

**CRISTIANE DE OLIVEIRA**

**“INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS *P53 ARG72PRO*,  
*MDM2 T309G*, *BCL2 C(-938)A* E *BAX G(-248)A*, RELACIONADOS  
COM APOPTOSE CELULAR, NA SUSCEPTIBILIDADE AO  
MELANOMA CUTÂNEO”**

***“INFLUENCE OF THE POLYMORPHISMS *P53 ARG72PRO*,  
*MDM2 T309G*, *BCL2 C(-938)A* AND *BAX G(-248)A*, INVOLVED WITH  
CELULAR APOPTOSIS, IN CUTANEOUS MELANOMA  
SUSCEPTIBILITY”***

**Campinas, 2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**CRISTIANE DE OLIVEIRA**

**“INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS P53 ARG72PRO, MDM2 T309G, BCL2 C(-938)A E BAX G(-248)A, RELACIONADOS COM APOPTOSE CELULAR, NA SUSCEPTIBILIDADE AO MELANOMA CUTÂNEO”**

***“INFLUENCE OF THE POLYMORPHISMS P53 ARG72PRO, MDM2 T309G, BCL2 C(-938)A AND BAX G(-248)A, INVOLVED WITH CELULAR APOPTOSIS, IN CUTANEOUS MELANOMA SUSCEPTIBILITY”***

Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, na área de concentração em Biologia Estrutural, Celular, e do Desenvolvimento

*Masters dissertation presented to the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas to obtain the Masters degree in Medical Pathophysiology, concentration in the Structural Biology, Cellular and Development*

**Orientadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima**

***Advisor: Associated Professor Carmen Silvia Passos Lima***

**Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Cristiane de Oliveira, e orientada pela Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima**

Assinatura da orientadora

---

**Campinas, 2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

OL4i Oliveira, Cristiane de, 1985 -  
Influência dos polimorfismos *P53* ARG72PRO,  
*MDM2* T309G, *BCL2* C(-938)A e *BAX* G(-248)A,  
relacionados com apoptose celular, na  
susceptibilidade ao melanoma cutâneo / Cristiane  
de Oliveira. --Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Carmem Silvia Passos Lima.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual  
de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Melanoma. 2. Pele - Câncer. 3.  
Polimorfismo. 4. Apoptose. 5. Risco. I. Lima,  
Carmem Silvia Passos. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.  
Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Influence of the polymorphisms *P53* ARG72PRO, *MDM2* T309G, *BCL2* C(-938)A and *BAX* G(-248)A, involved with celular apoptosis, in cutaneous melanoma susceptibility.

**Palavra-chave em inglês:**

Melanoma  
Skin cancer  
Polymorphisms  
Apoptosis  
Risk

**Área de Concentração:** Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento

**Titulação:** Mestre em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Carmem Silvia Passos Lima [Orientador]  
Maria de Fátima Sonati  
José Antônio Sanches Junior

**Data da defesa:** 12-06-2012

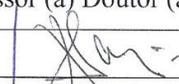
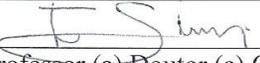
**Programa de Pós-Graduação:** Fisiopatologia Médica

# Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Cristiane de Oliveira

Orientador(a): Prof. Dr. Carmen Silvia Passos Lima

<b>Membros:</b>

Professor (a) Doutor (a) Maria de Fatima Sonati

Professor (a) Doutor (a) José Antônio Sanches Junior

Professor (a) Doutor (a) Carmen Silvia Passos Lima

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/06/2012



## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho à minha amada família, pelo constante apoio e compreensão em todos os momentos. E aos pacientes que participaram da elaboração deste trabalho, por doarem um pouco de si, em momento tão delicado em suas vidas*



*"Se não houver frutos,  
valeu a beleza das flores..."*

*Se não houver flores,  
valeu a sombra das folhas..."*

*Se não houver folhas,  
valeu a intenção da semente..."*

**Henfil**



## AGRADECIMENTOS

---

À Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima, pela orientação, apoio, amizade e profissionalismo, sem os quais eu não teria terminado minha dissertação.

Ao Dr. José Augusto Rinck Júnior, do ambulatório de Oncologia Clínica, e à Profa. Dra. Aparecida Machado de Moraes, do ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP, pelo apoio e enorme ajuda na obtenção das amostras de pacientes.

Ao Prof. Dr. José Vassallo e ao Dr. Paulo Latuf Filho, do Laboratório de Investigação em Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela ajuda e paciência na realização, padronização e análises da técnica de imunoistoquímica.

À Profa. Dra. Maria Letícia Cintra, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela ajuda na compreensão de aspectos histopatológicos da doença. À Arethusa, pela eficiência na preparação das lâminas para a reação de imunoistoquímica.

À Stela, do Registro Hospitalar do Câncer, pela obtenção dos prontuários, a todos os funcionários do ambulatório de Oncologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, pela ajuda na coleta do sangue de pacientes. À Ucha, pela ajuda na padronização das genotipagens.

Aos meus amigos Gustavo, Anderson, Érika, Gabriela, Raquel e Alessandro, pela amizade ajuda inestimáveis, fundamentais no desenvolvimento do meu trabalho.

À Iramaia, Leisa, Camila, Aline, Stela, Tathi, Guilherme e Éricka do Laboratório de Genética do Câncer da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela ajuda em todos os momentos.



Aos meus pais, Lourdes e Luiz, alicerces da minha existência e formação, à minha avó Jovina e à minha irmã Elaine, pelo amor incondicional sem o qual eu não teria chegado aqui. Ao Mendes pelo apoio e participação.

Aos meus amigos mais que especiais Eliana e Vitor pela atenção e carinho sempre prontos a me acolher.

À todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa (nº 2009/12602-0) e auxílio pesquisa (nº 2010/18904-5), fundamentais para o realização desse trabalho.

A minha gratidão a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e desenvolvimento desse trabalho!



