família, seguido pelo número que representava a ordem de inclusão no estudo, não tendo relação direta com o grau de parentesco com o probando (Tabela 10).

Quinze familiares dos 9 probandos mutados compareceram para a pesquisa de mutações. Isto representa uma média de 1,6 familiares para cada probando mutado, variando entre 1 e 6 familiares. Nestes 5 probandos mutados onde foi possível analisar os familiares observou-se que os familiares que tinham história de melanoma apresentavam a mesma mutação detectada no probando, conforme era esperado. O único caso que não seguiu este padrão foi na família do probando 47, onde um dos familiares era negativo para a alteração p.Val84Met, porém apresentava história comprovada de melanoma. Entretanto, esta alteração se mostrou capaz de segregar, tendo sido detectada em um dos familiares analisados (Tabela 10).

Alguns dos familiares pesquisados se mostraram na situação inversa. A pesquisa específica de mutação foi positiva em 4 familiares (18.2, 18.3, 44.6, 47.2) que não apresentavam história de melanoma.

Por motivos diversos nenhum familiar foi analisado de 4 dos 9 probandos mutados (Tabela 10). Um deles apresentava a mutação p.Gly101Trp, outros dois apresentavam a mutação p.Pro48Thr e um apresentava a mutação intrônica c.IVS-105A>G. Entre eles se encontrava o probando 33, que se trata do único caso de MME mutado. Nestes casos, não foi possível mostrar o potencial de segregação das mutações encontradas nestes probandos e em seus respectivos familiares.

Em todos os probandos e seus respectivos familiares analisados foram detectados polimorfismos do gene *MC1R*, que nestes pacientes variam de 1 a 3 polimorfismos. Nos familiares dos 5 probandos que compareceram para o estudo

molecular, foram detectados em geral os mesmos polimorfismos detectados nos respectivos probandos.

## **4.2 ANÁLISE DO FENÓTIPO DOS PROBANDOS**

Na Tabela 11 foram descritas as características fenotípicas dos probandos, incluindo-se fototipo segundo FITZPATRICK (1988), cor dos olhos e cabelos e densidade de efélides.

Os dados de fenotipagem estão completos em todos os probandos incluídos no estudo, exceto nos referidos com número 10 e 54.

A grande maioria dos pacientes foi classificada como fototipo I ou II (85,7%), sendo 28 pacientes fototipo I e 14 pacientes fototipo II. Apenas 5 probandos foram classificados como fototipo III (10,2%) e 2 probandos como fototipo IV (4%). Nenhum dos probandos eram fototipo V ou VI.

Em relação à cor dos olhos, houve predomínio dos pacientes com olhos castanhos (57,1%), seguidos dos pacientes com olhos verdes ou cinzas (28,5%) e olhos azuis (14,2%).

Quanto à cor dos cabelos, a maioria tinha cabelos castanhos (61,2%), sendo que 36,7% apresentavam cabelos loiros e apenas 1 era ruivo (2%).

Levando-se em conta a densidade de efélides, apenas 2 pacientes não apresentavam sardas no tronco. Dentre os demais probandos, considerando-se o tronco, a maioria apresentou densidade entre 60-80 (59,1%).

**Tabela 11** - Caracterização do fenótipo dos probandos quanto ao fototipo, cor dos olhos, cor dos cabelos e presença de efélides no tronco.

<b>Probando</b>	<b>Fototipo</b>	<b>Cor dos Olhos*</b>	<b>Cor do Cabelo</b>	<b>Efélides no Tronco</b>
1	1	2	2	80
2	1	3	2	80
3	1	3	2	80
4	2	3	3	80
5	1	3	3	20
6	2	1	2	80
8	1	3	3	80
10	-	-	-	-
11	2	1	2	40
12	4	2	2	80
13	2	3	3	40
14	4	3	3	0
15	1	3	3	80
16	1	3	3	20
17	1	2	3	40
18	1	2	3	20
19	1	3	2	80
20	2	3	3	80
21	2	1	2	60
22	2	2	3	80
23	2	2	3	20
25	1	3	2	20
26	1	1	2	40
27	3	3	3	60
28	3	2	3	80
29	1	3	3	60
31	3	3	3	60
32	2	1	2	80
33	1	3	3	20
34	1	2	3	20
35	1	3	3	80
36	1	3	3	20
37	1	3	3	40
38	1	2	2	20
39	1	3	3	60
40	2	1	2	80
41	3	2	3	80
42	2	3	3	0
43	1	2	3	80
44	1	1	2	60
45	1	2	2	20
46	1	3	3	20
47	1	3	1	20
48	1	2	3	80
49	2	3	2	80
50	2	3	3	60



**Cont/ Tabela 11**

<b>Probando</b>	<b>Fototipo</b>	<b>Cor dos Olhos*</b>	<b>Cor do Cabelo</b>	<b>Efélides no Tronco</b>
51	1	3	3	100
52	3	3	3	60
53	2	3	2	60
55	1	2	2	60

(-) dados não disponíveis  
 (\*) 1- azul 2- verde ou cinza 3- castanho ou preto  
 (†) 1- ruivo 2- loiro/claro 3- castanho 4- preto

Na Tabela 12 estão descritos os dados de fenotipagem dos probandos com relação à caracterização dos nevos melanocíticos.

A contagem de total de nevos variou de 0 a 234 nevos entre os probandos analisados. A média do número total de nevos foi de 61,55, mediana de 39 e desvio padrão de 57,26. A quase totalidade dos probandos (47 dos 49, ou 95,9%) apresentou até 50 nevos. Apenas 1 probando apresentou contagem total dos nevos entre 50 e 100 nevos e um contagem superior a 100 nevos.

Dos 49 probandos, 19 (38,7%) preencheram os critérios para Síndrome do Nevo Atípico, segundo a classificação de Newton (NEWTON et al. 1993), mas 31 (63,2%) probandos não apresentavam nenhum nevo atípico na sua análise.

**Tabela 12** - Caracterização do Fenótipo quanto aos nevos.

<b>Identificação do Probando</b>	<b>Contagem de Nevos Atípicos</b>	<b>Presença de Nevo na Íris<sup>¶</sup></b>	<b>Contagem Total de Nevos</b>	<b>Escala de Nevos*</b>	<b>Síndrome do Nevo Atípico</b>
1	2	1	24	1	0
2	0	0	151	3	1
3	0	0	19	1	0
4	4	0	95	2	1
5	0	0	31	1	0
6	0	0	43	1	0
8	0	0	43	1	0
10	-	-	-	-	-
11	0	0	28	1	0
12	1	1	74	1	1
13	0	0	18	1	0
14	0	0	3	1	0
15	11	0	110	1	1
16	0	0	6	1	0
17	0	1	37	1	0
18	0	0	24	1	0
19	18	0	73	1	1
20	0	1	116	1	1
21	0	0	20	1	0
22	0	0	73	1	0
23	9	0	144	1	1
25	0	0	127	1	0
26	0	0	40	1	0
27	0	0	21	1	0
28	4	1	238	1	1
29	0	0	196	1	1
31	0	1	157	1	1
32	0	0	15	1	0
33	2	1	76	1	1
34	0	0	0	1	0
35	0	1	14	1	0
36	0	0	3	1	0
37	18	1	69	1	1
38	0	1	37	1	1
39	0	0	28	1	0
40	0	0	50	1	0
41	1	1	39	1	1
42	0	0	10	1	0
43	0	0	81	1	0
44	13	1	107	1	1
45	0	1	9	1	0
46	4	1	31	1	0
47	2	0	45	1	0
48	0	0	21	1	0
49	1	1	107	1	1
50	0	1	0	1	0

**Cont/ Tabela 12**

<b>Identificação do Probando</b>	<b>Contagem de Nevos Atípicos</b>	<b>Presença de Nevo na Íris¶</b>	<b>Contagem Total de Nevos</b>	<b>Escala de Nevos*</b>	<b>Síndrome do Nevo Atípico</b>
51	1	0	31	1	
52	36	0	200	1	1
53	1	1	97	1	1
54	-	-	-	-	-
55	3	1	35	1	1

### **4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS MELANOMAS PRIMÁRIOS DOS PROBANDOS**

Foram avaliados os exames anátomo-patológicos de 49 pacientes, sendo que em um deles, a confirmação ocorreu por relatório médico e em outro apenas por informação verbal. Um dos pacientes com história familiar não havia desenvolvido melanoma. A maioria dos probandos desenvolveu mais de um melanoma. A média de idade ao diagnóstico foi de 44 anos. Em sua maioria estavam localizados no tronco (51%), sendo o extensivo superficial, o subtipo histológico mais freqüente (54,2%). Apenas um caso de melanoma acral lentiginoso foi encontrado. A profundidade média, segundo Breslow, foi de 1,38 mm, enquanto 50% dos melanomas exibiam mitoses quando esta variável esteve disponível. Lesões precursoras estiveram presentes em 30 % dos casos em que esta variável esteve disponível.

Em apenas um paciente não foi possível a avaliação do exame anátomo-patológico, observando-se que da maioria, foi possível a realização de uma revisão dos preparados histológicos.

Dentre os dados relevantes, a mediana de idade ao diagnóstico (46 anos de idade) é diferente daquela encontrada na literatura nacional (54 anos de idade)

(SORTINO-RACHOU et al. 2006). Dados do Grupo Brasileiro de Melanoma (não publicados), com 597 pacientes portadores de melanoma primário obtidos do Registro Brasileiro de Melanoma em 2007, revelam mediana de idade ao diagnóstico de 51 anos. Na Alemanha, a mediana de idade ao diagnóstico foi de 54 anos para melanomas extensivos superficiais (GARBE e LEITER 2009).

De acordo com dados demográficos brasileiros, a localização anatômica mais freqüente do melanoma na população masculina é o tronco; nas mulheres, os membros inferiores (Ministério da Saúde 2009).

Foi surpreendentemente alta a freqüência de melanomas múltiplos nesta coorte de pacientes. Entretanto apenas 18 probandos com melanomas múltiplos não relatavam história familiar. Este dado deve ser analisado com cautela, uma vez que é relatada a ocorrência de segundo melanoma em cerca de 8% em pacientes que já o possuem. Considerando que este grupo já apresenta maior risco de desenvolvimento desta neoplasia, é provável que melanomas múltiplos sejam um resultado esperado. Entretanto, há que considerar a possibilidade de viés de seleção pelos critérios de inclusão desta investigação.

O melanoma extensivo superficial tem sido relatado como resultante de exposição intermitente à radiação ultravioleta, sendo a forma mais freqüente em caucasianos. Os resultados apresentados neste grupo de pacientes são concordantes com a literatura.

Considerando que o Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital AC Camargo é um centro de referência para lesões melanocíticas, e que a população que o freqüenta é constituída por pacientes de alto risco para melanoma, não é surpresa encontrar melanomas finos. Neste estudo a média do índice de Breslow foi de 1,38

mm. Este dado é considerado indicativo da qualidade do atendimento do grupo de oncologia cutânea desta instituição, uma vez que os melanomas têm sido diagnosticados em estágios iniciais. Comparativamente, de acordo com o Registro Brasileiro de Melanoma, onde são computados dados de diversas instituições brasileiras, a média do índice de Breslow foi acima de 2,15 mm em 2007.

Todos esses dados no meu entender precisam ser avaliados nos 2 grupos, com e sem mutação...

De acordo com o novo estadiamento proposto pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) em 2010, mitoses devem ser incluídas como fator prognóstico para melanomas, em substituição ao nível de Clark. Desta forma, a presença ou ausência de mitoses, sobretudo em melanomas finos, pode influenciar no comportamento biológico do tumor. Neste estudo, 50% dos melanomas revisados apresentaram pelo menos uma mitose. Este é um dado que indica necessidade de seguimento mais rigoroso, inclusive para os melanomas finos (GERSHENWALD et al. 2010).

A frequência do encontro de lesões precursoras em melanomas, determinadas pelo exame anátomo-patológico variou de 30 a 51%, indicando que uma porção significativa dos melanomas ocorre *de novo*. Nesta investigação, 30% das lesões disponíveis para revisão tiveram nevos melanocíticos como lesões precursoras associadas. Este dado indica, em concordância com a literatura, que portadores de nevos melanocíticos, sobretudo aqueles que os possuem uma grande quantidade de lesões, são pacientes de risco para o desenvolvimento do melanoma. Este risco não é necessariamente relacionado a presença de nevos, já que apenas 30% apresentavam lesão precursora no exame anátomo-patológico (GARBE e LEITER 2009).

## 5 DISCUSSÃO

O melanoma é atualmente no Brasil a décima neoplasia mais incidente, sendo responsável por cerca de 6.000 novos casos por ano, igualmente distribuídos entre homens e mulheres (Ministério da Saúde 2009). Nas regiões sul e sudeste, onde se encontra maior concentração da população branca, são registradas as maiores taxas de incidência, variando em torno de 2 a 8 casos por 100.000 habitantes. Nas regiões norte e nordeste é registrado menos que 1 caso por 100.000 habitantes na maioria dos estados. Acredita-se que estes dados sejam subestimados em todo o país devido à sub-notificação e que este problema seja ainda maior nos estados de menor índice de desenvolvimento humano.

A incidência do melanoma vem aumentando nas populações de pele clara em todo o mundo (KATALINIC et al. 2003; YOUL et al. 2002), sendo que no Brasil o mesmo acontece (Ministério da Saúde 2009). No diagnóstico oncológico em geral, e no melanoma em particular, é de fundamental importância o diagnóstico da doença em estágios iniciais, uma vez que a sobrevida está diretamente relacionada à profundidade de invasão da derme (BALCH et al. 2001).

A ocorrência de agregação familiar de pacientes com melanoma tem sido extensamente explorada desde o final da década de 80 até os dias atuais. O Melanoma Familiar é considerado uma síndrome clínica que confere predisposição não só ao melanoma, como também a tumores pancreáticos e do sistema nervoso central (GOLDSTEIN et al. 1995, 2006). É estimado que cerca de 10% de todos os casos de melanoma sejam de caráter hereditário (KANNENGIESSER et al. 2009).

Esta síndrome tem como mecanismo genético-molecular principal mutações germinativas no locus supressor tumoral *CDKN2A*. Apesar de seu potencial patogênico ser bem definido, as mutações no *CDKN2A* são encontradas em 20 a 40% das famílias com dois ou mais membros afetados (GOLDSTEIN et al. 2007c). Uma parcela muito menor das famílias com predisposição ao melanoma apresentam mutações no gene *CDK4* (LIN et al. 2008). Apesar de raras, mutações no *CDKN2A* e *CDK4* são altamente penetrantes (HAYWARD 2003). Um outro gene, *MC1R* que é um importante determinante da cor do cabelo, cor da pele e sensibilidade ao sol, também está envolvido na Síndrome do Melanoma Familiar. Alguns polimorfismos deste gene têm o potencial de aumentar o risco de melanoma independente do fototipo e outros de aumentar a penetrância de mutações do *CDKN2A*.

Um dos grandes incentivadores do estudo da Síndrome do Melanoma Familiar é o grupo GenoMEL. Trata-se de um consórcio mundial, líder na pesquisa da Síndrome do Melanoma Familiar, com atividades em 20 países distribuídos em 5 continentes. O Hospital A.C. Camargo foi escolhido para ser um dos dois representantes do GenoMEL no Brasil (o outro centro encontra-se em Porto Alegre) e juntando-se à Argentina, Chile, Colômbia, México e Uruguai formar o subgrupo latino-americano.

No Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital AC Camargo já se fazia diagnóstico, tratamento e seguimento de pacientes com Melanoma Familiar, mas não de maneira seguitada. O convite para integrar o GenoMEL veio junto com o início deste projeto e com a criação de um ambulatório específico para o diagnóstico e acompanhamento destas famílias. Este ambulatório tem caráter multidisciplinar e envolve além da Oncologia Cutânea, os Departamentos de Oncogenética e Patologia.

Além disso, este projeto de pesquisa integra pela primeira vez o Departamento de Oncologia Cutânea ao Laboratório de Biologia Molecular do Hospital AC Camargo. Este estudo contou com dermatologistas que faziam o atendimento dos pacientes, com enfermeira de pesquisa que auxiliava no preenchimento dos protocolos e convocação de familiares e com onco-geneticistas que corroboravam o diagnóstico da síndrome. Estas atividades seguiam uma seqüência temporal. Iniciavam-se pela consulta, quando os pacientes tinham a oportunidade de discutir sobre a história oncológica pessoal e familiar, compreendendo melhor a síndrome e suas implicações. Quando se sentiam confortáveis para a realização do diagnóstico molecular, eram encaminhados ao departamento de Oncogenética, onde foi confirmado o diagnóstico da síndrome através da análise dos comprovantes dos tumores e da história familiar. Em seguida o paciente submeteu-se a aconselhamento genético pré-teste. Neste momento, foi convidado a participar da pesquisa e a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A partir de então, colhia-se o sangue do paciente para obtenção de material genético e procedia-se à aplicação dos questionários e exames para determinação do fenótipo. Ao ser detectada uma mutação no probando, oferecia-se aos familiares com e sem doença a possibilidade de participação na pesquisa e sua inclusão no ambulatório de Melanoma Familiar. A partir de então as seguintes medidas de prevenção primária e secundária eram adotadas: 1) seguimento das lesões melanocíticas por mapeamento corporal e dermatoscopia digital; 2) orientações quanto ao auto-exame e instruções sobre lesões com potencial maligno, ou seja, surgimento de lesões novas ou mudança de lesões pré-existentes; e 3) prevenção primária (orientações quanto à foto-proteção).



Neste estudo foram incluídos 50 probandos preencheram os critérios de inclusão. Estes critérios foram os recomendados pelo GenoMEL, tendo sido modificados pelo próprio consórcio em relação aos critérios adotados pelos outros países participantes (América do Norte, Europa e Austrália). Nestes outros continentes foram incluídas famílias com pelo menos 3 indivíduos afetados. Em toda a América Latina adotou-se o critério de 2 indivíduos afetados com a finalidade de se ampliar a inclusão de famílias. Este critério menos restritivo se justificava pela expectativa de se encontrar um menor número de casos de melanoma e por consequência um menor número de indivíduos afetados por família na região.

Todos os 50 probandos incluídos neste estudos foram submetidos ao teste genético para estudo do locus *CDKN2A*, do gene *CDK4* e *MC1R*. O estudo do locus *CDKN2A* foi realizado de maneira que toda a seqüência codificante dos 4 éxons fosse analisada, além de incluir parte do promotor e do íntron 2 onde já havia sido identificadas mutações patogênicas. O estudo do *CDK4* se restringiu ao éxon 2 onde está localizado o códon 24, considerado *hot spot* deste gene. E finalmente o gene *MC1R* foi feita pesquisa de polimorfismos em toda a sua seqüência codificante. Toda esta avaliação molecular está de acordo com estudos semelhantes realizados em todos os outros países que participam do consórcio GenoMEL. Diferente do que é praticado no consórcio e do que inicialmente propusemos, decidimos realizar seqüenciamento direto de todos os casos, sem uso de técnicas de rastreamento de mutações (CHOMPRET et al. 2007).

Os 50 probandos foram identificados seqüencialmente de 1 a 55, porém 5 probandos não completaram todas as fases do estudo (aconselhamento genético pré-

teste, coleta de sangue para teste genético, preenchimento de questionários e fenotipagem).

Destes 50 probandos considerados elegíveis para o teste genético, foi detectada mutação em 9 probandos (18%). Esta frequência foi considerada dentro do esperado, uma vez que em outros estudos variou entre 20 e 40% dependendo dos critérios de inclusão adotados. Se considerarmos apenas os probandos que apresentavam familiares afetados (n= 32), a frequência de mutações passa a ser 25% (8/32). Apenas dois estudos foram realizados no Brasil, porém os critérios de inclusão foram mais amplos, o que dificulta qualquer comparação. O único estudo semelhante na América Latina foi realizado no Uruguai e incluía apenas 13 indivíduos provenientes de 6 famílias. Os mesmos critérios de inclusão recomendados pelo GenoMEL para os países latino americanos foram adotados, chegando a uma frequência de mutação em 5 dos 6 probandos analisados (83%) (LARRE BORGES et al. 2009). Esta frequência de mutação é bem acima do esperado. Além do tamanho da amostra, outra particularidade deste estudo diz respeito a composição da população uruguaia. Ela é constituída em sua maior parte por descendentes de europeus, notadamente espanhóis e italianos, diferente da brasileira que é bem mais heterogênea.

Cinco diferentes tipos de mutações foram detectadas nos 9 probandos positivos. As mutações detectadas foram principalmente do tipo *missense* (5/9), que consiste na troca de um aminoácido e altera a sequência da proteína [p.P48T (3/9), p.Gly101Trp (1/9), p.Val84Met (1/9)]. Este tipo de mutação tem o potencial de tornar o produto protéico não funcional. As mutações mais frequentes foram a p.P48T e a c.-34G>T, cada uma detectada em 3 deles (33% cada). Este foi um fato

surpreendente, uma vez que estas mutações, apesar de já terem sido descritas em pacientes com Síndrome do Melanoma Familiar, não figuram entre as mais frequentes. Esperava-se uma maior ocorrência da mutação p.Gly101Trp, que foi detectada em apenas 1 dos 9 probandos positivos. Isto porque é a mutação mais freqüente no mundo como um todo (GOLDSTEIN et al. 2006), mas também na Itália, onde teve seu efeito fundador e é um país de onde veio parcela importante da imigração européia.

A mutação p.P48T afeta a posição 1 do códon 48 no éxon 1 $\alpha$ , onde uma troca de citosina por adenina leva a uma substituição do aminoácido prolina (CCG) por treonina (ACG). Por afetar o éxon 1 $\alpha$ , ela repercute apenas na proteína p16/INK4a, não envolvendo a proteína p14/ARF. A mutação p.P48T está localizada na primeira repetição de anquirina em um aminoácido não conservado dentro da porção amino-terminal da proteína p16. Esta região é importante para a atividade inibitória da proteína p16 da mesma maneira que o domínio central, onde geralmente se encontram as mutações mais deletérias (LILISCHKIS et al. 1996). Estudos funcionais comprovaram a patogenicidade desta mutação, uma vez que essa alteração na proteína p16/INK4a induz à progressão do ciclo celular (DELLA TORRE et al. 2001). No entanto, estudos *in vitro* de ligação a CDK mostraram que esta variante retém ainda alguma atividade selvagem, colocando-a numa categoria de mutações com repercussão funcional parcial (RUAS et al. 1999). É uma mutação rara, tendo sido descrita até o momento em apenas 4 pacientes. O primeiro foi um paciente italiano que apresentava carcinoma pancreático, dois pacientes italianos com melanoma múltiplo (DELLA TORRE et al. 2001; MANTELLI et al. 2004), um

paciente brasileiro com SMF e ascendência italiana (HUBNER e RAMOS 2006) e finalmente um paciente húngaro com melanoma múltiplo (SZÉLL et al. 2007).

Na mutação c.-34 G>T ocorre uma transversão de guanina por timina na base -35 do CDKN2A, dando origem a um códon iniciador AUG aberrante, que diminui a tradução do AUG selvagem (HARLAND et al. 2000). Este tipo de mutação ocorre numa região não traduzida, 5' em relação a seqüência codificante. Esta região é conhecida como uORF (*upstream Open Reading Frame*), definidas por um códon iniciador que está fora da janela de leitura com a seqüência codificante. Uma alteração nesta região é capaz de levar a uma diminuição da transcrição da seqüência codificante em até 100 vezes (CALVO et al. 2009). Esta hipótese foi validada por estudos de clonagem e seu potencial patogênico confirmado um vez que o alelo mutado co-segregava com o fenótipo de melanoma e carcinoma pancreático, não tendo sido detectado nos indivíduos não afetados das famílias e em controles pareados da população (LIU et al. 1999). Esta mutação foi detectada em 4 famílias canadenses com ascendência inglesa, motivo pelo qual se especula uma provável origem no Canadá ou Inglaterra (HAYWARD 2003). No Brasil esta mutação também já foi identificada em pacientes do Rio Grande do Sul (ASHTON-PROLLA et al. 2008). Além do melanoma, apenas outras duas doenças foram descritas com defeito molecular semelhante (WIESTNER et al. 1998; WEN et al. 2009).

A mutação p.Gly101Trp afeta a posição 1 do códon 101 no éxon 2, onde uma transposição de guanina por timina leva a uma substituição do aminoácido glicina (GGG) pelo triptofano (TGG) na proteína p16. Esta alteração também repercute na proteína p14ARF, uma vez que o éxon 2 é compartilhado, onde uma transposição de guanina por timina leva a uma troca do aminoácido arginina (CGG) por leucina

(CTG). Esta mutação tem sido descrita em várias famílias com SMF e MME em diferentes países: Itália, Estados Unidos, Austrália, França, Israel, Espanha e Uruguai (HUSSUSSIAN et al. 1994; SOUFIR et al. 1998; HOLLAND et al. 1999; RUIZ et al. 1999; CIOTTI et al. 2000; YOUL et al. 2002), sendo hoje considerada uma das alterações mais freqüentes do *CDKN2A*.

A mutação IVS-105 A>G ocorre no íntron 2, 105 bases 5' em relação ao início do éxon 3, criando um sítio doador falso de *splicing*. Análises do cDNA de células carreadoras desta variante revelaram duas populações do transcrito, uma normal e outra aberrante. Nas 6 famílias inglesas em que a mutação foi inicialmente descrita ficou demonstrado que esta variante co-segregava com o fenótipo de melanoma, não tendo sido identificada em um painel de 100 controles saudáveis desta população (HARLAND et al. 2001).

Além da mutação IVS-105 A>G, outras mutações intrônicas têm sido investigadas em pacientes com SMF que não apresentam mutações patogênicas na seqüência codificante do *CDKN2A* ou do *CDK4*, porém ainda tem significado incerto. Estas mutações poderiam interferir em elementos intrônicos envolvidos no processo de *splicing* (HARLAND et al. 2005).

A alteração p.Val84Met afeta a posição 1 do códon 84 no éxon, onde uma transposição de guanina por adenina leva a uma substituição do aminoácido valina (GTG) por metionina (ATG). Por envolver o éxon 1 $\beta$ , tem repercussão apenas na proteína p14ARF, não afetando a proteína P16. Esta variante ainda não foi descrita na literatura, nem como alteração somática nem como germinativa. Esta alteração não segregou juntamente com o fenótipo de melanoma na família afetada. Um dos irmãos apresentava melanoma sem no entanto apresentar a alteração. Este fato

diminui a possibilidade desta alteração ter potencial patogênico, podendo representar um polimorfismo raro. A procura deste polimorfismo numa população controle sem doença, além de estudos funcionais seriam importantes para a exclusão desta alteração como causa de melanoma hereditário nesta família.

Para avaliar os fatores que influenciaram na detecção de mutação, consideramos apenas os 32 probandos com mais de um membro afetado. Destes 32 probandos, 5 (probandos 12, 13, 14, 41, 48) apresentavam familiares com câncer de pâncreas como critério de inclusão, sem outros casos de melanoma na família. Assim, 27 famílias apresentavam 2 ou mais afetados por melanoma. Famílias com 2 afetados por melanoma foram responsáveis por 59% (16/27) de toda a amostra e por 25% (2/8) das famílias que eram portadoras de mutação. Então a frequência de mutações em famílias com 2 afetados por melanoma foi de 12,5% (2/16). Assim, caso adotássemos critérios mais restritivos, incluindo famílias com 3 ou mais afetados, uma parcela dos pacientes com mutação não teriam sido identificados. Nas famílias com 3 afetados por melanoma, a frequência foi de 71% (5/7), acima do observado no GenoMEL (GOLDSTEIN et al. 2006). Finalmente quando tínhamos famílias com 4 afetados a frequência foi de 25% (1/4). No subgrupo em que apenas o probando apresentava melanoma múltiplo, sem familiares afetados, a menor frequência de mutações foi observada (5,5%, 1/18).

Em geral, casos de melanoma familiar geralmente se relacionam ao diagnóstico em indivíduos mais jovens quando comparados aos casos esporádicos. Segundo dados do GenoMEL a frequência de mutação no *CDKN2A* é maior no grupo com menor idade de diagnóstico de melanoma (HOLLAND et al. 1999; GOLDSTEIN et al. 2007c). Neste estudo observou-se que a idade média de

diagnóstico dos indivíduos afetados por melanoma era de 44 anos (variando de 23 - 70 anos) no grupo portador de mutação. Já entre os não mutados, a média de idade de diagnóstico do primeiro melanoma foi, conforme esperado, maior que o outro grupo (50 anos, variando de 18 - 94 anos). Entre os pacientes deste estudo, os indivíduos com menos que 34 anos não representaram o grupo com maior detecção de mutação. Paciente com melanoma diagnosticado entre 34 e 39 anos representaram a faixa etária com maior detecção de mutação (50%), porém pelo tamanho da amostra não é possível se fazer correlações estatísticas.

Apenas um probando não tinha tido melanoma, e foi indicado para teste genético por não haver outros parentes vivos com diagnóstico de melanoma. A maioria dos probandos deste estudo (52%) apresentavam melanoma múltiplo, variando de 2 a 4 melanomas. Mesmo após excluir os 18 probandos com melanoma múltiplo esporádico, ainda assim 32% (11/32) das famílias apresentavam casos de melanoma múltiplo. A frequência de mutações nas famílias com melanomas múltiplos tende a aumentar de acordo com o número de familiares com melanoma múltiplo. Desta maneira, nas famílias sem indivíduos com melanoma múltiplo esta frequência foi de 19% (4/21), sendo 30% com um familiar com melanoma múltiplo, atingindo 100% (1/1) na família com dois casos de melanoma múltiplo. Estas frequências são comparáveis ao observado em famílias europeias do GenoMEL (GOLDSTEIN et al. 2006).

Em análises univariadas do GenoMEL o câncer de pâncreas foi estatisticamente associado a mutações do *CDKN2A* em todas as regiões, exceto na Austrália (GOLDSTEIN et al. 2007c). Essa associação foi a que mais elevou a frequência de mutação, sendo cerca de 60% nas famílias que apresentavam um caso

de câncer de pâncreas entre familiares de primeiro ou segundo grau e de mais de 70% quando dois familiares eram afetados. Nenhuma outra variável clínica tinha este poder de elevação da frequência de detecção de mutação. Especula-se que esta influência não foi detectada em famílias australianas provavelmente porque a mutação com maior penetração neste continente não se associe a este fenótipo. Neste trabalho identificamos seis probandos que apresentavam câncer de pâncreas em familiar como único critério de inclusão (12, 13, 14, 41, 48) e um probando (47) que além de familiar com câncer de pâncreas apresentava outro com melanoma. Apenas este último apresentava mutação. Devido ao tamanho da amostra ser tão pequeno, não foi possível estabelecer relações estatísticas a respeito da influência do câncer de pâncreas na detecção de mutações do *CDKN2A*. Apesar disso observou-se que a presença de um familiar com câncer de pâncreas elevava a frequência de mutação para 16%.

Quanto aos probandos com MME, apenas um dos 18 eram mutados (5%). Neste grupo a frequência de mutações foi bem inferior ao grupo dos probandos com SMF (32%). Esta baixa frequência de mutações já foi observada em outros estudos (MONZON et al. 1998; MACKIE et al. 1998; RUIZ et al. 1999; HASHEMI et al. 2000; AUROY et al. 2001; STRATIGOS et al. 2005; PUIG et al. 2005; MAJORE et al. 2008), e provavelmente está relacionada a um grupo de pacientes que apresenta um perfil genético diferente do grupo de pacientes com familiares afetados. No caso do probando com MME em que foi detectada a mutação no gene P16, pode se tratar de uma mutação *de novo* e que desta maneira tem o potencial de ser transmitida aos descendentes e em algum momento o diagnóstico de SMF ser feito. Ainda não se exclui a possibilidade que nestes pacientes a história de melanoma exista em



familiares, porém não seja conhecida. Uma outra hipótese é que esta mutação tenha sido herdada de um dos pais e que os ascendentes ou não tenham tido melanoma por questões relacionadas a expressividade da mutação. Além disso, não se exclui a possibilidade que algum familiar tenha alguma lesão pigmentada cutânea que represente um melanoma em estágio início que não tenha sido ainda diagnóstico, justificando a importância da convocação de familiares para investigação, tarefa muitas vezes difícil de ser atingida. Para comprovar estas hipóteses seria imprescindível neste caso ter material genético dos familiares de primeiro grau para a pesquisa da mutação, além do exame físico detalhado de todas as lesões melanocíticas. Entretanto nenhum familiar deste probando compareceu à convocação.

Não foi detectado nenhum probando com mutação no locus 24 do *CDK4*. Este fato não surpreende uma vez que um número muito restrito de famílias portadoras de mutações no *CDK4* em todo o mundo foi descrito até o momento. Além disso, nos três estudos realizados na América Latina, apenas em um deles foi realizado pesquisa de mutações neste gene (LARRE BORGES et al. 2009). Neste estudo seis famílias com critérios da SMF foram pesquisadas e também nenhuma mutação no *CDK4* foi detectada. Desta maneira, até o momento não há registro do encontro desta mutação em famílias da América Latina.

Os polimorfismos do gene *MC1R* podem fornecer informações de risco de melanoma que vão além das obtidas com os dados do fenótipo.

A respeito dos melanomas detectados neste estudo, apenas um paciente não foi possível a avaliação do exame anátomo-patológico, observando-se que da maioria, foi possível a realização de uma revisão dos preparados histológicos.

Dentre os dados relevantes, a mediana de idade ao diagnóstico (46 anos de idade) é diferente daquela encontrada na literatura nacional (54 anos de idade) (SORTINO-RACHOU et al. 2006). Dados do Grupo Brasileiro de Melanoma (GBM) (não publicados), com 597 pacientes portadores de melanoma primário obtidos do Registro Brasileiro de Melanoma em 2007, revelam mediana de idade ao diagnóstico de 51 anos. Na Alemanha, a mediana de idade ao diagnóstico foi de 54 anos para melanomas extensivos superficiais (GARBE e LEITER 2009).

De acordo com dados demográficos brasileiros, a localização anatômica mais freqüente do melanoma na população masculina é o tronco; nas mulheres, os membros inferiores (Ministério da Saúde 2009).

Foi surpreendentemente alta a freqüência de melanomas múltiplos nesta coorte de pacientes. Entretanto apenas 18 probandos com melanomas múltiplos não relatavam história familiar. Este dado deve ser analisado com cautela, uma vez que é relatada a ocorrência de segundo melanoma em cerca de 8% em pacientes que já o possuem. Considerando que este grupo já apresenta maior risco de desenvolvimento desta neoplasia, é provável que melanomas múltiplos sejam um resultado esperado. Entretanto, há que considerar a possibilidade de viés de seleção pelos critérios de inclusão desta investigação.

O melanoma extensivo superficial tem sido relatado como resultante de exposição intermitente à radiação ultravioleta, sendo a forma mais freqüente em caucasianos. Os resultados apresentados neste grupo de pacientes são concordantes com a literatura.

Considerando que o Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital AC Camargo é um centro de referência para lesões melanocíticas, e que a população que

o freqüente é constituída por pacientes de alto risco para melanoma, não é surpresa encontrar melanomas finos. Neste estudo a média do índice de Breslow foi de 1,38 mm. Este dado é considerado indicativo da qualidade do atendimento do grupo de oncologia cutânea desta instituição, uma vez que os melanomas têm sido diagnosticados em estágios iniciais. Comparativamente, de acordo com o Registro Brasileiro de Melanoma, onde são computados dados de diversas instituições brasileiras, a média do índice de Breslow foi acima de 2,15 mm em 2007.

De acordo com o novo estadiamento proposto pela AJCC em 2010, mitoses devem ser incluídas como fator prognóstico para melanomas, em substituição ao nível de Clark. Desta forma, a presença ou ausência de mitoses, sobretudo em melanomas finos, pode influenciar no comportamento biológico do tumor. Neste estudo, 50% dos melanomas revisados apresentaram pelo menos uma mitose. Este é um dado que indica necessidade de seguimento mais rigoroso, inclusive para os melanomas finos (GERSHENWALD et al. 2010).

A freqüência do encontro de lesões precursoras em melanomas, determinadas pelo exame anátomo-patológico variou de 30 a 51%, indicando que uma porção significativa dos melanomas ocorre *de novo*. Nesta investigação, 30% das lesões disponíveis para revisão tiveram nevos melanocíticos como lesões precursoras associadas. Este dado indica, em concordância com a literatura, que portadores de nevos melanocíticos, sobretudo aqueles que os possuem uma grande quantidade de lesões, são pacientes de risco para o desenvolvimento do melanoma. Este risco não é necessariamente relacionado a presença de nevos, já que apenas 30% apresentavam lesão precursora no exame anátomo-patológico (GARBE e LEITER 2009).

## 6 CONCLUSÕES

- 1 Confirmou-se com este estudo o papel preponderante do locus *CDKN2A* em indivíduos com suscetibilidade ao melanoma. Os 9 probandos mutados eram portadores de mutações germinativas no *CDKN2A*, 8 em probandos com SMF e 1 em um probando com MME;
- 2 As mutações mais frequentes foram a p.Pro48Thr e a c.-34G>T detectadas em 3 probandos cada. As mutações p.Gly101Trp e c.IVS-105A>G e a alteração p.Val84Met foram cada uma detectadas em um probando;
- 3 A alteração p.Val84Met detectada neste estudo nunca foi descrita e seu potencial patogênico apesar de incerto não pode ser excluído. Além da pesquisa desta alteração em outros familiares para análises de segregação, a realização de estudos funcionais podem ser úteis no estabelecimento do seu potencial patogênico;
- 4 A frequência de mutações germinativas no *CDKN2A* foi de 25% no grupo de probandos com SMF e 5% no grupo de probandos com MME, compatíveis com dados da literatura;
- 5 Foi demonstrada correlação positiva entre a frequência de mutações germinativas no *CDKN2A* e o número de indivíduos afetados por melanoma na família, corroborando estudos prévios da literatura;

- 6 Foi demonstrada correlação positiva entre a frequência de mutações germinativas no *CDKN2A* e o número de indivíduos com melanoma múltiplo na família, corroborando estudos prévios da literatura;
- 7 Foi demonstrado que a frequência de mutações germinativas no *CDKN2A* era maior em indivíduos que apresentavam diagnóstico de melanoma em menor idade, corroborando estudos prévios da literatura;
- 8 Não foi possível correlacionar a frequência de mutações germinativas no *CDKN2A* com o número de casos de câncer de pâncreas das famílias estudadas;
- 9 Não foram identificadas mutações germinativas no gene *CDK4*, confirmando ser este gene raramente envolvido em casos de SMF e MME;
- 10 Foi identificada uma grande variedade de polimorfismos do gene *MC1R*, que estavam presentes 87% (41/47) dos probandos pesquisados, ilustrando a complexidade deste gene. Dois dos chamados polimorfismos R (p.Arg151Cys e p.Arg160Trp) e o polimorfismo p.Asp84Glu relacionados a um aumento significativo do risco de melanoma foram detectados em probandos e segregaram nas famílias com mutação germinativa no *CDKN2A*, sugerindo modulação na penetrância destas mutações.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akasaka K, Maesawa C, Shibazaki M et al. Loss of Class III  $\beta$ -Tubulin Induced by Histone Deacetylation Is Associated with Chemosensitivity to Paclitaxel in Malignant Melanoma Cells. **J Invest Dermatol** 2009; 129:1516-26.

Armstrong B. Melanoma incidence In Europe. **Cancer Causes Control** 1996; 7:195-6.

Ashton-Prolla P, Bakos L, Junqueira G Jr, Giugliani R, Azevedo SJ, Hogg D. Clinical and molecular characterization of patients at risk for hereditary melanoma in southern Brazil. **J Invest Dermatol** 2008; 128:421-5.

Auroy S, Avril MF, Chompret A, et al. Sporadic multiple primary melanoma cases: CDKN2A germline mutations with a founder effect. **Genes Chromosomes Cancer** 2001; 32:195-202.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on cancer melanoma staging system. **J Clin Oncol** 2001; 16:3622-34.

Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, et al. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. **Br J Cancer** 1996; 73:1605-1611.

Berwick M, Erdei E, Hay J. Melanoma epidemiology and public health. **Dermatol Clin** 2009; 27:205-14.

Bishop JN, Bataille V, Pinney E, et al. Family studies in melanoma: identification of the atypical mole syndrome (AMS) phenotype. **Melanoma Res** 1994; 4:199-206.

Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. **Arch Dermatol** 2003; 139:1620-4.

Bishop JN, Harland M, Randerson-Moor J, Bishop DT. Management of familial melanoma. **Lancet Oncol** 2007; 8:46-54.

Bliss JM, Ford D, Swerdlow AJ, et al. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). **Int J Cancer** 1995, 62:367-76.

Box NF, Duffy DL, Chen W, et al. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. **Am J Hum Genet** 2001; 69:765-73.

Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK. Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. **Proc Natl Acad Sci** 2009; 106:7507-12.

Carey WP, Thompson CJ, Synnestvedt M, et al. Dysplastic nevi as a melanoma risk factor in patients with familial melanoma. **Cancer** 1994; 74:3118-25.

Chang YM, Barrett JH, Bishop DT, et al. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. **Int J Epidemiol** 2009; 38:814-30.

Chompret A, Cuellar F, Elder DE, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. **J Med Genet** 2007; 44:99-106.

Ciotti P, Struwing JP, Mantelli M, et al. A single genetic origin for the G101W CDKN2A mutation in 20 melanoma-prone families. **Am J Hum Genet** 2000; 67:311-9.

Clark WH Jr, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'. **Arch Dermatol** 1978; 114:732-8.

Coleman DJ, Silverman RH, Ursea R, Rondeau MJ, Lizzi FL. Ultrasonically induced hyperthermia for adjunctive treatment of intraocular malignant melanoma. **Retina** 1997; 17:109-17.

Della Torre G, Pasini B, Frigerio S, et al. CDKN2A and CDK4 mutation analysis in Italian melanoma-prone families: functional characterization of a novel CDKN2A germline mutation. **Br J Cancer** 2001; 85:836-44.

Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Arch Dermatol** 1988; 124:869-71.

Fung DC, Holland EA, Becker TM, et al. eMelanoBase: an online locus-specific variant database for familial melanoma. **Hum Mutat** 2003; 21:2-7.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. **Eur J Cancer** 2005; 41:2040-59.

Gantz I, Konda Y, Tashiro T, et al. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. **J Biol Chem** 1993; 268:8246-50.

Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. **Clin Dermatol** 2009; 27:3-9.

Gershenwald JE, Soong SJ, Balch CM. TNM Staging System for Cutaneous Melanoma... and Beyond. On behalf of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Melanoma Staging Committee. **Ann Surg Oncol** 2010; 27:6199-206.



Ghiorzo P, Gargiulo S, Pastorino L et al. Impact of E27X, a novel CDKN2A germ line mutation, on p16 and p14ARF expression in Italian melanoma families displaying pancreatic cancer and neuroblastoma. **Hum Mol Genetics** 2006; 15:2682-89.

Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP, et al. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. **N Engl J Med** 1995; 333:970-4.

Goldstein AM, Chan M, Harland M, et al. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. **Cancer Res** 2006; 66:9818-28.

Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, et al. First detection of the melanoma-predisposing proline-48-threonine mutation of p16 in Hungarians: was there a common founder either in Italy or in Hungary? **Melanoma Res** 2007a; 17:251-4.

Goldstein AM, Chaudru V, Ghiorzo P, et al. Cutaneous phenotype and MC1R variants as modifying factors for the development of melanoma in CDKN2A G101W mutation carriers from 4 countries. **Int J Cancer** 2007b; 121:825-31.

Goldstein AM, Chan M, Harland M, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. **J Med Genet** 2007c; 44:99-106.

Gonzalez S, Klatt P, Delgado S, et al. Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. **Nature** 2006; 440:702-6.

Greene MH, Clark WH Jr, Tucker MA, et al. Precursor naevi in cutaneous malignant melanoma: a proposed nomenclature. **Lancet** 1980; 2:1024.

Greene MH. The genetics of hereditary melanoma and nevi. **Cancer** 1999; 86:2464-77.

Haferkamp S, Scurr LL, Becker TM, Frausto M, Kefford RF, Rizos H. Oncogene-induced senescence does not require the p16(INK4a) or p14ARF melanoma tumor suppressors. **J Invest Dermatol** 2009; 129:1983-91.

Harland M, Holland EA, Ghiorzo P, et al. Mutation screening of the CDKN2A promoter in melanoma families. **Genes Chromosomes Cancer** 2000; 28:45-57.

Harland M, Mistry S, Bishop T, Newton Bishop JA. A deep intronic mutation in CDKN2A is associated with disease in a subset of melanoma pedigrees. **Hum Mol Genet** 2001; 10:2679-86.

Harland M, Taylor CF, Bass S, et al. Intronic sequence variants of the CDKN2A gene in melanoma pedigrees. **Genes Chromosomes Cancer** 2005; 43:128-36.

Hashemi J, Platz A, Ueno T, Stierner U, Ringborg U, Hansson J. CDKN2A germline mutations in individuals with multiple cutaneous melanomas. **Cancer Res** 2000; 60:6864-7.

Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. **Oncogene** 2003; 22:3053-62.

Holland EA, Schmid H, Kefford RF, Mann GJ. CDKN2A (P16 (INK4a)) and CDK4 mutation analysis in 131 Australian melanoma probands: effect of family history and multiple primary melanomas. **Genes Chromosomes Cancer** 1999; 25:339-48.

Hubner J, Ramos ES. The P48T germline mutation and polymorphism in the CDKN2A gene of patients with melanoma. **Braz J Med Biol Res** 2006; 39:237-41.

Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. **Nat Genet** 1994; 8:15-21.

Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. **Science** 1994; 264:436-40.

Kannengiesser C, Brookes S, del Arroyo AG, et al. Functional, structural, and genetic evaluation of 20 CDKN2A germ line mutations identified in melanoma-prone families or patients. **Hum Mutat** 2009; 30:564-74.

Katalinic A, Kunze U, Schäfer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). **Br J Dermatol** 2003; 149:1200-6.

Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. **J Invest Dermatol** 2001; 117:294-300.

Kim WY, Sharpless NE. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. **Cell** 2006; 127:265-75.

Kraemer KH, Greene MH, Tarone R, et al. Dysplastic naevi and cutaneous melanoma risk. **Lancet** 1983; 2:1076-7.

Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. **Br J Dermatol** 2004; 150:179-85.

Larre Borges A, Cuéllar F, Puig-Butillé JA, et al. CDKN2A mutations in melanoma families from Uruguay. **Br J Dermatol** 2009; 161:536-41.

Lilischkis R, Sarcevic B, Kennedy C, Warlters A, Sutherland RL. Cancer-associated missense and deletion mutations impair p16INK4 CDK inhibitory activity. **Int J Cancer** 1996; 66:249-54.

Lindström MS, Zhang Y. B23 and ARF: friends or foes? **Cell Biochem Biophys** 2006; 46:79-90.

Lin J, Hocker TL, Singh M, Tsao H. Genetics of melanoma predisposition. **Br J Dermatol** 2008; 159:286-91.

Liu L, Dilworth D, Gao L, Monzon J, Summers A, Lassam N, Hogg D. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. **Nat Genet** 1999; 21:128-32.

Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. **Curr Opin Genet Dev** 2003; 13:77-83.

Lynch HT, Fritchot BC, Lynch JF. Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. **J Med Genet** 1978; 15:352-6.

Majore S, De Simone P, Crisi A, Eibenschutz L, et al. CDKN2A/CDK4 molecular study on 155 Italian subjects with familial and/or primary multiple melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res** 2008; 21:209-11.

McGovern VJ. Melanoblastoma. **Med J Aust** 1952; 1:139-42.

MacKie RM, Andrew N, Lanyon WG, Connor JM. CDKN2A germline mutations in U.K. patients with familial melanoma and multiple primary melanomas. **J Invest Dermatol** 1998; 111:269-72.

McKeller RN, Fowler JL, Cunningham JJ, Warner N, Smeyne RJ, Zindy F, Skapek SX. The Arf tumor suppressor gene promotes hyaloid vascular regression during mouse eye development. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:3848-53.

Mantelli M, Pastorino L, Ghiorzo P, et al. Early onset may predict G101W CDKN2A founder mutation carrier status in Ligurian melanoma patients. **Melanoma Res** 2004; 14:443-8.

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2010 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Molven A, Grimstvedt MB, Steine SJ et al. A large Norwegian family with inherited malignant melanoma, multiple atypical nevi, and CDK4 mutation. **Gens Chrom Cancer** 2005; 44:10-18.

Monzon J, Liu L, Brill H, et al. CDKN2A mutations in multiple primary melanomas. **N Engl J Med** 1998; 338:879-87.

Naeyaert JM, Brochez L. Dysplastic nevi. **N Engl J Med** 2003; 349:2233-40.

Newton JA, Bataille V, Griffiths K, et al. How common is the atypical mole syndrome phenotype in apparently sporadic melanoma? **J Am Acad Dermatol** 1993; 29:989-96.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. **Nature** 1994; 368:753-6.

Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? **Am J Hum Genet** 2000; 66:176-86.

Pipitone M, Robinson JK, Camara C, Chittineni B, Fisher SG. Skin cancer awareness in suburban employees: a Hispanic perspective. **J Am Acad Dermatol** 2002; 47:118-23.

Pjanova D, Engele L, Randerson-Moor JA, et al. CDKN2A and CDK4 variants in Latvian melanoma patients: analysis of a clinic-based population. **Melanoma Res** 2007; 17:185-91.

Pjanova D, Molven A, Akslen LA, et al. Identification of a CDK4 R24H mutation-positive melanoma family by analysis of early-onset melanoma patients in Latvia. **Melanoma Res** 2009; 19:119-22.

Puig S, Malvehy J, Badenas C, et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. **J Clin Oncol** 2005; 23:3043-51.

Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. **Cell** 1995; 83:993-1000.

Rigel DS, Rivers JK, Friedman RJ, et al. Risk gradient for malignant melanoma in individuals with dysplastic nevi. **Lancet** 1988; 1:352-3.

Rizos H, Scurr LL, Irvine M, Alling NJ, Kefford RF. p14ARF regulates E2F-1 ubiquitination and degradation via a p53-dependent mechanism. **Cell Cycl** 2007; 6:1741-7.

Roberts WE. Skin type classification systems old and new. **Dermatol Clin** 2009; 27:529-33.

Ruas M, Brookes S, McDonald NQ, Peters G. Functional evaluation of tumour-specific variants of p16INK4a/CDKN2A: correlation with protein structure information. **Oncogene** 1999; 18:5423-34.

Ruiz A, Puig S, Malveyh J, et al. CDKN2A mutations in Spanish cutaneous malignant melanoma families and patients with multiple melanomas and other neoplasia. **J Med Genet** 1999; 36:490-3.

Savage SA, Gerstenblith MR, Goldstein AM, et al. Nucleotide diversity and population differentiation of the Melanocortin 1 Receptor gene, MC1R. **BMC Genet** 2008; 9:31.

Slade J, Marghoob AA, Salopek TG, Rigel DS, Kopf AW, Bart RS. Atypical mole syndrome: Risk factor for cutaneous malignant melanoma and implications for management. **J Am Acad Dermatol** 1995; 32:479-94.

Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. **Cancer Biol Ther** 2002; 1:14-7.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature** 1993; 366:704-7.

Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. **Mutat Res** 2005; 576:22-38.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev** 1999; 13:1501-12.

Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. **Curr Opin Genet Dev** 2000; 10:94-9.

Sortino-Rachou AM, Curado MP, Latorre MRDO. Melanoma cutâneo: estudo de base populacional em Goiânia, Brasil, de 1988 a 2000. **An Bras Dermatol** 2006; 81:449-55.

Soufir N, Avril MF, Chompret A, et al. Prevalence of p16 and CDK4 germline mutations in 48 melanoma-prone families in France. The French Familial Melanoma Study Group. **Hum Mol Genet** 1998; 7:209-16.

Stratigos AJ, Yang G, Dimisianos R, et al. Germline CDKN2A mutations among greek patients with early-onset and multiple primary cutaneous melanoma. **J Invest Dermatol** 2006; 126:139-401.

Széll M, Balogh K, Dobozy A, Kemény L, Oláh J. First detection of the melanoma-predisposing proline-48-threonine mutation of p16 in Hungarians: was there a common founder either in Italy or in Hungary? **Melanoma Res** 2007; 17:251-4.

Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. **N Engl J Med** 2004; 351:998-1012.

Tucker MA, Halpern A, Holly EA, et al. Clinically recognized dysplastic nevi: A central risk factor for cutaneous melanoma. **JAMA** 1997; 277:1439-44.

Xu LY, Koo J. Predictive value of phenotypic variables for skin cancer: risk assessment beyond skin typing. **Int J Dermatol** 2006; 45:1275-83.

Wen Y, Liu Y, Xu Y, et al. Loss-of-function mutations of an inhibitory upstream ORF in the human hairless transcript cause Marie Unna hereditary hypotrichosis. **Nat Genet** 2009; 41:228-33.

Wiestner A, Schlemper RJ, van der Maas AP, Skoda RC. An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. **Nat Genet** 1998; 18:49-52.

Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1276-99.



Youl P, Aitken J, Hayward N, et al. Melanoma in adolescents: a case-control study of risk factors in Queensland, Australia. **Int J Cancer** 2002; 98:92-8.

Zuo L, Weger J, Yang Q, et al. Germline mutations in the p15ink4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. **Nat Genet** 1996; 12:97-9.

**ANEXOS**

---

## Anexo 1 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa



**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 27 de Setembro de 2007.

Ao  
Dr. Gilles Landman

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 934/07  
Registro CONEP nº 14098  
“Fatores genéticos e de meio ambiente de risco para o desenvolvimento de melanoma na América Latina”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua reunião de 25/09/2007, após analisarem as respostas das pendências da CONEP (Parecer 622/2007), verificaram que foram esclarecidas pelo pesquisador e decidiram pela aprovação do projeto, conforme parecer consubstanciado em anexo.

Para iniciar o projeto, é necessário aguardar a aprovação da CONEP para este primeiro centro.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhados à assistente do CEP dentro de 6 meses.**

Atenciosamente,



**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

## Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### ANÁLISE DE RESPOSTA A PARECER DA CONEP

REGISTRO CONEP: 14098  
PROJETO: CEP 934/07

**TÍTULO: “Fatores Genéticos e de meio ambiente de risco para o desenvolvimento de melanoma na América Latina”.**

**RESPONSÁVEL NA INSTITUIÇÃO: Dr. Gilles Landman**

**Ref: Parecer da CONEP de nº. 622/2007 – Resposta do Pesquisador Responsável.**

Recebemos resposta ao parecer da CONEP de nº. 622/2007, de 21 de agosto de 2007, enviada pelo pesquisador responsável no Hospital A.C. Camargo.

Seguindo a ordem dos questionamentos emitidos pela CONEP, considera-se o que segue, por ordem de pendência:

**1. Esclarecer se haverá formação de banco de material genético. Em caso afirmativo, esclarecer a quem caberá sua propriedade e guarda do mesmo, se haverá outra utilização além deste projeto (há referência a trabalhos de pós-graduação) e incluir autorização para tanto no TCLE. Ressalta-se que, caso haja armazenamento. Deverá ser seguida a Resolução CNS 347/05, que regulamenta o armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa:**

Segundo resposta do pesquisador, haverá formação de banco de material genético, cabendo a guarda do material ao centro de pesquisa responsável pela coleta, no caso o Hospital A.C. Camargo e também o Laboratório Central do GenoMEL. Este terá como responsável em Barcelona a Dra. Suzana Puig-Sarda, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, que por sua vez encaminhará a amostra para o Laboratório Central em Leiden, sob responsabilidade da Dra. Nelleke Gruis, Leiden University Medical Center, conforme especificado no projeto enviado em dossiê inicial, página 9. Consta do Termo de Consentimento Livre e Informado autorização de armazenamento, conforme solicitado. Foi acrescentada informação de que será solicitado novo consentimento se desta pesquisa advierem novos desdobramentos. Conforme a resolução CNS 347/05, já estava descrita no projeto, a metodologia de codificação das amostras para preservação do sigilo, páginas 7 e 8, enviado no dossiê inicial. A guarda e permissão de uso terá como responsável no Brasil, o Dr. Gilles Landman, coordenador do projeto.

Consideramos este quesito devidamente respondido.

**2. Esclarecer a quem cabe a propriedade dos dados/informações obtidas:**

Foi encaminhada declaração de propriedade intelectual acordada pelo Consórcio GenoMEL, conforme solicitado. Especifica o acordo que a propriedade intelectual, bem como patentes advindas de resultados de pesquisa serão de propriedade única e exclusiva dos grupos de pesquisa individuais, podendo haver acordos entre os grupos, e que a distribuição dos dividendos será equalitária entre os participantes especificados nestes grupos.

**3. No Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, embora se estabeleça que a participação é voluntária, é recomendável que se inclua que a mesma é gratuita, não havendo qualquer tipo de remuneração pela participação:**  
Foi acrescentada no Termo de Consentimento Livre e Informado (versão 3), item referente à não remuneração e participação voluntária, conforme solicitado.

**4. Esclarecer como se dará efetivamente a participação da Espanha no projeto, enviando documentos relativos ao consórcio como um todo:**


A participação da Espanha será de coordenação, análise de dados, gerenciamento financeiro e coleta de pacientes em seu país. Foi anexado o projeto genérico do GenoMEL para o mundo que abrange os itens de subgrupos de estudo, conforme se pode ler na proposta apresentada à Comunidade Européia para aprovação como grupo.

**Conclusão:** Os quesitos foram respondidos adequadamente e os seguintes documentos foram anexados em resposta ao parecer da CONEP 622/2007:

- Projeto versão corrigida (constava no dossiê inicial);
- Projeto Genérico GenoMEL;
- Declaração de propriedade intelectual acordada pelo Consórcio GenoMEL;
- Termo de Consentimento Livre e Informado (versão 3).

**PARECER FINAL:**

**Projeto Aprovado**



FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE  
Hospital do Câncer A. C. Camargo  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Prof. Dr. Luiz Paulo Kowaleki  
Coordenador



“Fatores Genéticos e de Meio Ambiente de Risco para o  
Desenvolvimento de Melanoma na América Latina”

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nome do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

País: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

**Informação importante:**

Você está sendo convidado a participar do estudo intitulado: “Fatores Genéticos e de Meio Ambiente de Risco para o Desenvolvimento de Melanoma na América Latina”. A sua participação é voluntária e a recusa em participar do estudo em nada prejudicará o tratamento oferecido nesta instituição. Também é importante saber que, mesmo após haver aceito participar deste estudo, você poderá deixar de participar a qualquer momento que desejar, sem qualquer prejuízo.

**Justificativa:**

Atualmente a Comunidade Científica Internacional expressou especial preocupação pelo rápido crescimento da incidência do melanoma em todo o mundo. Este câncer de pele afeta principalmente as pessoas de pele branca, porém pode se desenvolver em qualquer indivíduo.

O Consórcio de Genética do Melanoma (GenoMEL) organiza este projeto internacional sem precedentes e convidou o Hospital A. C. Camargo a participar como uma das instituições de pesquisa, cuja finalidade é a identificação e estudo da interação entre os fatores de meio ambiente e os genes de risco para desenvolvimento do melanoma.

O entendimento da relação gene-meio ambiente tem prioridade de caráter urgente dentro da investigação atual do melanoma em todos os centros importantes do mundo, já que mediante este conhecimento seremos capazes de desenvolver significativos avanços na prevenção, detecção precoce e tratamento deste perigoso câncer.

**Como será feita a pesquisa:**

Este estudo visa investigar se sua família possui tendência ao desenvolvimento do melanoma, através de questionários sobre o aparecimento deste câncer e de outros tipos, bem como uma avaliação clínica sua e de seus familiares desde que concordem formalmente em participar nesta investigação.

O estudo se divide em duas fases: uma clínica e outra de laboratório. A fase de laboratório se limita a uma única coleta de sangue para o estudo de genes conhecidos e relacionados ao desenvolvimento do melanoma, e para avaliação dos

tecidos utilizados para o diagnóstico de melanoma, se for o caso de retirada da lesão. A fase clínica consta de preencher cuidadosamente os questionários a respeito de seus hábitos de exposição solar no(s) local (is) onde viveu e/ou foi em férias e posteriormente, uma consulta no Hospital A. C. Camargo para avaliar as características de sua pele, olhos, cabelo, assim como a quantidade e tipo de pintas (nevus) que possui. Nesta consulta, além da avaliação clínica, será realizada uma foto de suas costas para contagem de número de pintas e uma foto de seus olhos para documentar a sua cor.

Dentre os estudos genéticos, alguns genes mutados poderão indicar que sua família tem uma tendência ao desenvolvimento do melanoma. Embora ainda não se conheça com exatidão a influência destas mutações no desenvolvimento do melanoma e qual a sua relação com a hereditariedade desta característica, se assim o desejar, você poderá ser informado do resultado deste exame.

*A amostra de sangue coletada (20 ml), será processada de forma que se extraia o DNA dos linfócitos (células brancas do sangue). Parte deste extrato de DNA será enviada para um laboratório central do GenoMEL, em Barcelona na Espanha, o qual encaminhará por sua vez seu material para Leiden na Holanda, onde fica a central de análise, para que seja realizada a confirmação dos resultados dos testes realizados no Hospital A.C. Camargo.*

*O sangue e o material extraído dele será guardado por 5 anos nos laboratórios do Hospital A. C. Camargo e também de Leiden na Holanda, sendo depois destruídos. O material obtido de seu sangue será usado exclusivamente para este estudo.*

#### **Riscos:**

*De modo geral não há riscos à sua saúde neste projeto. No entanto, a coleta de sangue poderá causar discreto desconforto como pequena dor local, decorrente da picada com a agulha, que muito raramente pode resultar em pequeno hematoma ou sintomas discretos de inflamação local.*

#### **Tempo para responder ao questionário:**

*O questionário a ser realizado se constituirá de um grande número de questões e poderá exigir sua permanência no Hospital por um período aproximado entre 1 a 2 horas. O questionário será aplicado por uma enfermeira treinada para esta função. Ela deverá manter o sigilo das informações, conforme afirmamos abaixo.*

#### **Confidencialidade:**

Todas as informações provenientes deste estudo serão confidenciais e identificadas por código apenas conhecido dos pesquisadores envolvidos no estudo. Preserva-se assim o sigilo médico de informações sobre sua saúde e de sua família.

Se estiver de acordo em participar deste estudo, por favor responda as questões assinalando um "X" se estiver de acordo com cada um dos itens mencionados abaixo:

- 1- Estou de acordo que me retire uma amostra de sangue e que dita amostra possa ser transportada a outros países e armazenada durante 5 anos. Entendo que a amostra de meu sangue será utilizada exclusivamente para propósitos de investigação dos genes relacionados com o desenvolvimento do melanoma e nevos (pintas), e que não será utilizada para nenhum fim comercial.
- 2- Entendo que tenho liberdade de querer conhecer ou não o resultado da análise genética que me for realizada.
- 3- Entendo que parte da informação de meu arquivo médico deverá ser revista por membros da equipe de investigação e fotocopiada se necessário. Dou permissão a estas pessoas a ter acesso a meus arquivos médicos.
- 4- Estou de acordo que minha pele seja examinada por algum profissional da Saúde, membro desta equipe de investigação.
- 5- Estou de acordo que tirem fotografias de meus olhos para verificar sua cor, de minhas costas para averiguar a quantidade de pintas (nevos) e de alguns nevos que por suas características necessitem de documentação fotográfica.
- 6- Estou de acordo que se pergunte a meus familiares se também desejam participar do estudo (*Cada familiar deverá assinar individualmente um termo de consentimento livre e informado igual a este*).
- 7- Entendo que estou em meu direito de solicitar qualquer esclarecimento e obter informação sobre a investigação a qualquer momento do desenvolvimento da mesma.
- 8- Entendo que minha participação é voluntária e que tenho liberdade de desistir no momento que desejar, sem ter que dar nenhuma razão e que se tomo esta decisão, não afetará futuras consultas ou tratamentos necessários no Hospital A. C. Camargo.
- 9- Entendo que a informação obtida da investigação será manipulada de forma confidencial e que em nenhum momento se violará minha privacidade. Dou permissão para que esta informação possa ser utilizada em outros centros membros do GENOMEL.
- 10- Confirmo que aceito participar desta investigação, que li e entendi as explicações fornecidas, assim como os quesitos de consentimento informado e que tive oportunidade de fazer todas as perguntas que considerei pertinentes acerca deste estudo.