## Lista de abreviaturas

---

<i>BAX</i>	Gene pró-apoptótico
<i>BCL2</i>	Gene antiapoptótico
<i>CDKN2</i>	Gene inibidor da ciclina dependente de quinase
CPD	Ciclobutano dímero de pirimidina
DAB	Diaminobenzidina tetracloroeto
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
HCL	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e eosina
IC	Intervalo de confiança
MC	Melanoma cutâneo
<i>MDM2</i>	Gene inibidor do gene <i>P53</i>
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
OR	Razão das chances
<i>P53</i>	Gene supressor de tumor <i>P53</i>
pb	Pares de bases



## Lista de abreviaturas

---

PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Digestão enzimática
rpm	Rotação por minuto
rs	Número de referência do polimorfismo gênico
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SNP	Polimorfismo de base única
TA	Temperatura ambiente
Taq	Enzima polimerase <i>Termus aquaticus</i>
U	Unidade
UV	Ultravioleta
μL	Microlitro



## Lista de Figuras

---

	Página
<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da infiltração do melanoma cutâneo nas camadas da pele e os critérios de espessura de Breslow e níveis de Clark .....	<b>40</b>
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da via intrínseca da apoptose e interação dos genes <i>P53</i> , <i>MDM2</i> , <i>BCL2</i> e <i>BAX</i> .....	<b>43</b>
<b>Figura 3.</b> Genótipos do polimorfismo Arg72Pro do gene <i>P53</i> .....	<b>79</b>
<b>Figura 4.</b> Genótipos do polimorfismo T309G do gene <i>MDM2</i> .....	<b>85</b>
<b>Figura 5.</b> Genótipos do polimorfismo C(-938)A do gene <i>BCL2</i> .....	<b>91</b>
<b>Figura 6.</b> Genótipos do polimorfismo G(-248)A do gene <i>BAX</i> .....	<b>97</b>
<b>Figura 7.</b> Expressão da proteína mdm2 em células de melanoma cutâneo .....	<b>105</b>
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática da apoptose como as funções conhecidas ou presumidas das proteínas produzidas pelos genes polimórficos <i>P53</i> , <i>MDM2</i> , <i>BCL2</i> e <i>BAX</i> .....	<b>123</b>



## Lista de Tabelas

---

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> Informações sobre os polimorfismos <i>P53</i> Arg72Pro, <i>MDM2</i> T309G, <i>BCL2</i> C(-948)A e <i>BAX</i> G(-248)A	
<b>Tabela 2.</b> Frequências das distribuições dos pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a idade, sexo e raça .....	<b>73</b>
<b>Tabela 3.</b> Frequências das distribuições dos pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a cor da pele, a cor dos olhos, a cor dos cabelos e a presença de nevos .....	<b>74</b>
<b>Tabela 4.</b> Frequências das distribuições dos pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a presença de efélides, a graduação histopatológica da elastose solar, o relato de queimadura solar, a incapacidade de bronzear e o tabagismo.....	<b>75</b>
<b>Tabela 5.</b> Frequências das distribuições dos pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a localização, espessura de Breslow, os índices de Clark e os estágios do tumor .....	<b>77</b>
<b>Tabela 6.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>P53</i> Arg72Pro em pacientes com melanoma cutâneo e em controles .....	<b>80</b>
<b>Tabela 7.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>P53</i> Arg72Pro em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por idade, sexo e raça.....	<b>81</b>
<b>Tabela 8.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>P53</i> Arg72Pro em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por características da pele, olhos e cabelos e tabagismo.....	<b>82</b>
<b>Tabela 9.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>P53</i> Arg72Pro em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por aspectos do tumor.....	<b>83</b>



## Lista de Tabelas

---

	<b>Página</b>
<b>Tabela 10.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>MDM2</i> T309G em pacientes com melanoma cutâneo e em controles.....	<b>86</b>
<b>Tabela 11.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>MDM2</i> T309G em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por idade, sexo e raça.....	<b>87</b>
<b>Tabela 12.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>MDM2</i> T309G em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por características da pele, olhos e cabelos e tabagismo.....	<b>88</b>
<b>Tabela 13.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>MDM2</i> T309G em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por aspectos do tumor.....	<b>89</b>
<b>Tabela 14.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>BCL2</i> C(-938)A em pacientes com melanoma cutâneo e em controles .....	<b>92</b>
<b>Tabela 15.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>BCL2</i> C(-938)A em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por idade, sexo e raça .....	<b>93</b>
<b>Tabela 16.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>BCL2</i> C(-938)A em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por características da pele, olhos e cabelos e tabagismo.....	<b>94</b>
<b>Tabela 17.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>BCL2</i> C(-938)A em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por aspectos do tumor .....	<b>95</b>



## Lista de Tabelas

---

	<b>Página</b>
<b>Tabela 18.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>BAX</i> G(-248)A em pacientes com melanoma cutâneo e em controles .....	<b>98</b>
<b>Tabela 19.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>BAX</i> G(-248)A em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por idade, sexo e raça....	<b>99</b>
<b>Tabela 20.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>BAX</i> G(-248)A em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por características da pele, olhos e cabelos e tabagismo.....	<b>100</b>
<b>Tabela 21.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>BAX</i> G(-248)A em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por aspectos do tumor...	<b>101</b>
<b>Tabela 22.</b> Frequências dos genótipos combinados do polimorfismos <i>P53</i> Arg72Pro, <i>MDM2</i> T309G, <i>BCL2</i> C(-938)A, <i>BAX</i> G(-248)A em pacientes com melanoma cutâneo e em controles.....	<b>103</b>
<b>Tabela 23.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo T309G do gene <i>MDM2</i> em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por intensidades da expressão da proteína mdm2.....	<b>106</b>
<b>Tabela 24.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo T309G do gene <i>MDM2</i> em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por porcentagens de células que expressam a proteína mdm2.....	<b>107</b>
<b>Tabela 25.</b> Frequências dos genótipos do polimorfismo T309G do gene <i>MDM2</i> em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por escores de expressão da proteína mdm2.....	<b>108</b>



	Página
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	15
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	19
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	21
<b>RESUMO</b> .....	31
<b>ABSTRACT</b> .....	33
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	35
1. Considerações gerais .....	37
2. Aspectos clínicos .....	38
3. Aspecto ambientais.....	41
4. Aspectos genéticos .....	42
4.1. Apoptose .....	42
4.2. Polimorfismo <i>P53</i> Arg72Pro .....	43
4.3. Polimorfismo <i>MDM2</i> T309G .....	45
4.4. Polimorfismo <i>BCL2</i> C(-948)A .....	46
4.5. Polimorfismo <i>BAX</i> G(-248)A.....	47
5. Justificativa do estudo .....	48
<b>OBJETIVOS</b> .....	51
<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	55
1. Avaliação clínica .....	57
2. Avaliação do tumor.....	58
2.1. Diagnóstico, espessuras de Breslow, índices de Clark, elastose solar e estágios TNM.....	58
2.2. Expressão da proteína mdm2 .....	60
3Análise molecular dos genes <i>P53</i> , <i>MDM2</i> , <i>BCL2</i> e <i>BAX</i> .....	63
3.1 Extração de DNA a partir dos leucócitos .....	63
3.2 Identificação dos genótipos do polimorfismo <i>P53</i> Arg72Pro .....	64
3.3 Identificação dos genótipos do polimorfismo <i>MDM2</i> T309G .....	65
3.4 Identificação dos genótipos do polimorfismo <i>BCL2</i> C(-938)A .....	66
3.5 Identificação dos genótipos do polimorfismo <i>BAX</i> G(-248)A .....	67