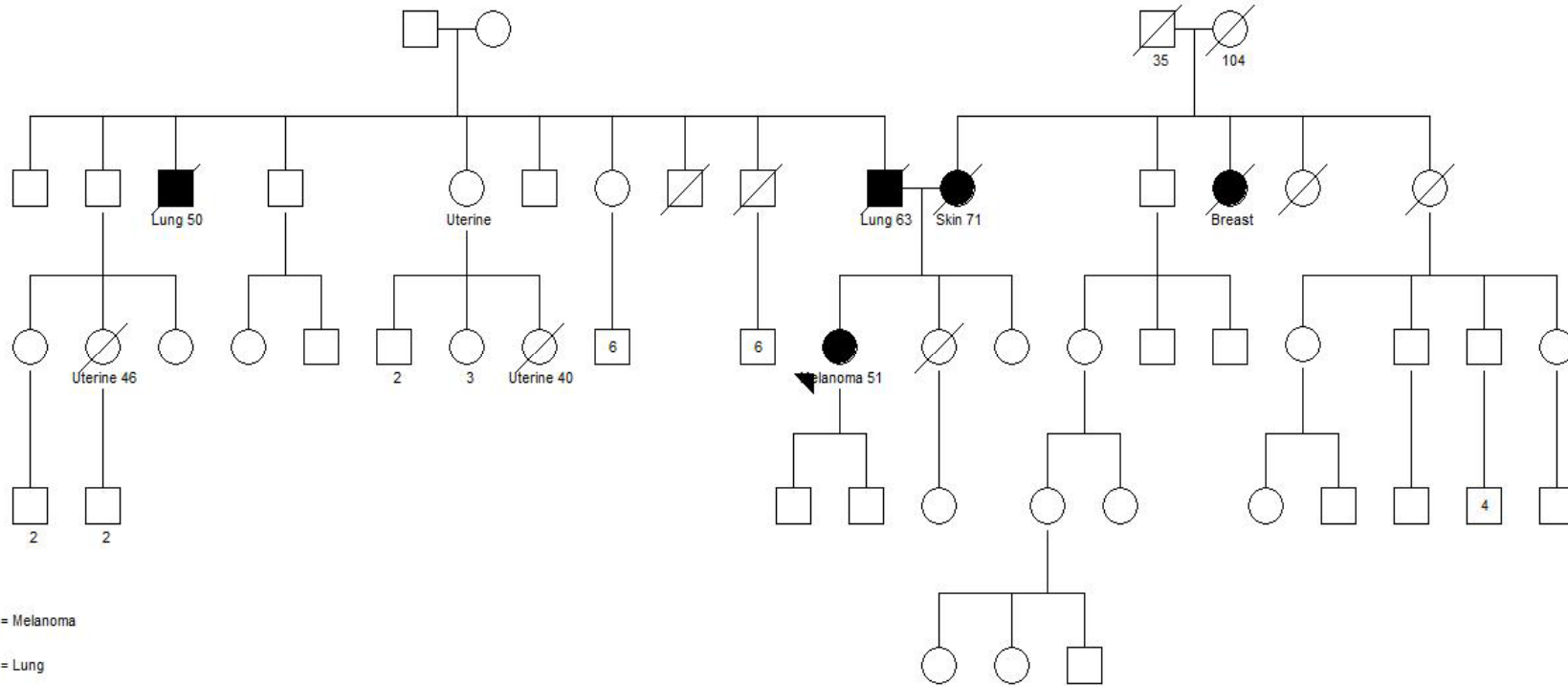








# Anexo 3 - Heredogramas

**Probando 01**




24/05/2010

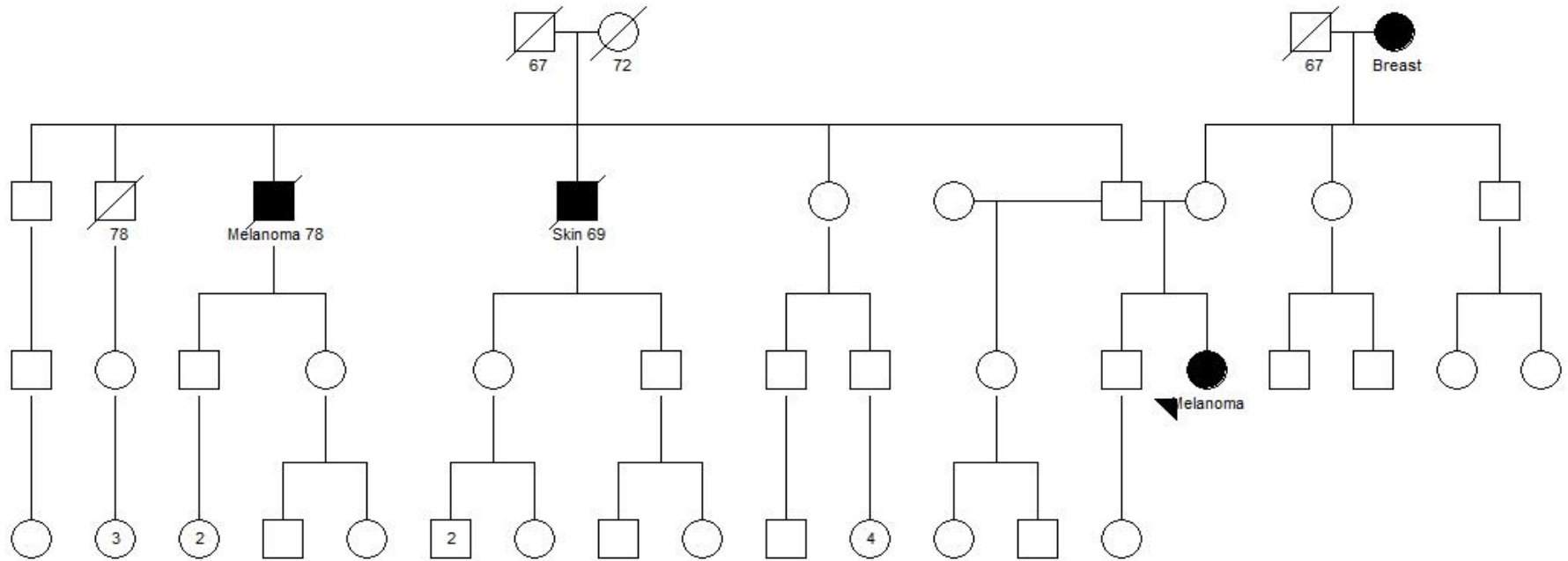


-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Lung
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Skin
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Breast

**Probando 02**

24/05/2010

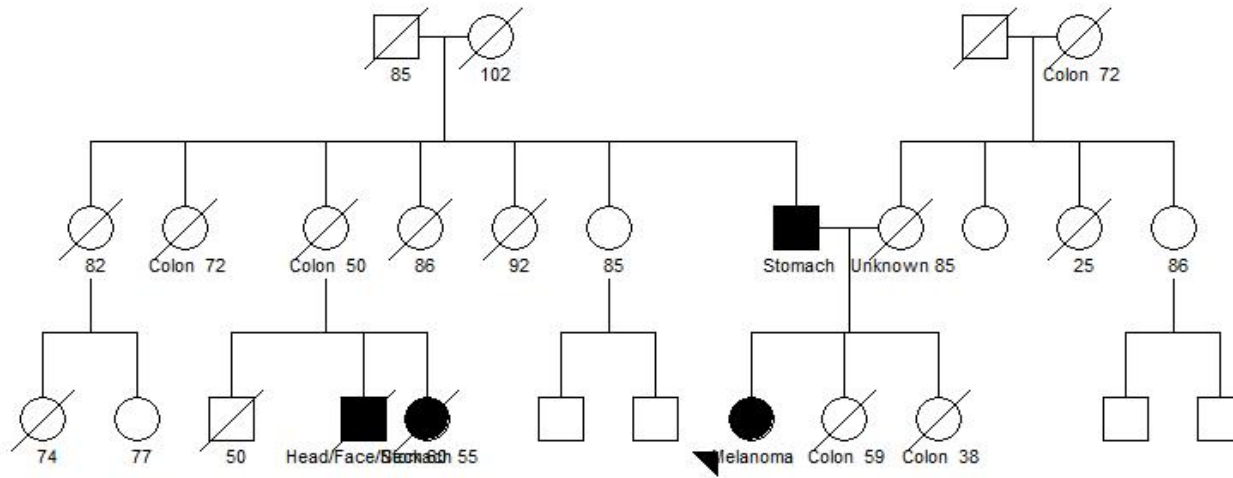
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Breast
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Skin



**Probando 03**

24/05/2010

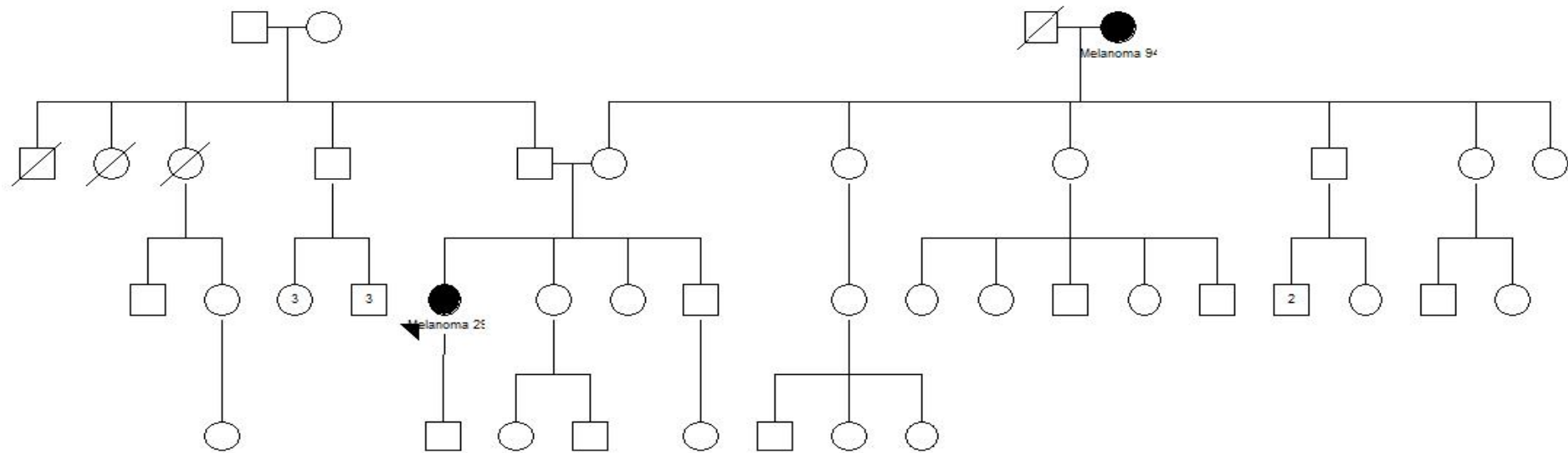
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Stomach
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Head/Face/Neck



**Probando 04**

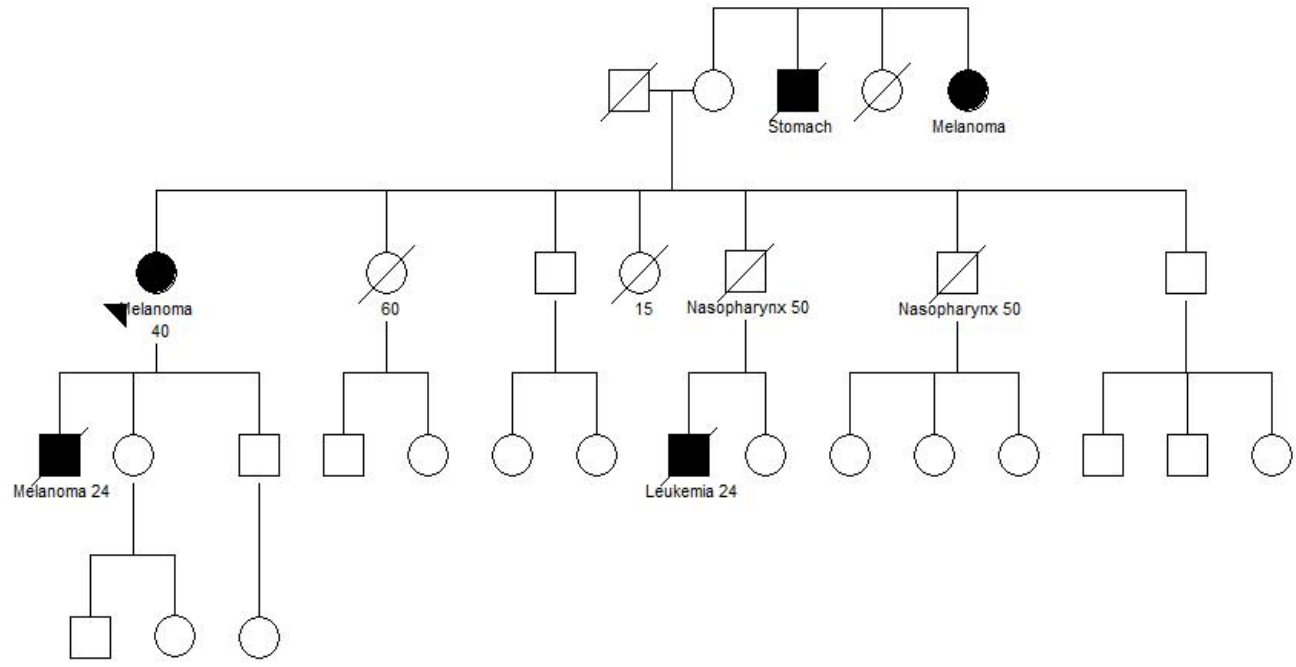
24/05/2010

■ Cancer History, Cancer Diagnosis = Melanoma



**Probando 5**

24/05/2010

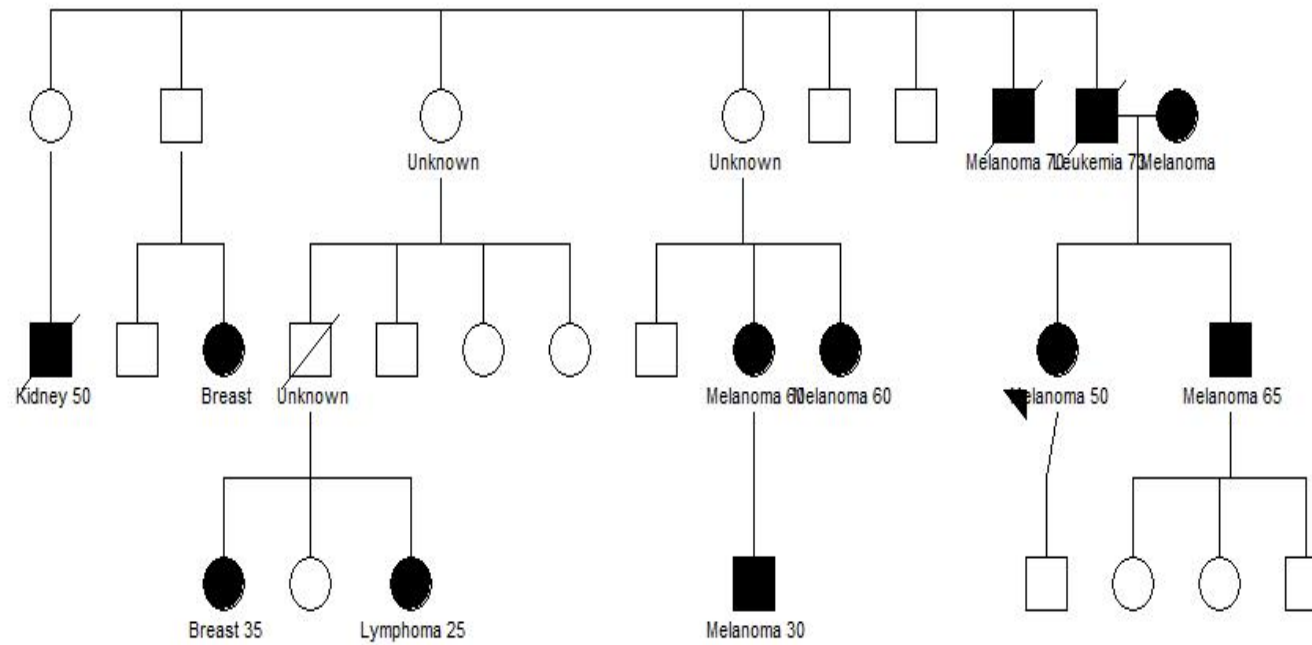


- Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma
- Cancer History.Cancer Diagnosis = Leukemia
- Cancer History.Cancer Diagnosis = Stomach



*Probando 08*

24/05/2010



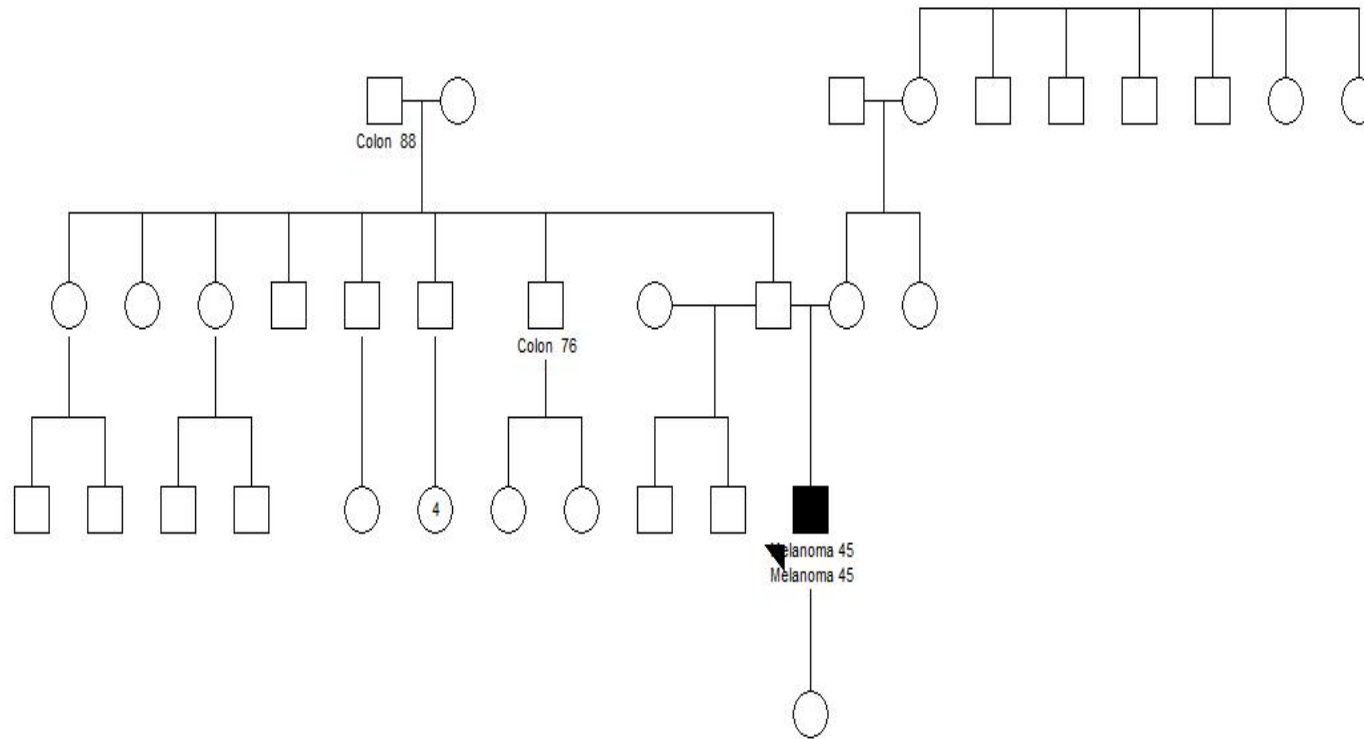
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Leukemia
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Breast



*Probando 10*

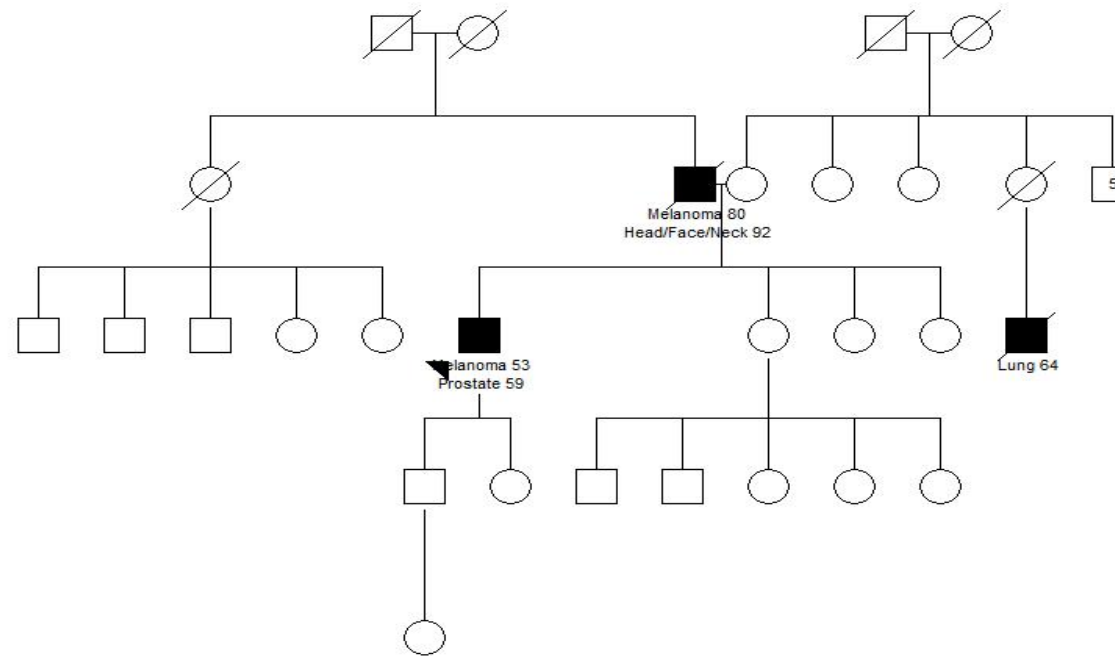
24/05/2010

■ Cancer History, Cancer Diagnosis = Melanoma



**Probando 11**

24/05/2010

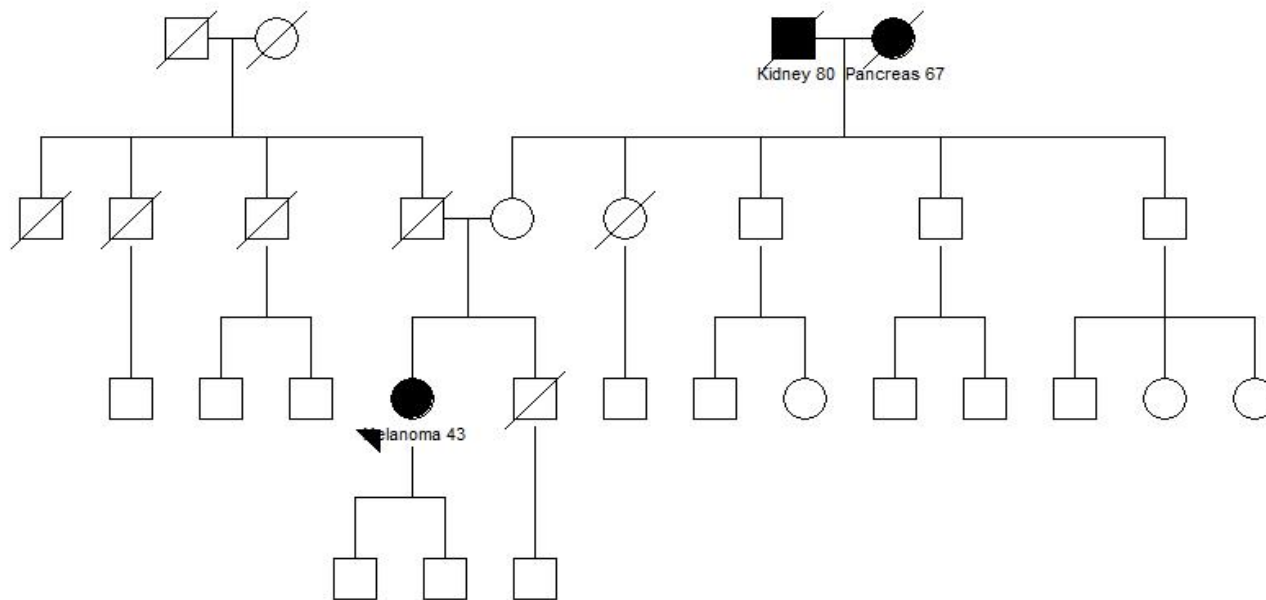


- Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma
- Cancer History.Cancer Diagnosis = Prostate
- Cancer History.Cancer Diagnosis = Head/Face/Neck
- Cancer History.Cancer Diagnosis = Lung

**Probando 12**

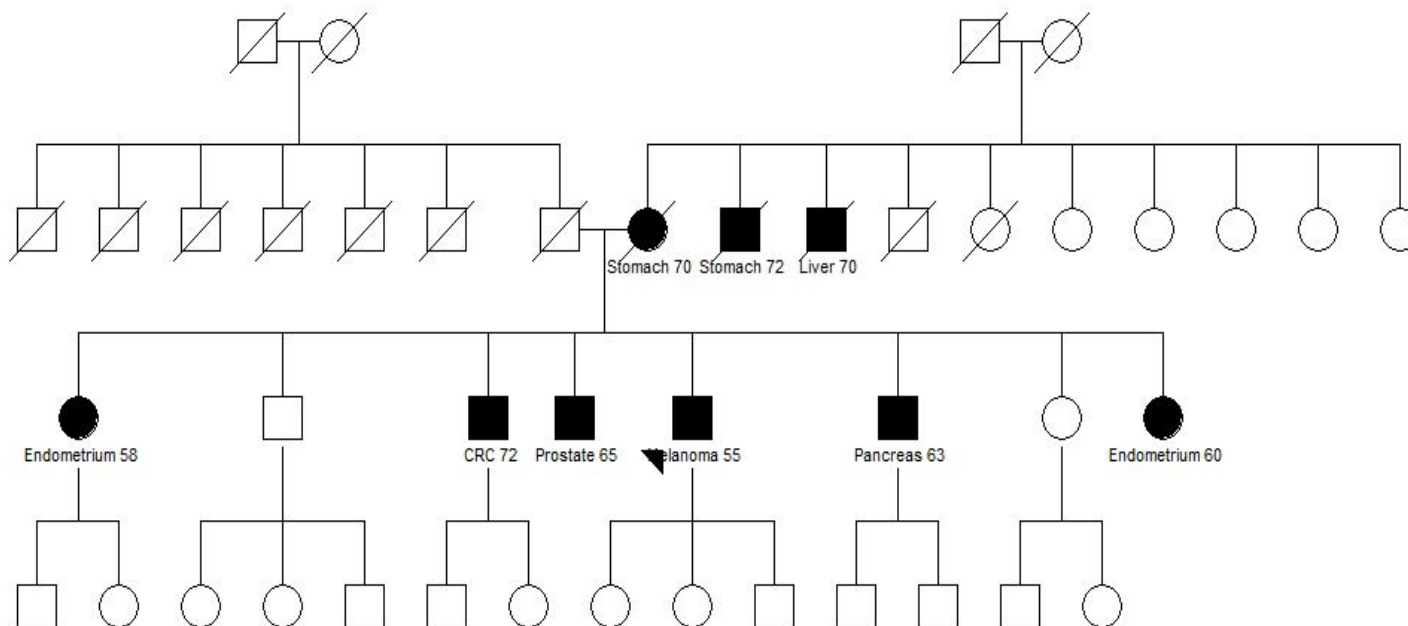
24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Kidney   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Pancreas



**Probando 13**

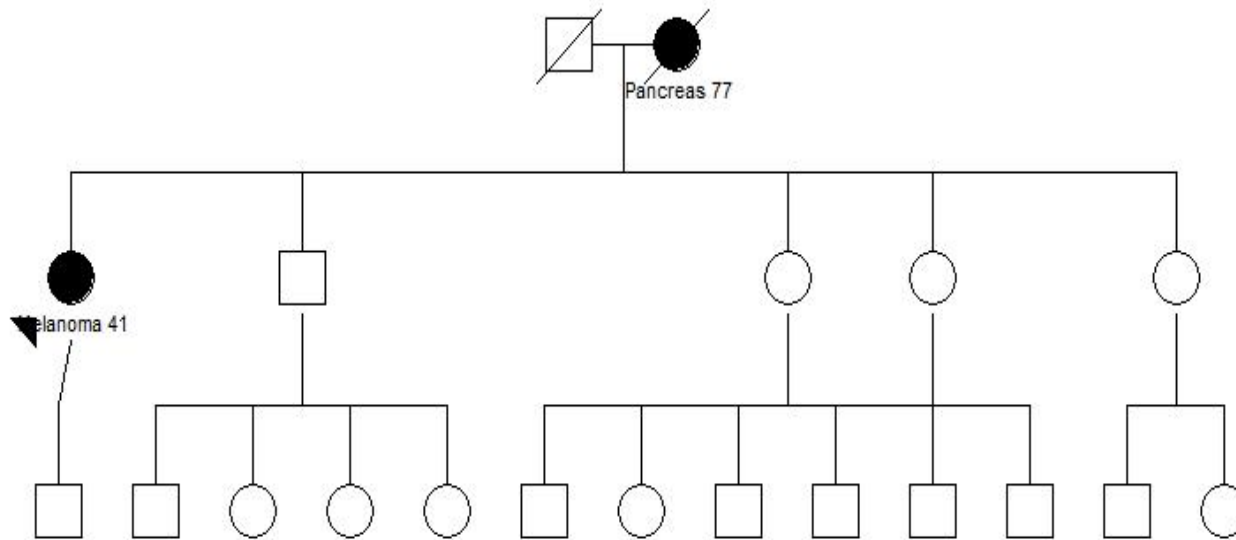
24/05/2010



**Probando 14**

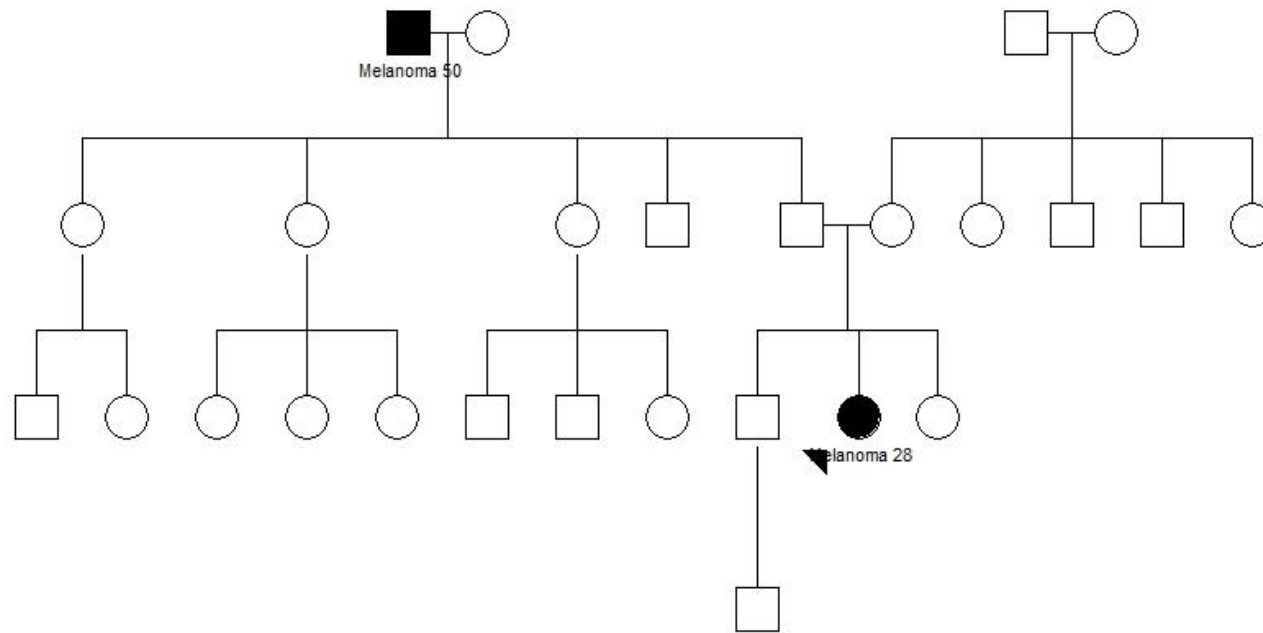
24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma    ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Pancreas



**Probando 15**


24/05/2010

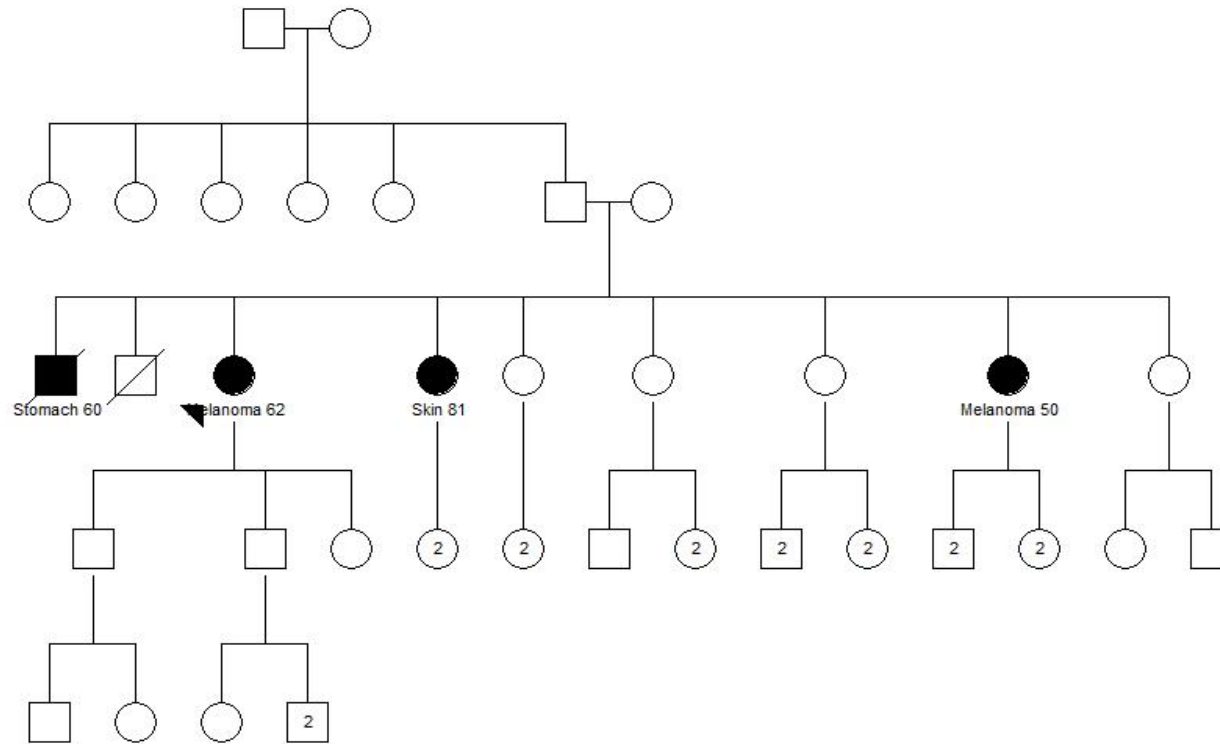


■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma

**Probando 16**

24/05/2010

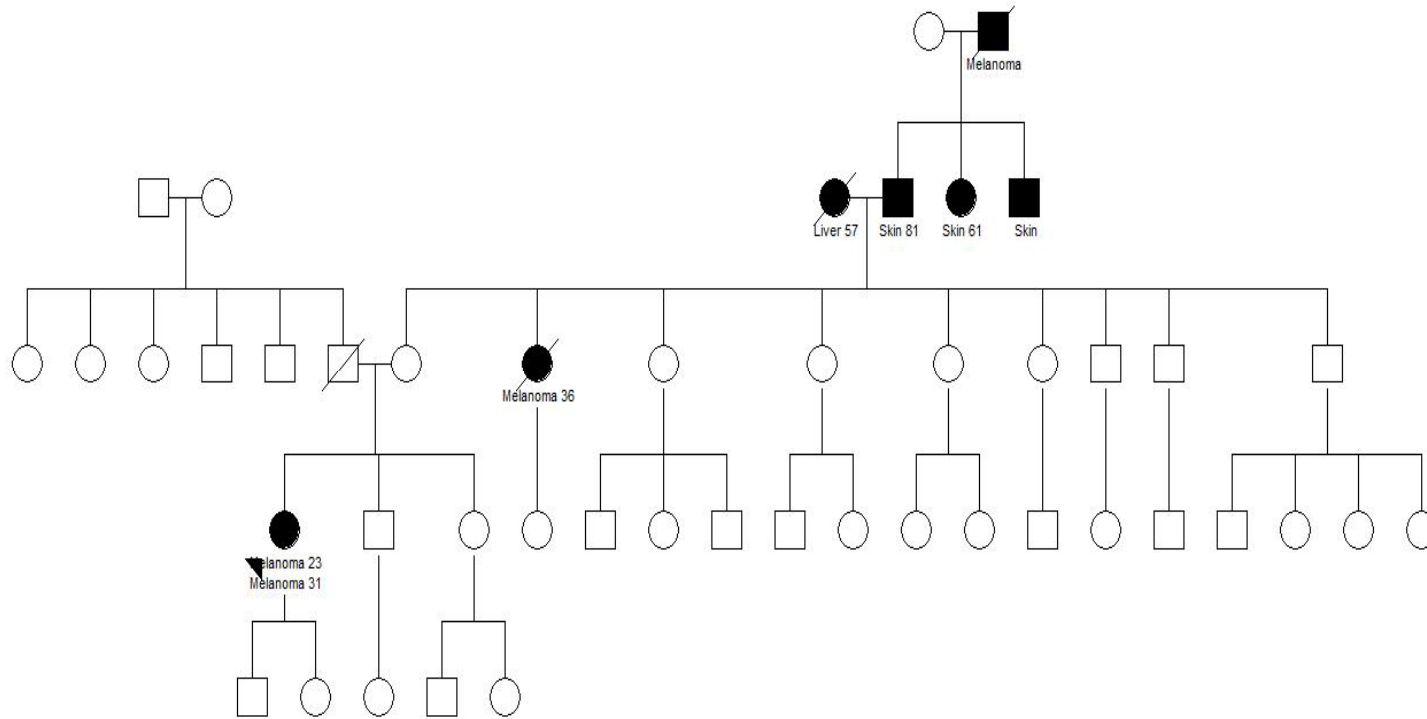
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Skin
-  Cancer History.Cancer Diagnosis = Stomach



*Probando 17*

24/05/2010

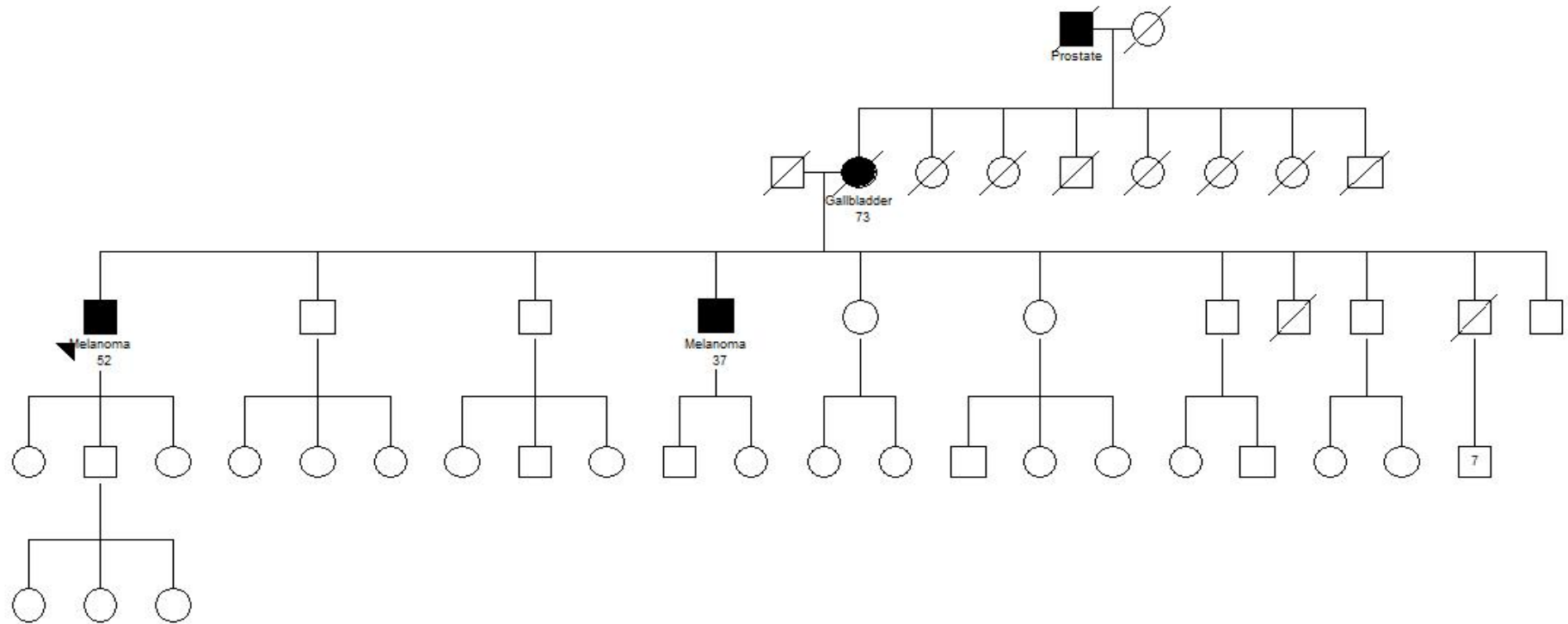
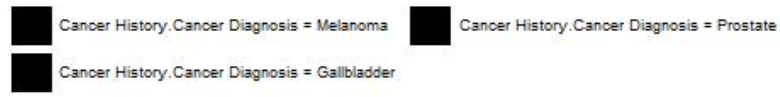
■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Skin   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Liver