## Sumário

---

	Página
3.Aspectos éticos .....	68
4.Análise estatística .....	68
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
1. Avaliação clínica .....	73
2. Avaliação do tumor .....	76
3. Análises do gene <i>P53</i> .....	78
3.1. Polimorfismo Arg72Pro em pacientes e controles .....	78
3.2. Polimorfismo Arg72Pro e aspectos clínicos .....	80
3.3. Polimorfismo Arg72Pro e aspectos do tumor .....	83
4. Análises do gene <i>MDM2</i> .....	84
4.1. Polimorfismo T309G em pacientes e controles .....	84
4.2. Polimorfismo T309G e aspectos clínicos .....	86
4.3. Polimorfismo T309G e aspectos do tumor .....	89
5. Análises do gene <i>BCL2</i> .....	90
5.1. Polimorfismo C(-948)A em pacientes e controle.....	90
5.2. Polimorfismo C(-948)A e aspectos clínicos .....	92
5.3. Polimorfismo C(-948)A e aspectos do tumor .....	95
6. Análises do gene <i>BAX G(-248)A</i> .....	96
6.1. Polimorfismo G(-248)A em pacientes e controles .....	96
6.2. Polimorfismo G(-248)A e aspectos clínicos .....	98
6.3. Polimorfismo G(-248)A e aspectos do tumor .....	101
7. Combinação dos polimorfismos dos genes <i>P53</i> , <i>MDM2</i> , <i>BCL2</i> e <i>BAX</i> .....	102
8. Expressão da proteína mdm2 .....	104
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>109</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>125</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>129</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>145</b>



Os genes *P53* e *BAX* (pró-apoptóticos) e *MDM2* e *BCL2* (antiapoptóticos) atuam na morte de células epiteliais danificadas por raios ultravioleta (UV) da luz solar e estão relacionados com a origem do melanoma cutâneo (MC). A proteína codificada pelo alelo selvagem Arg do polimorfismo *P53* Arg72Pro induz melhor a apoptose do que a do alelo variante Pro. Os alelos variantes G e A dos polimorfismos *MDM2* T309G e *BCL2* C(-938)A e o alelo variante A do polimorfismo *BAX* G(-248)A estão relacionados com maior e menor expressão proteica, respectivamente, quando comparados aos alelos selvagens T, C e G. Como são incertos os papéis desses polimorfismos no risco e manifestações clínicas do MC, estes foram os principais objetivos do presente estudo. O DNA genômico de 150 pacientes e de 150 controles foi analisado por meio da reação em cadeia da polimerase e digestão enzimática. As frequências dos genótipos *P53* ArgArg (58,7% vs 44,7%,  $P= 0,02$ ) e *BCL2* AA (28,0% vs 15,3%,  $P= 0,004$ ) foram maiores em pacientes do que em controles. Portadores dos genótipos estiveram sob riscos 1,86 e 2,87 vezes maior de MC do que os demais, respectivamente. Excessos dos genótipos combinados *P53* ArgArg + *BCL2* AA (36,1% vs 16,9%,  $P= 0,002$ ) e *P53* ArgArg + *BAX* AA (29,5% vs 15,3%,  $P= 0,008$ ) foram observados em pacientes comparados a controles. Indivíduos com os respectivos genótipos estiveram sob riscos 3,43 e 2,71 vezes maior de ocorrência do MC do que os demais, respectivamente. Concluímos que os polimorfismos *P53*Arg72Pro, *BCL2* C(-938)A e *BAX* G(-248)A alteraram o risco de ocorrência do MC em nossa amostra e indivíduos com os genótipos ArgArg, AA e AA dos respectivos polimorfismos devem receber recomendações adicionais para proteção da pele dos efeitos nocivos dos raios UV e seguimento médico com exames dermatológicos periódicos, para prevenção e diagnóstico precoce do tumor.



## Abstract

---

The *P53* and *BAX* (proapoptotic) and *MDM2* and *BCL2* (antiapoptotic) genes remove cells damaged by ultraviolet (UV) rays of the sunlight and, therefore, are related to the cutaneous melanoma (CM) origin. The Arg wild allele of the *P53* Arg72Pro polymorphism is more efficient in inducing apoptosis than the variant Pro allele. The variant G and A alleles of the *MDM2* T309G and *BCL2* C(-948)A polymorphisms, and the A allele of the *BAX* G(-248) A polymorphism are related to higher and lower expressions of the encoded proteins, respectively, than the wild T, C and G wild alleles. Since the roles of the referred genetic polymorphisms on the risk and clinical manifestation of the tumor are still unclear, these were the main aims of the present study. Genomic DNA from 150 patients with CM and 150 controls was analyzed by polymerase chain reaction and enzymatic digestion. The frequencies of the *P53* ArgArg and the *BCL2* AA genotypes were higher in patients than in controls (58.7% versus 44.7%,  $P= 0.02$ ) and (28.0% versus 15.3%,  $P= 0.004$ ) respectively. Carriers of these genotypes had a 1.86 and 2.87-fold increased risks for MC than others, respectively. Excesses of the *P53* ArgArg + *BCL2* AA and *P53* ArgArg + *BAX* AA were seen in patients when compared to controls (36.1% versus 16.9%,  $P= 0.002$ ) and (29.5% versus 15.3%,  $P= 0.008$ ), and carriers of these genotypes had a 3.43 and 2.71-fold increased risks for CM than others, respectively. We concluded that the *P53* Arg72Pro, *BCL2* C(-938)A and *BAX* G(-248)A polymorphisms alter the risk for CM in our sample. We believe that carriers of the ArgArg wild genotype and the variant AA genotypes of the respective genetic polymorphisms should receive additional recommendation to avoid exposition to sunlight and should be frequently evaluated by a dermatologist with the purpose of preventing and performing an early diagnosis of the disease, respectively.



# **INTRODUÇÃO**

---



## 1. Considerações gerais

Acredita-se que o câncer humano ocorra devido a anormalidades que conferem, a algumas células, vantagens que são transmitidas às células filhas, dando origem a um clone celular que escapa aos controles de crescimento e diferenciação, podendo distribuir-se invadir tecidos e órgãos próximos ou distantes (WUNSCH FILHO & GATTÁS, 2001). Embora cerca de 350 bilhões de células se dividam no organismo adulto normal todos os dias, o aparecimento de um tumor é relativamente raro, pela atuação dos mecanismos fisiológicos como o reparo do DNA e de morte celular por apoptose (FERREIRA & ROCHA, 2004).

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, representando 17% dos óbitos de causa conhecida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). No Brasil, o câncer de pele é o tipo mais comum e inclui o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular e o melanoma (DE VITA *et al.*, 2005).

O melanoma cutâneo (MC) é um tumor de baixa incidência (5% dos tumores de pele), mas de alta letalidade (60% das mortes causadas por esta neoplasia) (INCA, 2012). Resulta da transformação maligna dos melanócitos cutâneos, células que produzem a melanina, pigmento natural da pele, e que estão localizadas na camada basal da epiderme (DE VITA *et al.*, 2005).

A incidência de MC dobrou nas últimas décadas e aumentou rapidamente comparada à de outros tipos de cânceres (SCHAFFER *et al.*, 2004). O aumento da incidência da doença foi observado nos países em geral, principalmente em países com população de pele clara como Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos, Canadá, Europa central e norte (JEMAL *et al.*, 2001; GODAR 2011), e esse crescimento também foi

observado no Brasil (MENDONÇA 1992; BAKOS, 2006; FERNANDES *et al.*, 2005; SALVIO *et al.*, 2011; INCA, 2012).

Estima-se que, anualmente, ocorram cerca de 200.000 novos casos desse tumor no mundo, com cerca de 47.000 óbitos (GLOBOCAN, 2008, JEMAL *et al.*, 2011). Foi estimado para o ano de 2011, nos Estados Unidos da América, a ocorrência de 70.230 casos novos de MC (40.010 homens e 30.220 mulheres) com cerca de 8.790 mortes (5.750 homens e 3.040 mulheres). O tumor acomete preferencialmente indivíduos caucasóides, já que as proporções observadas correspondem 1:50 brancos, 1:200 hispânicos e 1:1.000 negros (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011). O MC corresponde ao décimo sétimo tumor mais frequente no Brasil. São esperados 6.230 casos novos do tumor no ano de 2012 no país, sendo 3.530 deles apenas na região Sudeste (INCA, 2012).

O MC é considerado um grave problema de saúde pública na maioria dos países do mundo, incluindo o Brasil (INCA de 2012). A magnitude do problema encontra-se no diagnóstico da doença em fases avançadas e, muitas vezes, com metástases, especialmente em indivíduos de classes sócio-econômicas menos privilegiadas, quando o tratamento é pouco efetivo e as chances de cura são mínimas (FINN *et al.*, 2012; LIVINGSTONE *et al.*, 2012).

## **2. Aspectos clínicos**

O MC acomete predominantemente indivíduos com pele, cabelos e olhos claros, presença de nevos atípicos, efélides, incapacidade de bronzeamento e propensão a queimaduras solares (DE VITA *et al.*, 2005; MACKIE *et al.*, 2009). Os portadores da síndrome xeroderma pigmentoso (XP), caracterizada pela deficiência do reparo de lesões de DNA, apresentam elevada fotossensibilidade nas regiões expostas à luz solar, com

dramática incidência de câncer de pele, cerca de mil vezes maior que o restante da população (GOODE *et al.*, 2002).

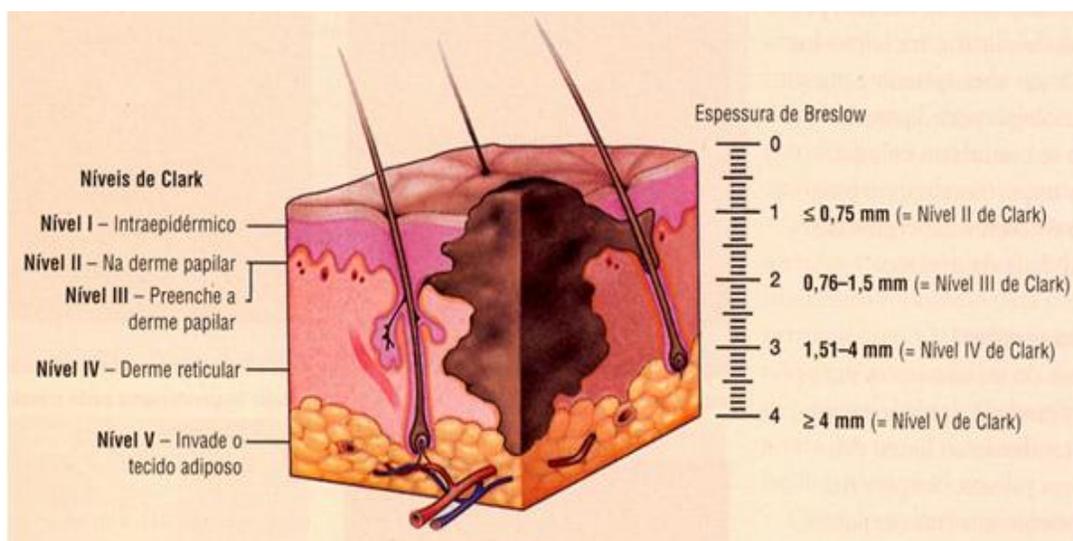
A incidência do MC aumenta com a idade, sendo que a mediana de idade dos pacientes ao diagnóstico é de cerca de 50 anos (JEMAL *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2005). Os homens são mais acometidos pelo tumor do que as mulheres (relação: 1,3:1) (MACKIE *et al.*, 2009; TUCKER, 2009; JEMAL *et al.*, 2011).

O MC usualmente se apresenta como uma lesão de pele com algumas das seguintes características: assimetria, bordas irregulares, variações de cor e aumento ou regressão em seu tamanho ao longo do tempo. Em homens caucasianos, os locais mais frequentes de MC são o dorso e os membros superiores, em mulheres caucasianas, o dorso e os membros inferiores. E em negros e asiáticos, regiões palmo plantar, o leito ungueal e as mucosas são mais afetadas (CAINI *et al.*, 2009).

O diagnóstico é realizado com a exérese da lesão e avaliação histopatológica de cortes seriados do tumor incluídos em parafina (LOTZE *et al.*, 2001).

O crescimento vertical da lesão é o principal fator prognóstico para seus portadores: o acometimento das camadas mais profundas da pele corresponde ao pior prognóstico. A profundidade de infiltração da pele pelo tumor corresponde ao espessura de Breslow (BRESLOW, 1970) e o grau de comprometimento das camadas cutâneas pelo tumor corresponde aos níveis de Clark (CLARK *et al.*, 1969). Ambos são considerados fatores isolados de maior impacto no prognóstico da sobrevida dos pacientes com o tumor (BALCH *et al.*, 2003; SCHAFFER *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2009) (Figura 1). Cerca de 50% dos indivíduos com lesão maior que quatro mm (índice 5 de Clark) desenvolvem metástases.