**Probando 18**

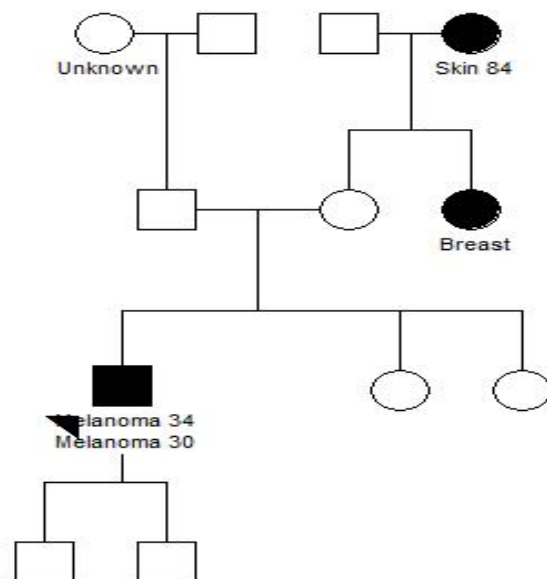
24/05/2010



**Probando 19**

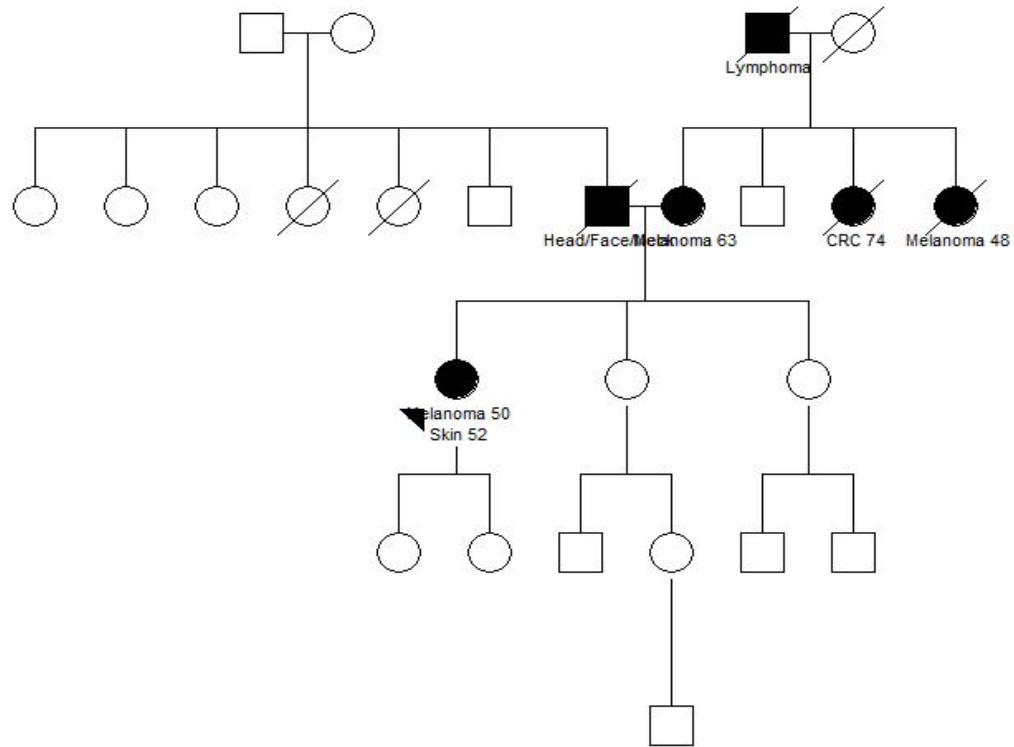
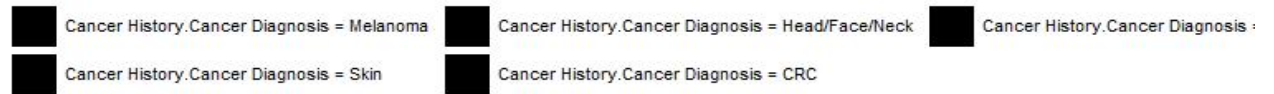
24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma    ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Skin  
■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Breast



**Probando 20**

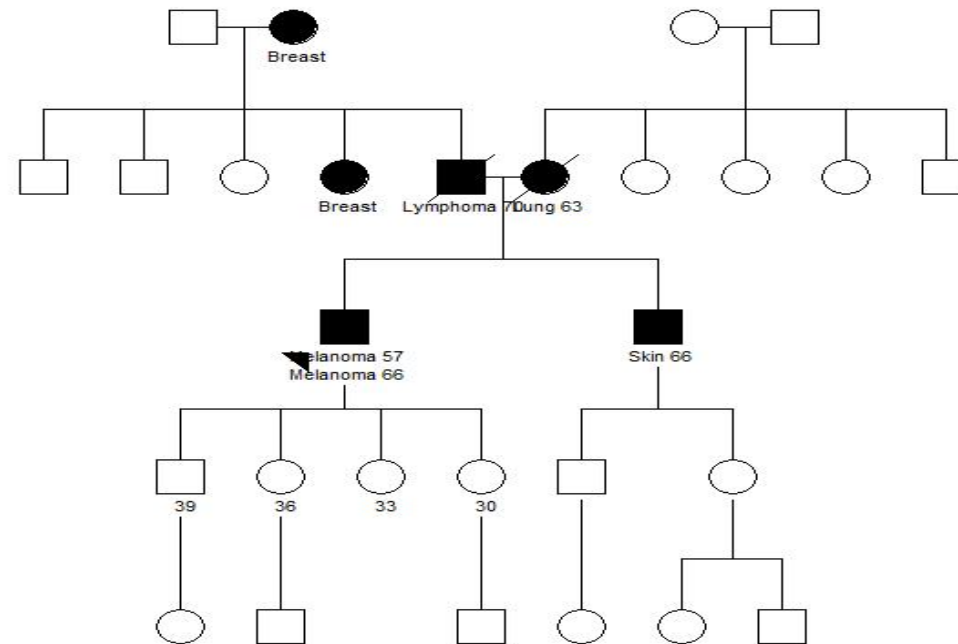
24/05/2010



**Probando 21**

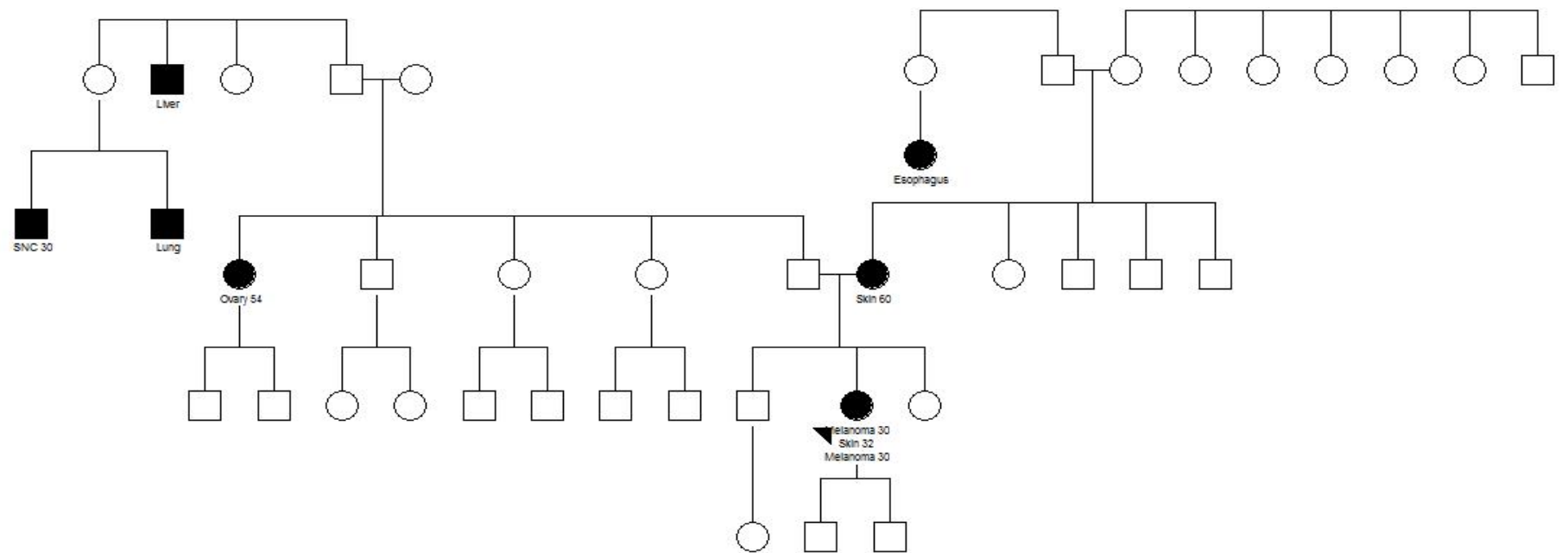
24/05/2010

- Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma
- Cancer History.Cancer Diagnosis = Lymphoma
- Cancer History.Cancer Dia
- Cancer History.Cancer Diagnosis = Skin
- Cancer History.Cancer Diagnosis = Lung



**Probando 22**

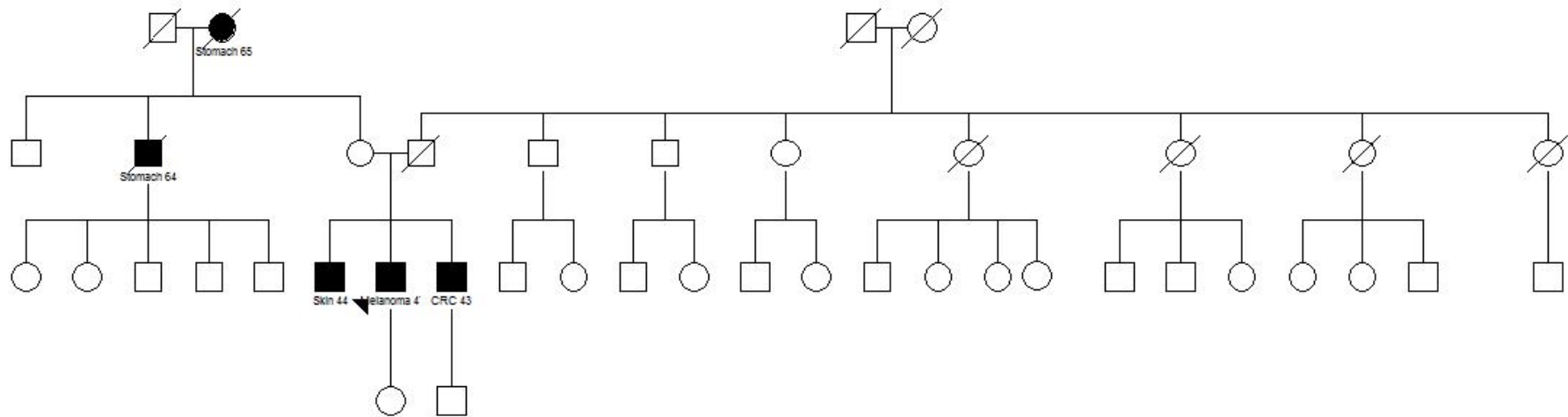
24/05/2010



**Probando 23**

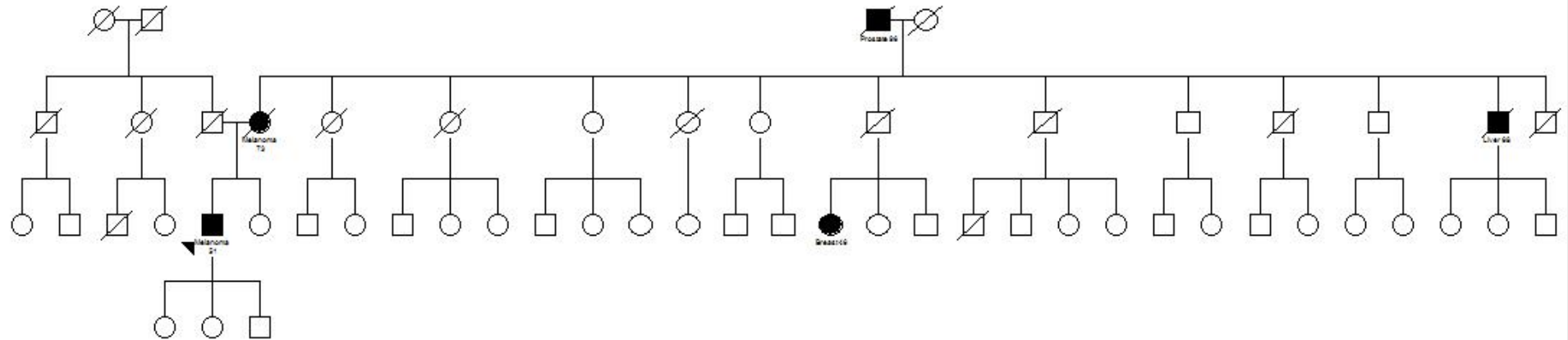
24/05/2010

-  Cancer History, Cancer Diagnosis = Melanoma
-  Cancer History, Cancer Diagnosis = CRC
-  Cancer History, Cancer Diagnosis = Skin
-  Cancer History, Cancer Diagnosis = Stomach



**Probando 26**

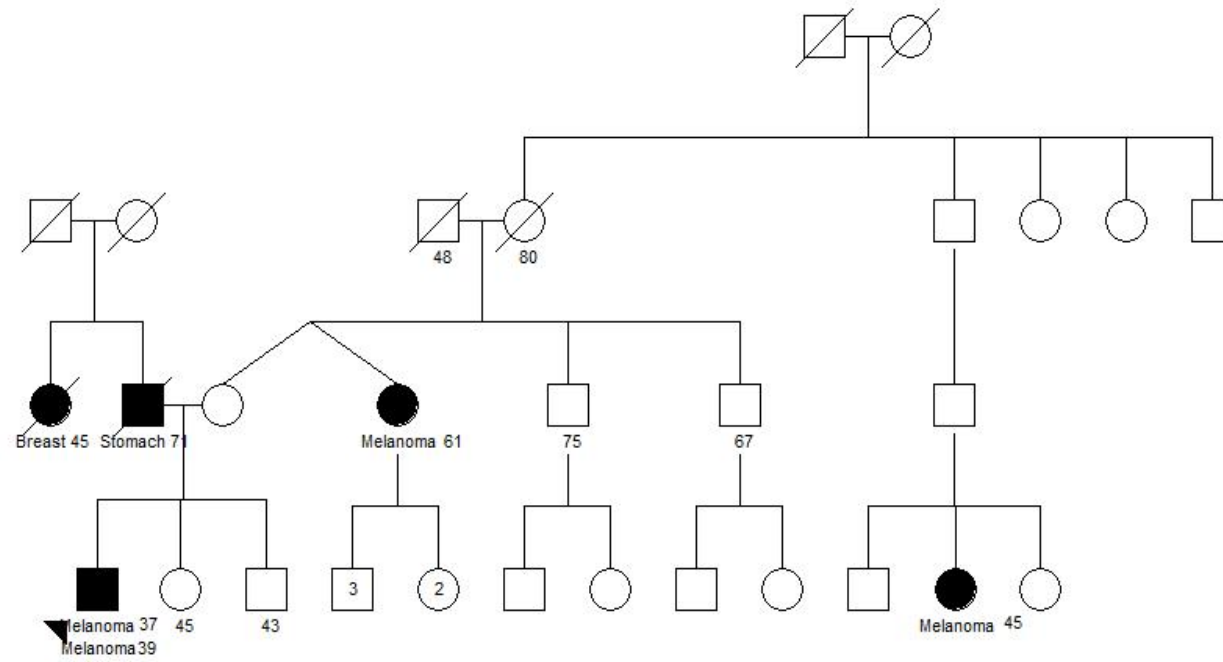
24/05/2010



**Probando 28**

24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Stomach   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Breast

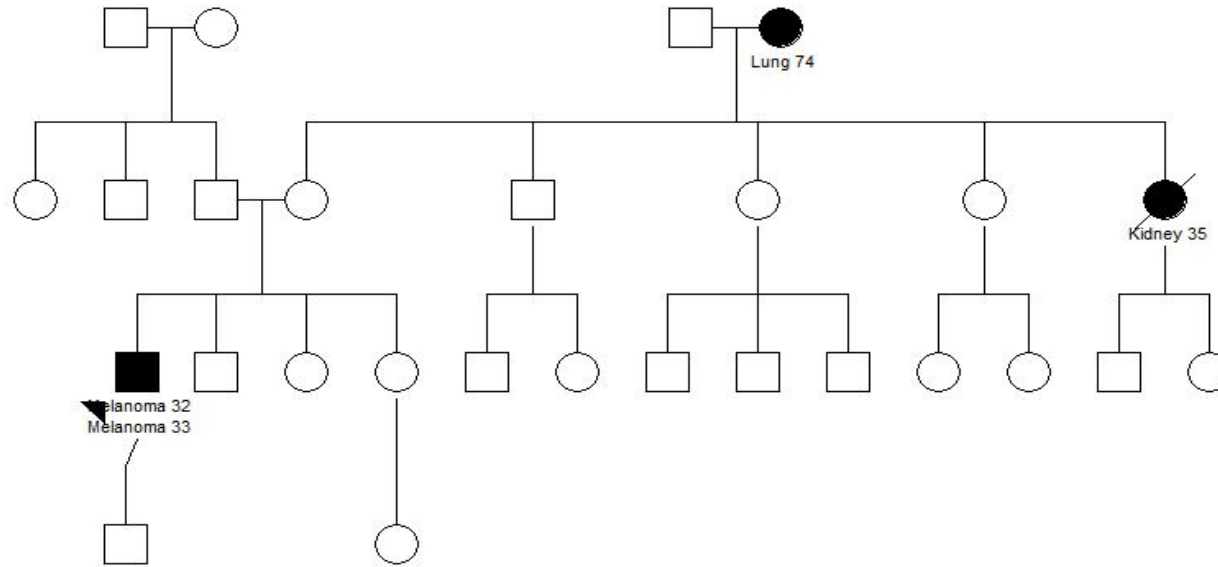




**Probando 29**

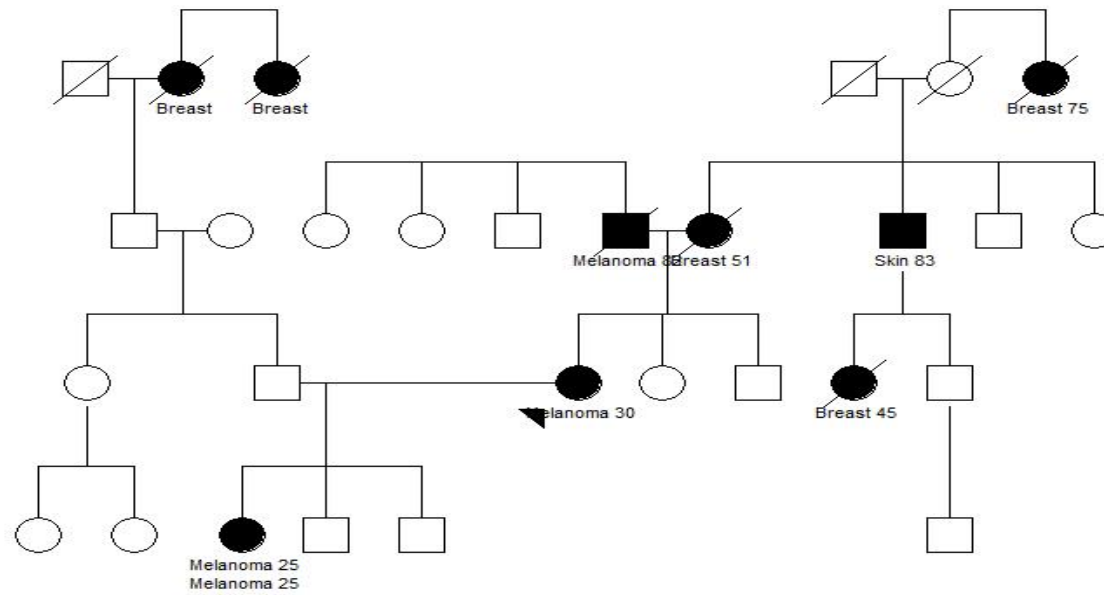
24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Kidney   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Lung