A sobrevida global dos pacientes em cinco anos de acordo com o nível de Clark II, III, IV e V corresponde: 100%, 93%, 89%, e 82%, e a sobrevida livre de doença corresponde 85%, 88%, 77% e 55% respectivamente (ELSAEBER *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Representação esquemática da infiltração do melanoma cutâneo nas camadas da pele e os critérios previamente definidos para o espessura de Breslow e os níveis de Clark (<http://www.melanomacutaneo.com/classificacao.html>)

O envolvimento linfonodal é outro fator prognóstico na doença, tendo influência tanto o número de linfonodos envolvidos como a forma de detecção dos mesmos, micro ou macroscópica (BALCH *et al.*, 2009; ELSAEBER *et al.*, 2012). Apenas 54% dos casos com comprometimento linfonodal pelo tumor sobrevivem por cinco anos (ELSAEBER *et al.*, 2012).

O principal sistema de estadiamento do MC é o TNM *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (GREENE *et al.*, 2004, BALCH *et al.*, 2009), que considera a extensão do tumor na pele e tecidos adjacentes (T), a presença ou não de ulceração no tumor (a, b) e a

identificação de metástases linfonodais (N) ou à distância (M). Dez estágios do tumor são identificados (0, Ia, Ib, IIa, IIb, IIc, IIIa, IIIb, IIIc e IV). As taxas de sobrevivência em cinco anos para pacientes com o estágio I são 91-95%, estágio II 45-77%, estágio III 69-26% e estágio IV 19-9%, (GREENE *et al.*, 2004; BALCH *et al.*, 2009).

A principal terapêutica para portadores do tumor é a remoção cirúrgica; a quimioterapia, a radioterapia e a imunoterapia atuam como auxiliares na terapêutica (TESTORI *et al.*, 2009).

As tentativas de prevenção e diagnóstico precoce são primordiais em MC, uma vez que a detecção de lesões, em estágio inicial pode ser curável, mas iniciada a metástase, torna-se praticamente fatal (SCHAEFFER *et al.*, 2004; TESTORI *et al.*, 2009 ).

### **3. Aspectos ambientais**

O principal fator ambiental para o MC é a exposição crônica à radiação solar ultravioleta (UV) A e B, particularmente na infância, uma vez que o dano causado às células da epiderme é acumulativo. Estima-se que até 65% dos casos de MC possam estar relacionados à exposição solar (CAINI *et al.*, 2009; WALKER, 2008; VON THALER *et al.*, 2009).

A radiação UVA, que corresponde a mais de 90% da radiação solar, danifica o DNA indiretamente pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem levar ao dano oxidativo (KIELBASSA *et al.*, 1995) e quebras na dupla fita (FOLKARD *et al.*, 2002). A radiação UVB é absorvida pela epiderme e danifica os queratinócitos e melanócitos, com formação de dímeros de pirimidina ciclobutano e fotoprodutos de pirimidina-pirimidona, que alteram as ligações e conseqüentemente a estrutura do DNA. Seus efeitos são mais marcantes do que os da radiação UVA, devido a degradação do DNA

provavelmente pelo estresse oxidativo e pela relação com a via da p53 (HORIYAWA-MIURA *et al.*, 2007).

As lesões causadas pela radiação, se não reparadas, irão ativar genes envolvidos com o mecanismo de apoptose, para a eliminação das células com material genético alterado.

#### **4. Aspectos genéticos**

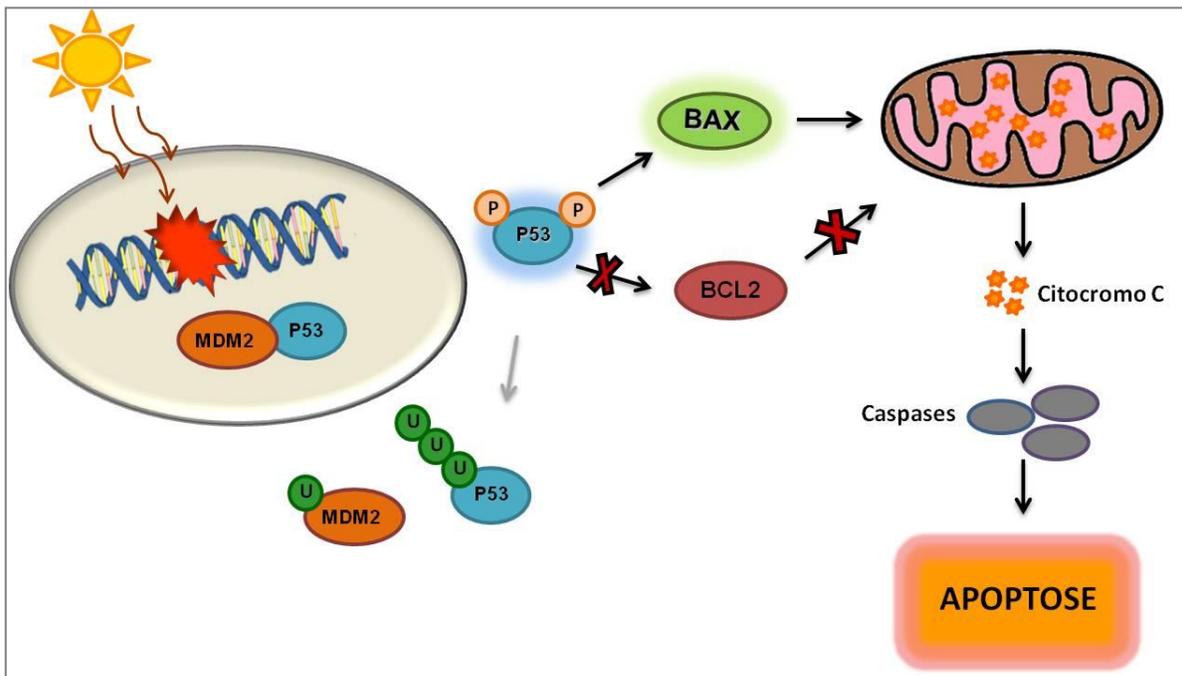
Aproximadamente 10% dos pacientes com MC apresentam parentes de primeiro e segundo grau com o tumor (GANDINI *et al.*, 2005). Mutações no gene *CDKN2A* são identificadas em 20 a 40% dos casos hereditários de MC (UDAYAKUMAR & TSAO, 2009). Ainda, aglomerados de casos de MC em membros de uma mesma família, nos quais não foram identificadas as mutações do gene *CDKN2A* (HANSSON, 2008) e, podem ser atribuídos aos polimorfismos gênicos.

As diferenças na sequência de DNA entre indivíduos são chamadas de polimorfismos. Polimorfismos são definidos como variantes genéticas que estão presentes na população em uma frequência maior que 1%. No entanto, tais frequências são distintas em populações de diferentes raças (SCHAFER & HAWKINS, 1998). Esses polimorfismos genéticos determinam características individuais como aspectos físicos e podem influenciar proteínas codificadas por genes polimórficos envolvidos com a apoptose celular.

##### **4.1. Apoptose**

Já é de conhecimento geral que células de MC são menos susceptíveis à apoptose do que células de outros tumores (LI *et al.*, 2000). Também, as expressões de genes indutores e inibidores da apoptose são distintas em células do melanoma e melanócitos normais

(GROSSMAN *et al.*, 2001). Ainda, a desregulação dos genes envolvidos nas vias de apoptose, podem contribuir para o potencial metastático (GLINSKY *et al.*, 1997) e a quimioresistência do tumor (LI *et al.*, 2000; SOENGAS *et al.*, 2003). Assim, a desregulação na apoptose (Figura 2) parece definitivamente, associada à origem do tumor e às manifestações clínicas da doença.



**Figura 2.** Representação esquemática da via intrínseca da apoptose e interação das proteínas codificadas pelos genes *P53*, *MDM2*, *BCL2* e *BAX*. A p53 encontra-se inativa pela ação do *MDM2* no núcleo da célula. A partir do dano causado ao DNA pela radiação UV da luz solar (não passível de reparo), a p53 é ativada (fosforilada) e migra para o citoplasma com a função de ativar proteínas pró-apoptóticas como bax, alterando a permeabilidade da mitocôndria com liberação do citocromo C, com ativação da via das caspases culminando na apoptose da célula. A proteína p53 inibe a proteína bcl2 (antiapoptótica) na presença de um dano ao DNA

#### 4.2. Polimorfismo Arg72Pro do gene P53

O gene *tumor protein 53*, o *P53*, é um supressor tumoral localizado no cromossomo 17p13.1 (LEVINE *et al.*, 1991). Em resposta a danos no DNA, a proteína p53 acumulada nas células migra para o núcleo e ativa a transcrição de genes com parada do ciclo celular para permitir o reparo de DNA antes da divisão celular. No entanto, quando a lesão não for passível de reparo, é induzida a apoptose (KAELIN *et al.*, 1999; ROBLES & HARRIS, 2001).

Mutações no gene *P53* são encontradas em cerca de 50% dos cânceres humanos (HUSSAIN *et al.*, 2000). Ainda, acredita-se que a via de sinalização do *P53* esteja comprometida por outros mecanismos que não mutações do gene (VOUSDEN *et al.*, 2002; WHIBLEY *et al.*, 2009). Essas descrições indicam que o gene desempenha direta ou indiretamente papel fundamental na origem dos tumores. Entretanto, mutações no gene *P53* são incomuns em MC (CHIN *et al.*, 1997; CHIN *et al.*, 1998). Outros eventos genéticos como os *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) podem alterar a proteína p53 e assim, contribuir de forma consistente para o desenvolvimento do tumor (HAN *et al.*, 2006; STEFANAKI *et al.*, 2006; WHIBLEY *et al.*, 2009).

O polimorfismo *P53* Arg72Pro (rs1042522) é caracterizado pela troca da base nitrogenada guanina por uma citosina no códon 72 do éxon 4 do gene *P53*, e consequentemente na substituição dos aminoácidos arginina (Arg) pela prolina (Pro) na proteína. (MATLASHEWSKI *et al.*, 1987). As proteínas codificadas pelos alelos Arg e Pro foram descritas com forma e atividades funcionais diferentes. O alelo selvagem Arg foi descrito como mais eficiente em induzir a apoptose do que o variante Pro. Entretanto, o alelo variante Pro atua preferencialmente induzindo a parada do ciclo celular e o reparo do

DNA do que o alelo selvagem Arg (THOMAS *et al.*, 1999; DUMONT *et al.*, 2003; PIM *et al.*, 2004; SIDDIQUE & SABAPATHY, 2006).

As frequências dos genótipos homocigoto selvagem ArgArg, heterocigoto ArgPro e homocigoto variante ProPro foram identificadas em 50-54%, 37-45% e 4-8% dos indivíduos saudáveis de diferentes populações étnicas (SHEN *et al.*, 2003; STEFANAKI *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; POVEY *et al.*, 2007; ORTEGA *et al.*, 2007).

O alelo selvagem Arg esteve associado ao aumento do risco de MC em norte americanos (SHEN *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2007) mas, aumento do risco de MC também foi associado ao alelo Pro em gregos (STEFANAKI *et al.*, 2006) e não houve influência desse polimorfismo no risco de MC em escoceses (POVEY *et al.*, 2007). Assim, a influência desse polimorfismo no risco do MC é incerta.

#### **4.3. Polimorfismo T309G do gene *MDM2***

O gene *murine double minute 2*, o *MDM2*, está localizado no cromossomo 12q14, é o maior inibidor do gene *P53* (BOND *et al.*, 2004). A transcrição do *MDM2* é mediada por dois promotores, o promotor P1 independente do *P53* e o promotor P2 sensível ao *P53*. Em muitas células, a transcrição por P1 ocorre em baixos níveis, mas a transcrição por P2, que é mediada pelo *P53*, aumenta a eficiência na tradução da proteína *mdm2*. Próximo ao promotor P2 estão presentes sítios de ligação para fatores de transcrição, como Sp1, em que a ativação desse sítio resulta no aumento dos níveis de RNA mensageiro e da proteína *mdm2* (BROWN *et al.*, 1999; JIN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005).

A proteína *mdm2* é uma componente chave na regulação da estabilidade da *p53*, com a função de inibir a atividade transcricional, impedindo que a *p53* ative/regule genes alvos relacionados com ciclo celular, reparo de DNA e apoptose. Além disso, a *mdm2*

funciona como uma ubiquitina-ligase regulando a ubiquitinação da p53, processo de marcação para degradação da proteína pela via proteossoma celular (VOUSDEN *et al.*, 2002; BOND *et al.*, 2004). O aumento da expressão desse gene pode resultar na inativação do *P53* (MICHAEL *et al.*, 2003).

O polimorfismo T309G (rs2279744) está localizado no promotor P2, na região *downstream* do intron 1 do gene *MDM2*. É caracterizado pelos nucleotídeos timina e guanina no alelo selvagem e no alelo variante, respectivamente (BOND *et al.*, 2004). O aumento da expressão da proteína mdm2 foi associado com o alelo variante G, que aumenta afinidade de ligação do fator de transcrição Sp1, que causa aumento da expressão da mdm2 e conseqüentemente inibição transcricional da p53. Entretanto, tal descrição foi observada em escassas publicações (BOND *et al.*, 2004; HIRATA *et al.*, 2007).

Os genótipos homozigoto selvagem TT, heterozigoto TG e homozigoto variante GG foram identificados em 19-27%, 46-57% e 16-36% dos indivíduos saudáveis de populações diversas (FIROZ *et al.*, 2009; CAPASSO *et al.*, 2010).