**Probando 31**

24/05/2010

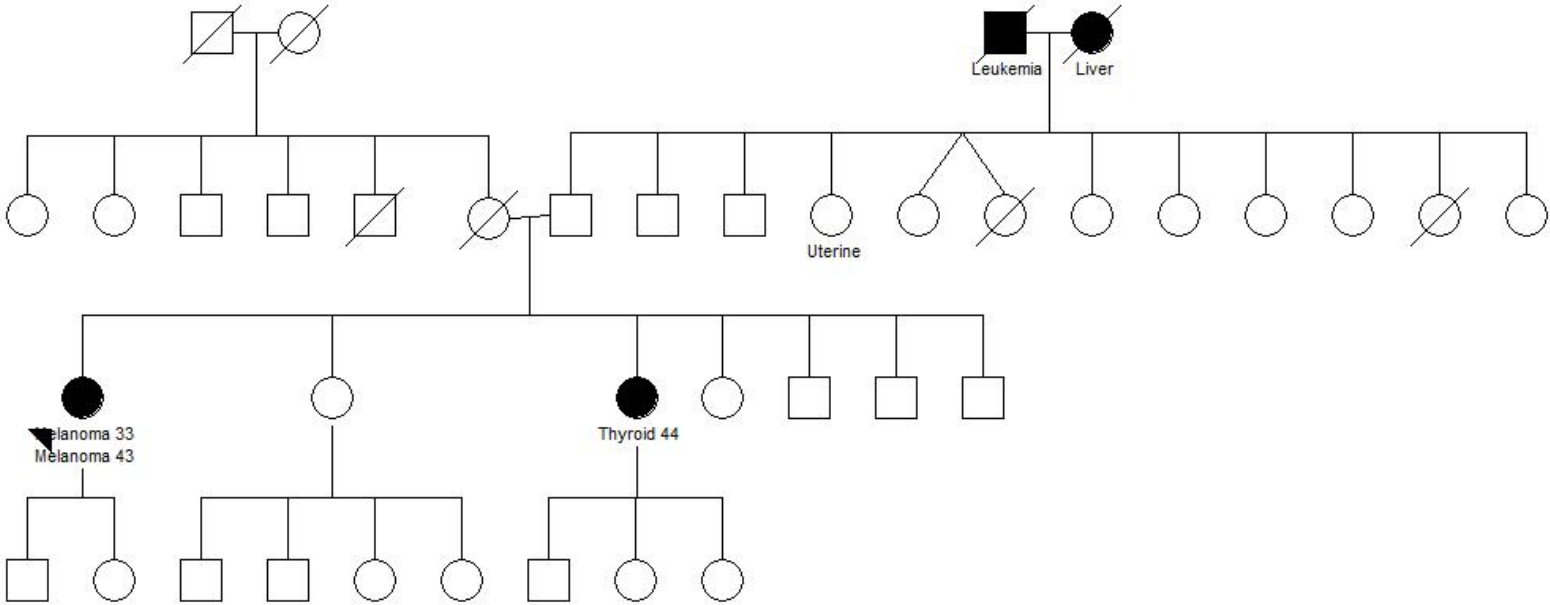




**Probando 33**

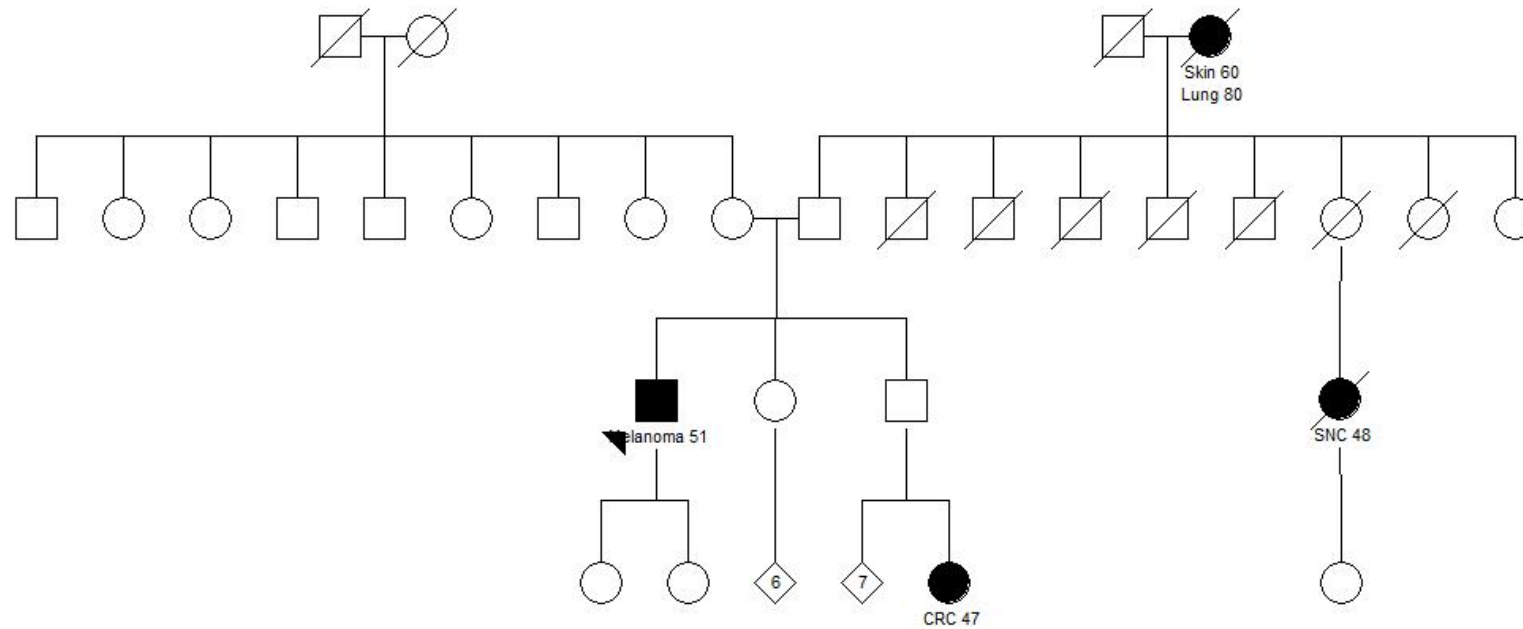
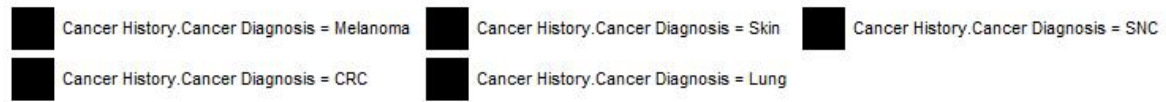
24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma    ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Leukemia  
■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Thyroid    ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Liver



**Probando 34**

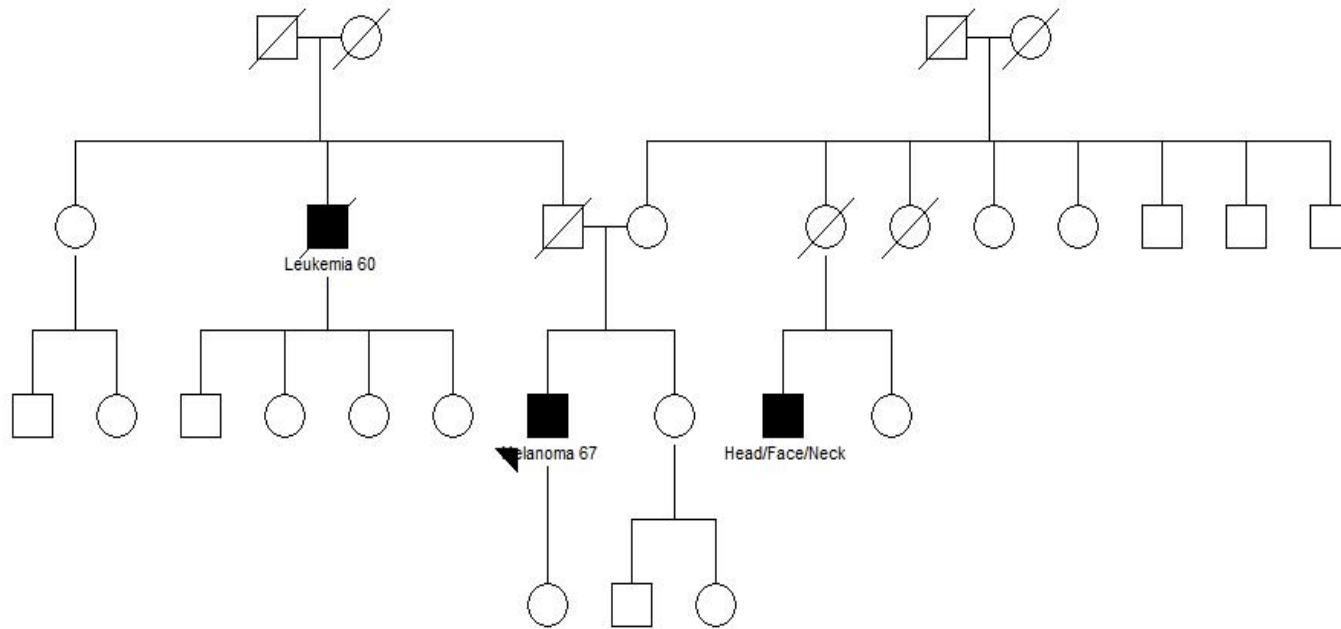
24/05/2010



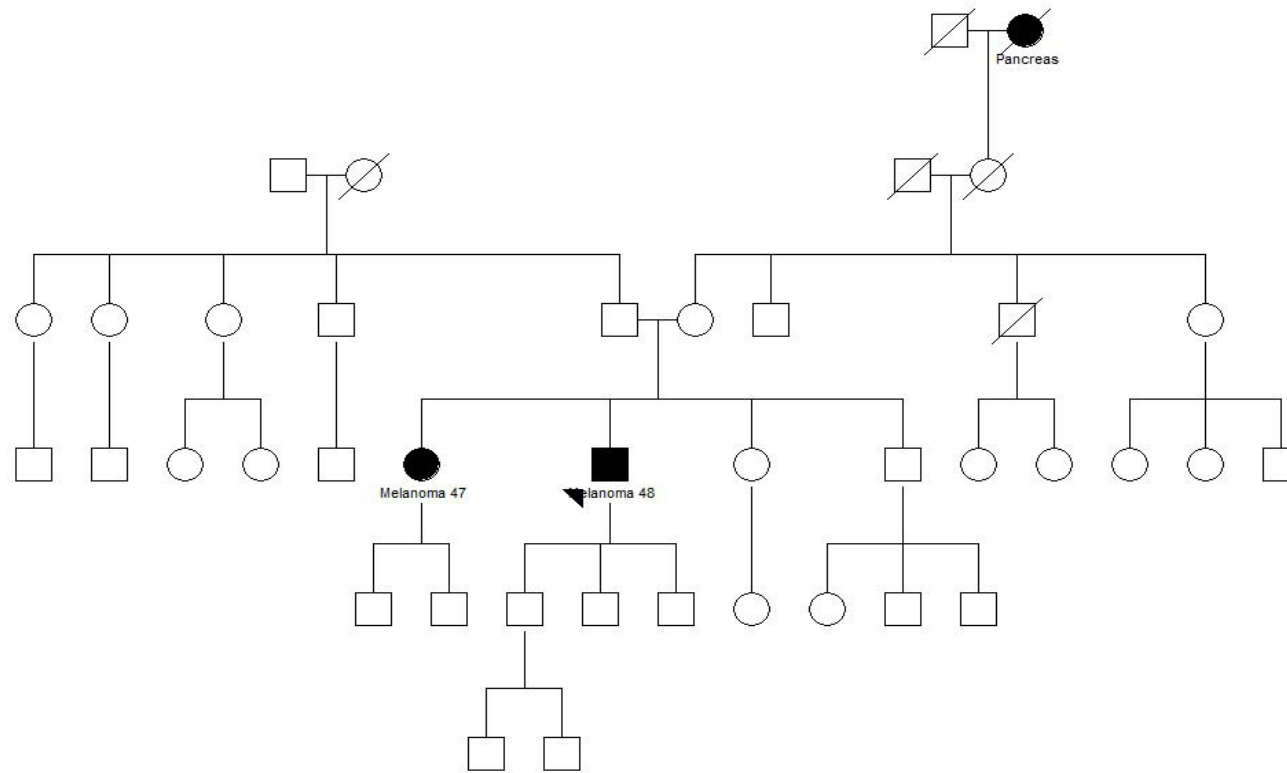
**Probando 35**

24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma    ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Head/Face/Neck  
■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Leukemia

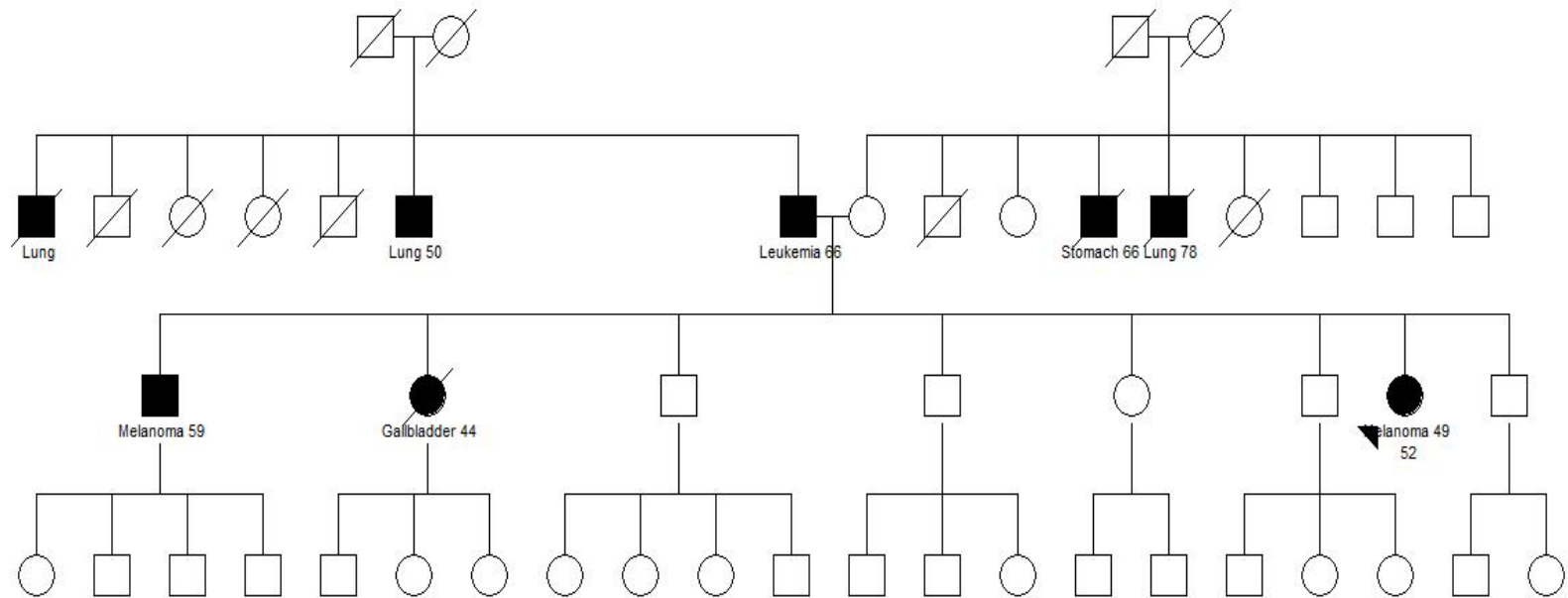


■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma    ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Pancreas



**Probando 38**

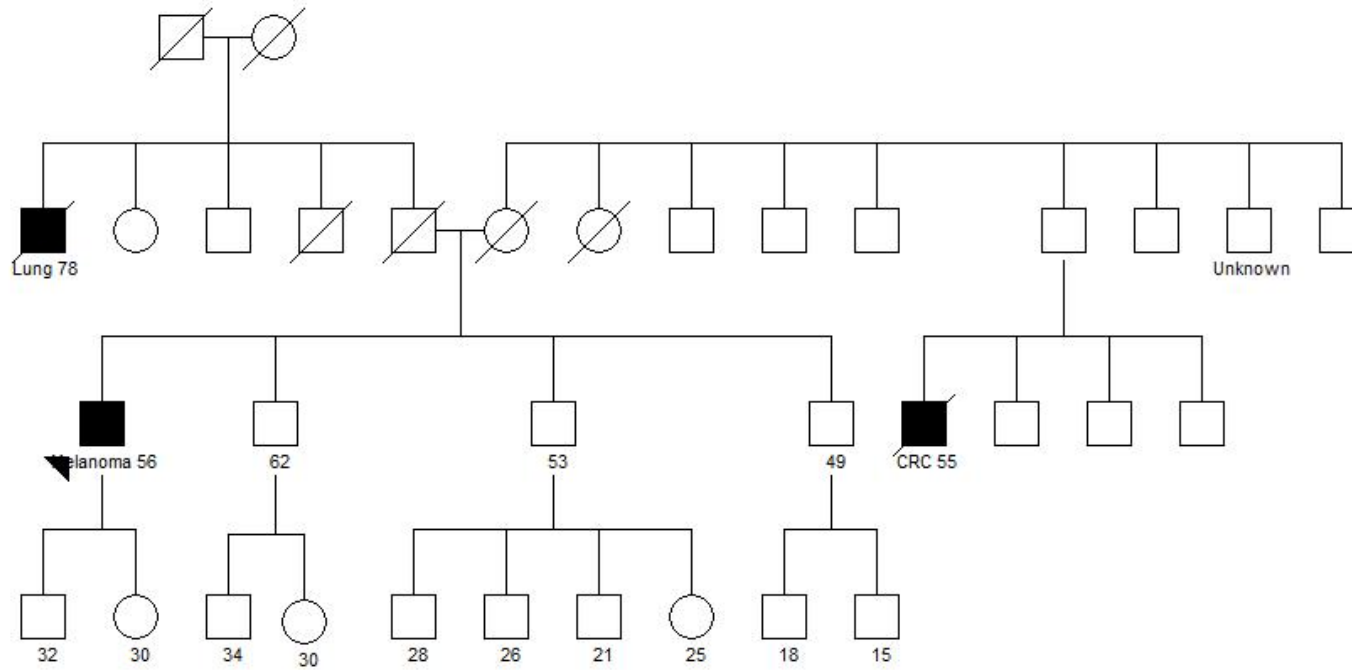
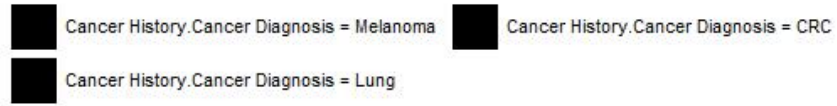
24/05/2010





**Probando 40**

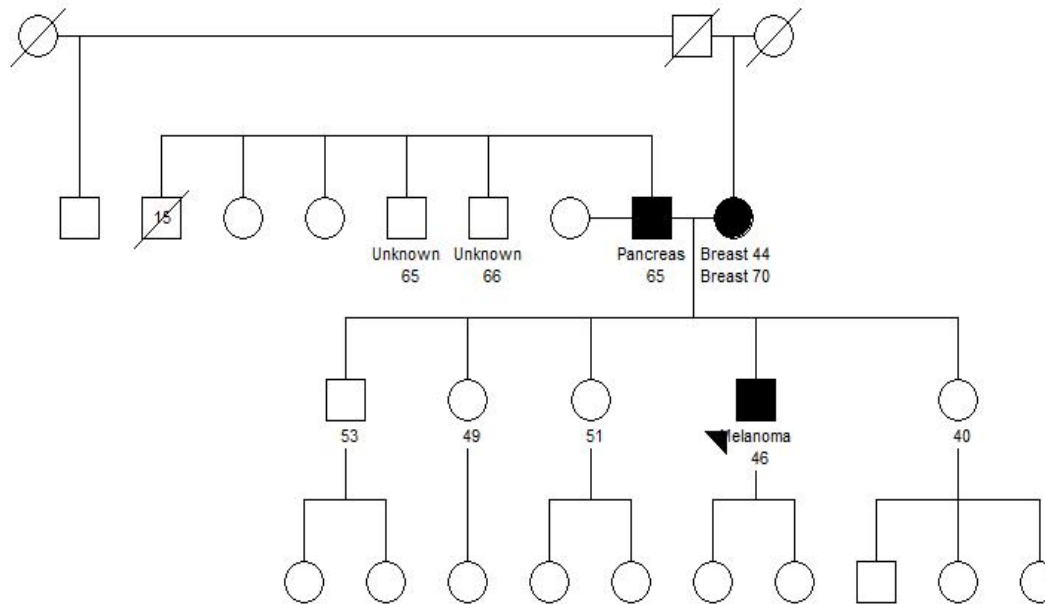
24/05/2010



**Probando 41**

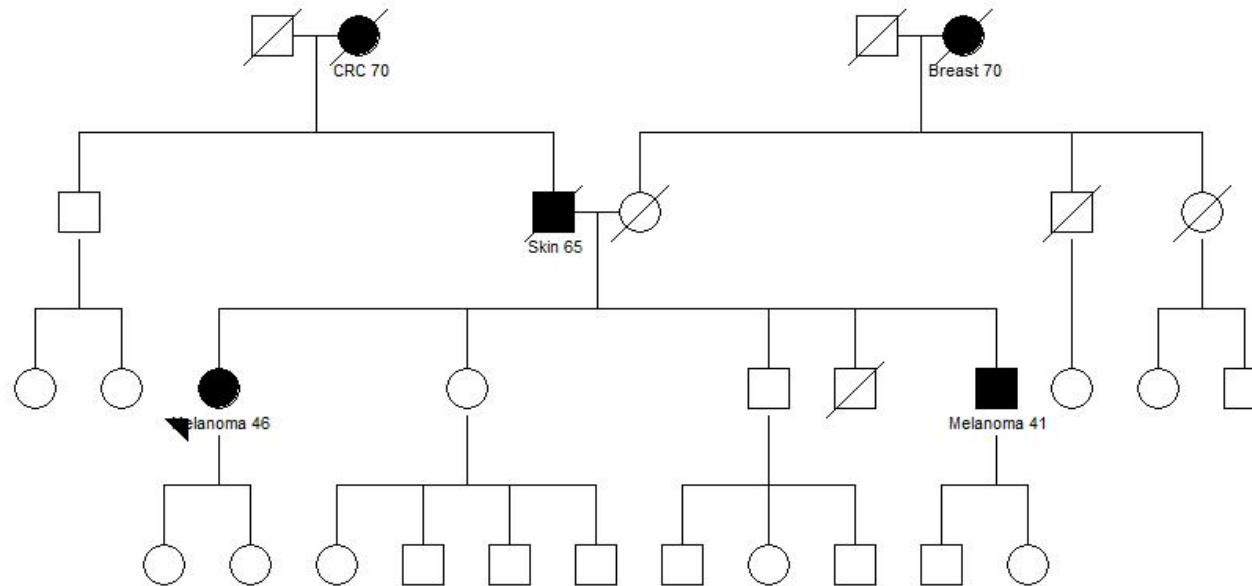
24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Pancreas   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Breast



**Probando 42**

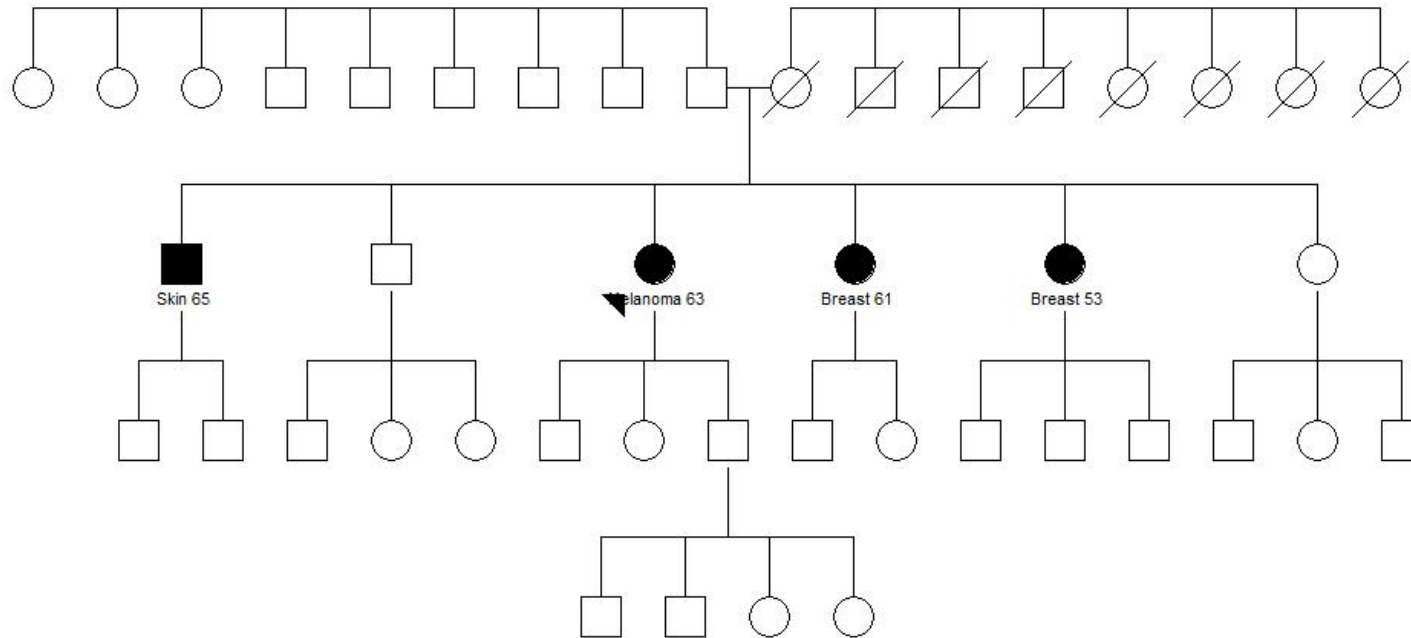
24/05/2010



**Probando 43**

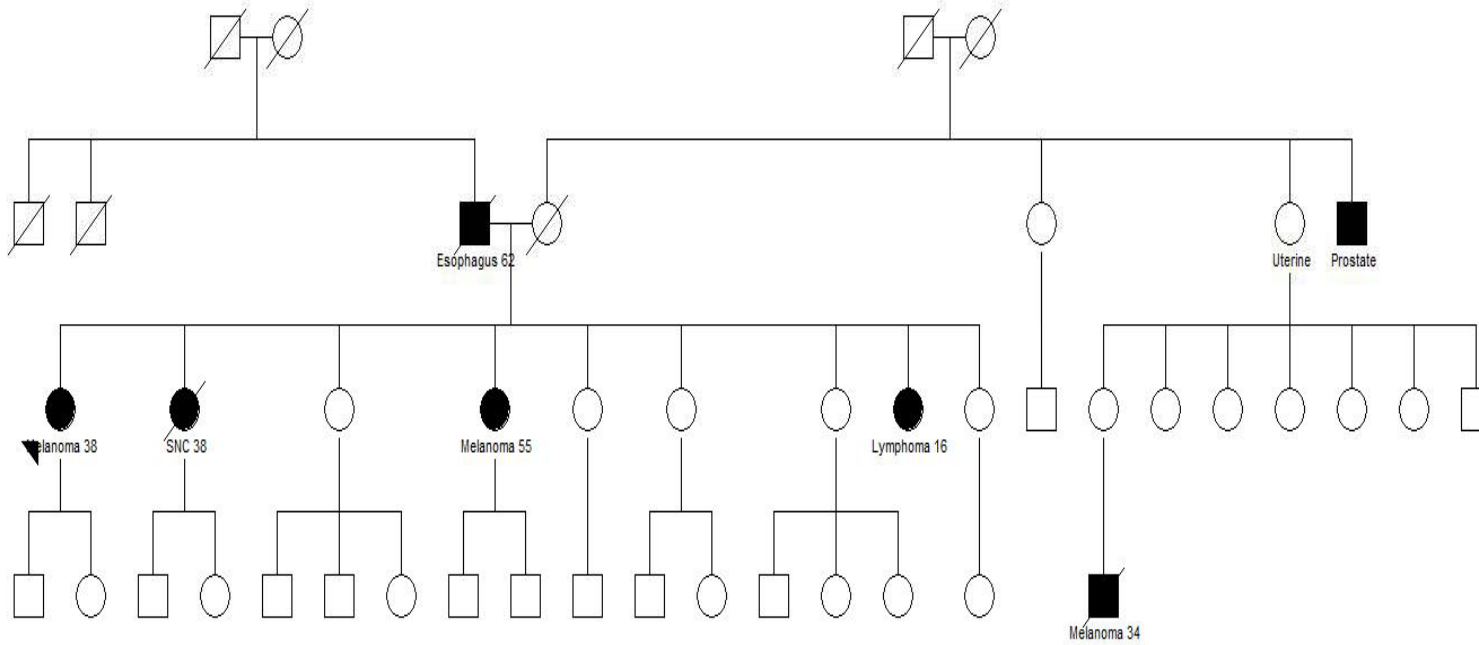
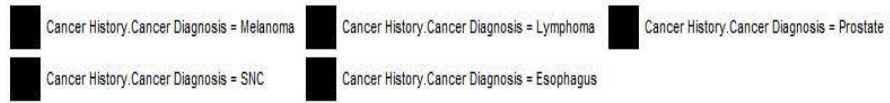
24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Breast   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Skin



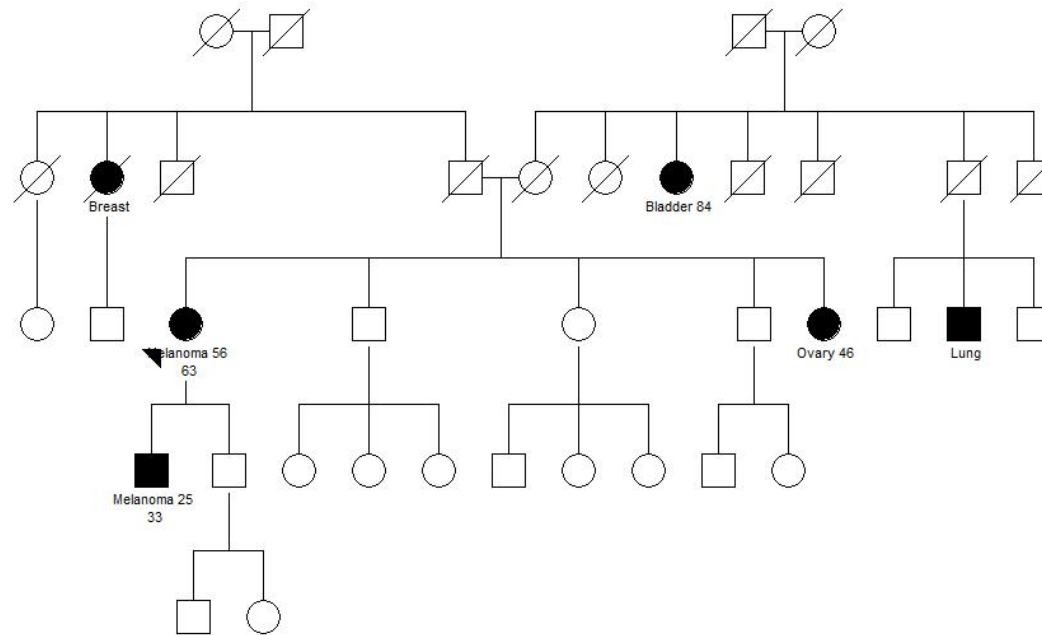
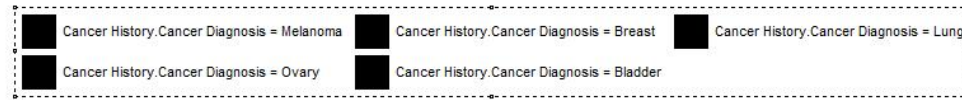
**Probando 44**

24/05/2010



**Probando 45**

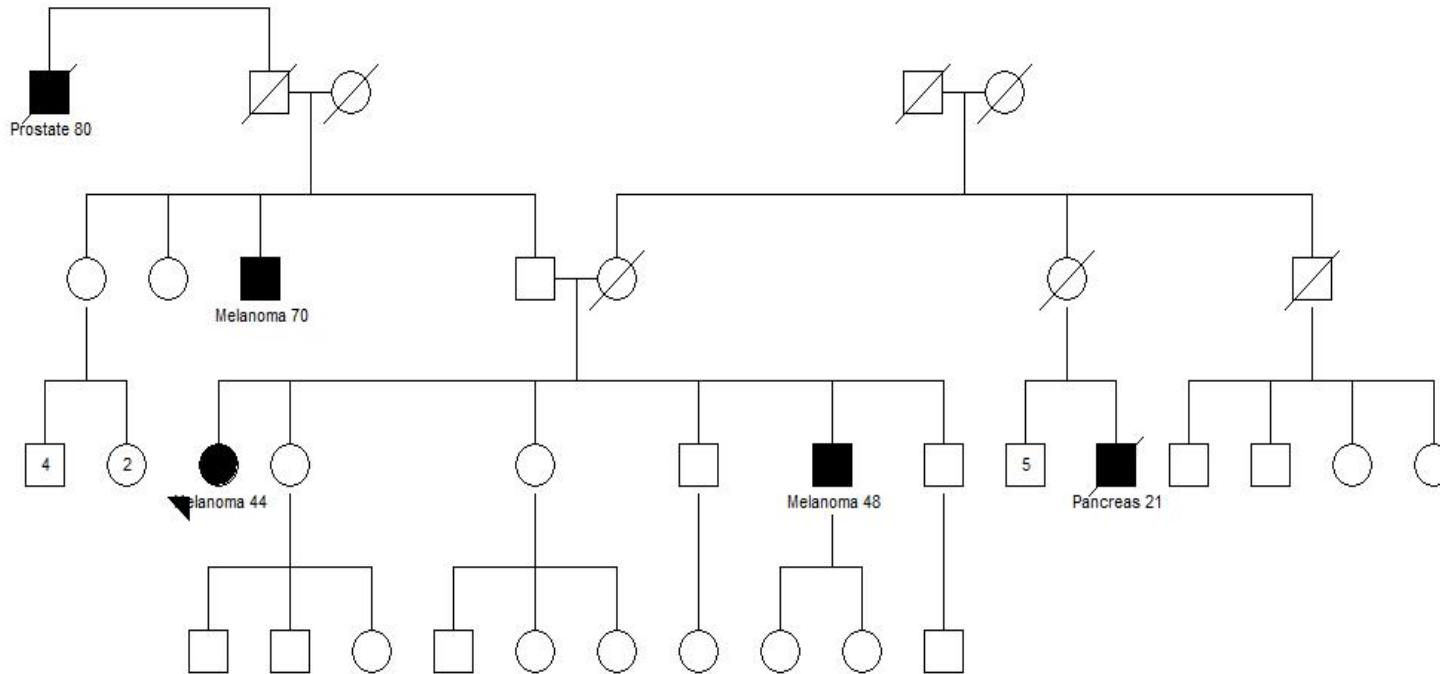
24/05/2010



**Probando 47**

24/05/2010

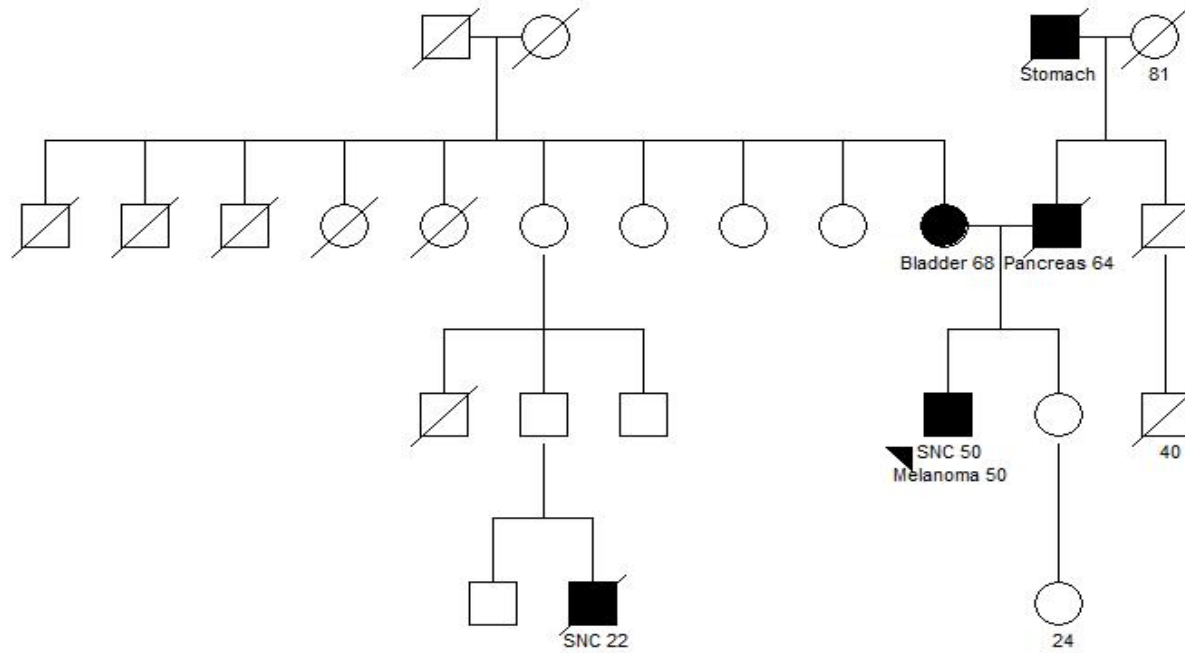
■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Prostate ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Pancreas



**Probando 48**

24/05/2010

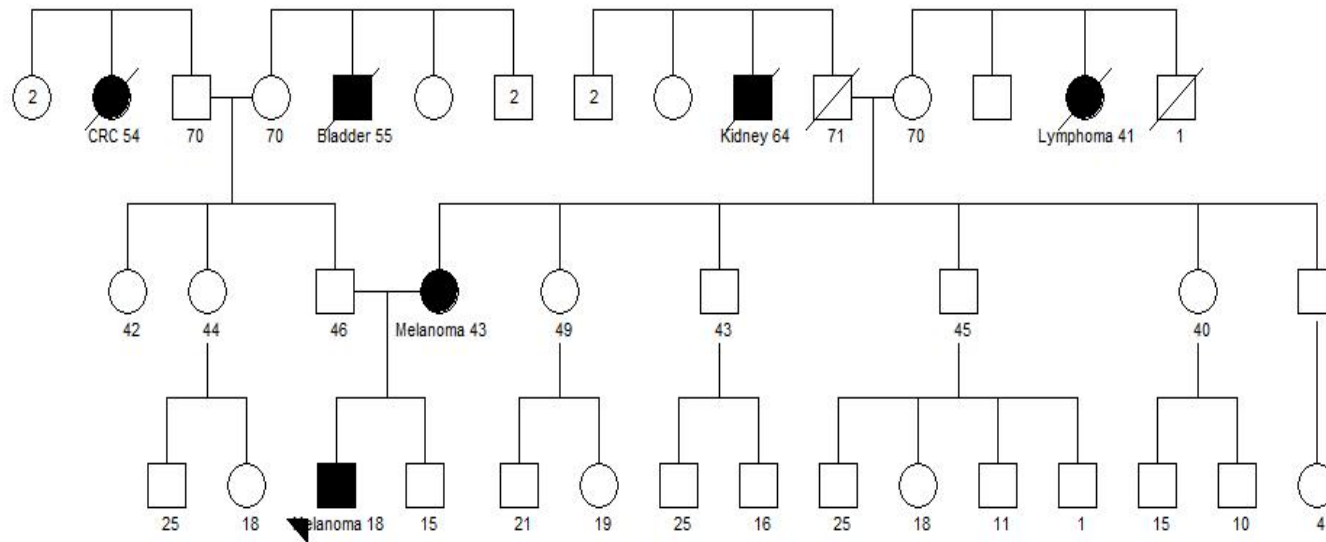
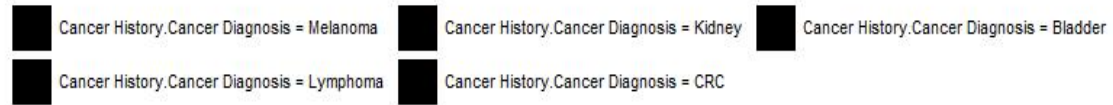
■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma    ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Bladder    ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Stomach  
■ Cancer History.Cancer Diagnosis = SNC    ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Pancreas





**Probando 49**

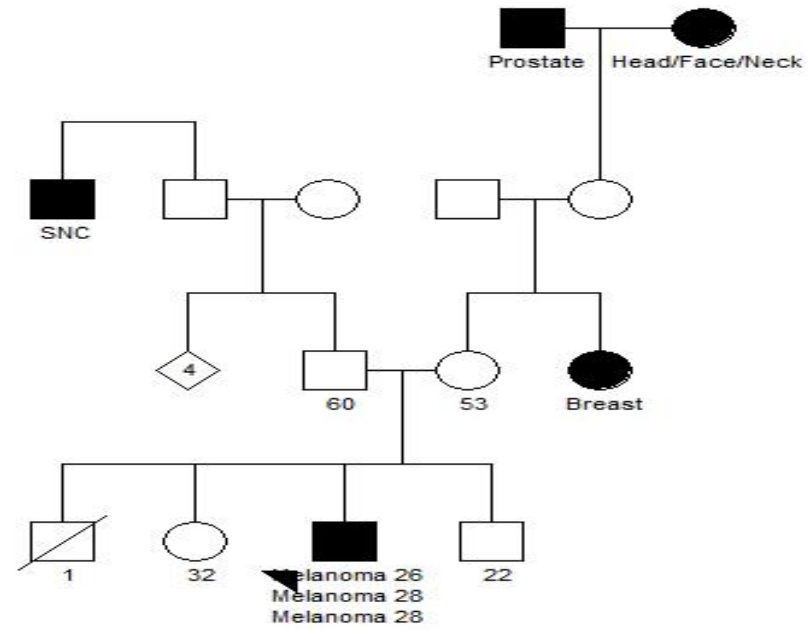
24/05/2010



**Probando 51**

24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma    ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Bre  
■ Cancer History.Cancer Diagnosis = SNC        ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Pro



**Probando 53**

24/05/2010

■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Melanoma   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Esophagus   ■ Cancer History.Cancer Diagnosis = Pancreas