A influência do polimorfismo *MDM2* T309G no risco de MC é incerta. O alelo variante G esteve associado ao aumento do risco de MC em mulheres americanas com idade menor do que 40 anos (FIROZ *et al.*, 2009). Em contraste, o polimorfismo não alterou o risco de MC em americanos em geral e em italianos (GLUCK *et al.*, 2009; NAN *et al.*, 2009; CAPASSO *et al.*, 2010).

#### **4.4. Polimorfismo C(-938)A do gene *BCL2***

A família *BCL2* é composta por genes que sintetizam proteínas presentes na membrana mitocondrial, e são importantes reguladores da morte celular por apoptose, e o principal mediador na ativação dessa família de genes é o *P53*.

O gene *B-cell lymphoma 2*, o *BCL2*, está localizado no cromossomo 18q21.3 e consiste de três éxons e dois promotores P1 e P2, com funções diferentes (KALLIO *et al.*, 2004). O promotor P2 atua como regulador negativo diminuindo a atividade funcional do P1. O equilíbrio entre esses dois promotores regula a expressão da proteína *bcl2*, que tem a função de inibir a morte celular, pela sua função antiapoptótica (SETO *et al.*, 1988). O aumento da expressão da proteína *bcl2* foi relacionada com pior prognóstico (WOJCIK *et al.*, 2005; NUCKEL *et al.*, 2007; HIRATA *et al.*, 2009a; HIRATA *et al.*, 2009b). Inclusive o aumento da expressão foi associado com a resistência quimioterápica em melanoma (LEITER *et al.*, 2000; HUSSEIN *et al.*, 2003; SOENGAS *et al.*, 2003)

O polimorfismo *BCL2* C(-938)A (rs2279115), localizado no promotor P2 (regulador negativo) do gene, é caracterizado pelos nucleotídeos citosina no alelo selvagem e adenina no alelo variante (KALLIO *et al.*, 2004). O alelo selvagem C foi associado com aumento da atividade negativa do P2 (regulador negativo da expressão), que causa a inibição do P1, conseqüente redução na expressão da proteína *bcl2*. Já o alelo variante A, reduz a atividade negativa do P2, que favorece ao aumento da expressão da proteína *bcl2* (NUCKEL *et al.*, 2007; LEHNERDT *et al.*, 2009). O aumento da expressão da *bcl2* está associado com redução do estímulo da morte celular e aumento da proliferação.

As frequências dos genótipos homocigoto selvagem CC, heterocigoto CA e homocigoto variante AA foram observadas em 15-29%, 37-53% e 17-48% dos indivíduos saudáveis de diferentes etnias (NUCKEL *et al.*, 2007; HIRATA *et al.*, 2009a; HIRATA *et al.*, 2009b; LEHNERDT *et al.*, 2009; MOON *et al.*, 2009).

Até onde atinge nosso conhecimento, não há estudos que avaliaram a influência desse polimorfismo *BCL2* C(-938)A no risco de MC.

#### 4.5. Polimorfismo G(-248)A do gene *BAX*

O gene *B-cell lymphoma 2-associated X protein*, o *BAX*, é um membro pró-apoptótico da família *BCL2* e está localizado no cromossomo 19q13.3 (SAXENA *et al.*, 2002). O gene *P53* induz a expressão do *BAX* (MIYASHITA *et al.*, 1995; THORNBORROW *et al.*, 2002) e inibe a expressão do *BCL2* (ZHAN *et al.*, 1999).

O polimorfismo *BAX* G(-248)A (rs4645878) está localizado na região 5' não traduzida, no promotor desse gene. Caracteriza-se pela presença dos nucleotídeos guanina e adenina no alelo selvagem G e no alelo variante A, respectivamente (SAXENA *et al.*, 2002). O alelo variante A foi associado com a redução da expressão da proteína pró-apoptótica *bax*, quando comparado ao alelo selvagem G (SAXENA *et al.*, 2002; STARCZYNSKI *et al.*, 2005).

Os genótipos homocigoto selvagem GG, heterocigoto GA e homocigoto variante AA foram identificados em 77-85%; 14-21% e 0-1% dos indivíduos saudáveis de populações étnicas distintas (FEGAN *et al.*, 2006, KÖHLER *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007).

Não foi observada influência do polimorfismo *BAX* G(-248)A no risco de leucemia linfocítica crônica (STARCZYNSKI *et al.*, 2005), doença do fígado selvagem (KÖHLER *et al.*, 2006) e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CHEN *et al.*, 2007). E até onde atinge nosso conhecimento, não há estudos sobre o papel do polimorfismo no risco de ocorrência de MC.

**Tabela 1.** Informações sobre os polimorfismos *P53* Arg72Pro, *MDM2* T309G, *BCL2* C(-948)A e *BAX* G(-248)A

Gene	Polimorfismo	Genótipos	Frequência genotípica	Estudos associados com MC	
<i>P53</i> 17p13.1 Regulador da proliferação e sobrevivência celular	Arg72Pro (rs 1042522)	ArgArg	50-54%	Shen <i>et al.</i> 2007 Li <i>et al.</i> 2007	Arg aumenta o risco
		ArgPro	37-45%	Han <i>et al.</i> 2006 Povey <i>et al.</i> 2007 Capasso <i>et al.</i> 2010	Não altera o risco
		Pro Pro	4-8%	Gwosdz <i>et al.</i> 2006 Stefanaki <i>et al.</i> 2007	Pro aumenta o risco
<i>MDM2</i> 12q14 Inibidor P53	T309G (rs 2279744)	TT	19-27%	Firoz <i>et al.</i> 2009	Não altera o risco
		TG	46-57%	Nan <i>et al.</i> 2009	
		GG	16-36%	Capasso <i>et al.</i> 2010	
<i>BCL2</i> 18q21.3 Antiapoptótico	C(-948)A (rs 2279115)	CC	15-29%	Não há estudos em MC	
		CA	37-53%		
		AA	17-48%		
<i>BAX</i> 19q13.3 Pró-apoptótico	G(-248)A (rs 4645878)	GG	77-85%	Não há estudos em MC	
		GA	14-21%		
		AA	0-1%		

### Justificativa do estudo

O câncer é a segunda causa de óbito na região sudeste do Brasil (DUNCAN *et al.*, 2002) e altos índices de radiação UVA e UVB são incidentes nessa região. Além disso, a população brasileira é altamente heterogênea e miscigenada, composta por imigrantes da Europa, Ásia e África (MENDES *et al.*, 2010), com possíveis diferenças na

susceptibilidade aos efeitos deletérios dos raios UV na pele e diferentes susceptibilidades ao MC. Assim, nos pareceu de interesse avaliar as frequências dos polimorfismos dos genes *P53*, *MDM2*, *BCL2* e *BAX* em pacientes com MC e indivíduos saudáveis da nossa região, com o propósito de verificar a influência desses polimorfismos no risco de ocorrência do MC e em suas manifestações clínicas.

Vale ressaltar que não há estudos que avaliaram a influência dos polimorfismos *BCL2* C(-938)A e *BAX* G(-248)A em MC.

Ainda, como o papel do polimorfismo *MDM2* T309G na expressão da proteína *mdm2* em MC não se encontra definitivamente estabelecido, também pareceu de interesse avaliar a expressão da referida proteína em tumores de portadores dos genótipos distintos do polimorfismo gênico.

# **OBJETIVOS**

---



Foram avaliados pacientes com de melanoma cutâneo (MC) atendidos nos ambulatórios de Oncologia Clínica e de Dermatologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP e doadores de sangue do HEMOCENTRO da UNICAMP, tendo como objetivos:

- Verificar se os polimorfismos *P53* Arg72Pro, *MDM2* T309G, *BCL2* C(-938)A e *BAX* G(-248)A influenciam o risco de ocorrência do MC;
- Verificar se estes polimorfismos gênicos estão associados aos aspectos clínicos dos pacientes como a idade, o sexo, a raça; a cor da pele, olhos e cabelos, a presença de nevos, a presença efélides, o grau de elastose solar, a incapacidade de bronzear, as queimaduras solares prévias e o hábito de fumar; e aspecto histopatológico como o grau de elastose solar
- Verificar se estes polimorfismos gênicos estão associados às características tumorais como as espessuras de Breslow, os índice de Clark e os estágios TNM e;
- Verificar se o polimorfismo *MDM2* T309G altera a expressão da proteína mdm2 em MC.



# **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---



Foram avaliados 150 pacientes com MC consecutivos, atendidos por ocasião do primeiro atendimento nos ambulatórios de Oncologia Clínica e de Dermatologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP no período de abril de 2007 até julho de 2011.

Foi também avaliado um grupo controle, constituído por 150 doadores de sangue do Hemocentro da UNICAMP, com o propósito de obter um grupo representativo dos pacientes que procuram assistência médica na Instituição.

Foram excluídos do estudo os indivíduos com antecedente pessoal ou hereditário de MC e aqueles que não aceitaram participar do mesmo após esclarecimentos pertinentes.

O tamanho amostral do estudo teve como base as frequências dos polimorfismos gênicos obtidas em indivíduos saudáveis da população brasileira e outras populações e, foi calculado de acordo com as normas definidas por POCOCK (1985).

## **1. Avaliação clínica**

Os dados relativos à identificação, à idade, ao sexo, ao histórico pessoal ou familiar de MC hereditário, queimaduras solares, incapacidade de bronzear e ao hábito de fumar, à cor de pele, olhos e cabelos, à presença de nevos e efélides e localização do tumor, foram obtidas por meio de questionário específico (Anexo 1) aplicado aos pacientes pelo pesquisador envolvido no estudo (Dr. José Augusto Rinck Jr) do Ambulatório de Oncologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Queimadura solar foi definida como um evento de exposição solar resultando em eritema acentuado e calor na pele por pelo menos dois dias. Foram considerados pacientes que sofreram queimadura solar aqueles que relataram a ocorrência de pelo menos um evento em qualquer fase da vida.

Foi considerado incapaz de bronzear-se, os pacientes que relataram eritema acentuado na pele após exposição solar e que não apresentaram escurecimento da pele.

Foram considerados tabagistas os pacientes que mantiveram o hábito de fumar até o momento do diagnóstico do MC ou próximo a ele. Foram considerados não tabagistas aqueles que nunca fumaram ou que pararam de fumar há pelo menos um ano antes do diagnóstico.

Os pacientes foram classificados como portadores de pele clara e não clara, olhos claros (azul ou verde) e não claros (castanhos ou negros) e cabelos claros (loiros ou ruivos naturais) e não claros (castanhos ou negros), de acordo com descrições prévias (FITZPATRICK, 1988).

Foram considerados portadores de nevos, aqueles pacientes que apresentaram pelo menos um nevo melanocítico em qualquer área do corpo. Os pacientes foram classificados como portadores ou não portadores de efélides, tendo como base o exame geral dos pacientes.

Os pacientes foram também classificados como portadores de MC do tipo axial (tronco, dorso, cabeça e pescoço) e em membros (superior e inferior).

Os dados relativos à identificação, à idade, ao sexo e raça dos controles foram obtidas por meio de questionário específico aplicado a cada indivíduo pelo pesquisador responsável pelo estudo, considerando a informação verbal dos doadores

## **2. Avaliação do tumor**

### **2.1. Diagnóstico, espessura de Breslow, nível de Clark, elastose solar e estágios TNM**

O diagnóstico de MC foi realizado por exame histopatológico realizado em cortes de fragmentos do tumor incluídos em parafina e corados com hematoxilina e eosina.

O microestadiamento do MC foi realizado após uma biópsia excisional do tumor primário, com avaliação das espessuras de Breslow e dos níveis de Clark. Foram considerados portadores de tumor Breslow I, os pacientes com tumor menor ou igual a 0,75mm de espessura, portadores de tumor Breslow II, os pacientes com tumor com 0,76 a 1,5mm de espessura, portadores de tumor Breslow III, os pacientes com tumor com 1,51 a 4mm de espessura e, portadores de tumor Breslow IV, os pacientes com tumor maior ou igual a 4mm de espessura (BRESLOW, 1975). Foram considerados portadores de tumor do nível I de Clark, os pacientes cujas células tumorais estiveram confinadas à epiderme, portadores de tumor do nível II de Clark, os pacientes cujo tumor invadiu a derme papilar atravessando a membrana basal, portadores de tumor do nível III de Clark, os pacientes cujo tumor preencheu a derme papilar e estendeu-se entre a derme papilar, portadores de tumores do nível IV de Clark, os pacientes cujo tumor invadiu a derme reticular e portadores de tumores do nível V de Clark, os pacientes cujo tumor invadiu o tecido subcutâneo (CLARK *et al.*, 1969)

A exposição solar a que pacientes foram submetidos foi determinada por meio da observação de elastose solar no local da lesão cutânea. A elastose solar foi avaliada em tecido normal adjacente ao tumor em lâminas contendo cortes de pele com o tumor coradas

com hematoxilina e eosina. Foi classificada como de grau zero, quando não foram observadas alterações nas fibras elásticas (não visível), de grau I, quando foram observadas fibras elásticas visíveis com características acidófilas, de grau II, quando foram observadas fibras elásticas basófilas em pequeno número, de grau III, quando foram observadas fibras elásticas basófilas em grande número e, de grau IV, quando foram observadas fibras elásticas basófilas em grande número e esgarçadas formando elastoma de Dubreuilh (THOMAS *et al.*, 2010).

O processamento do material e as análises foram realizados nos Laboratórios de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP e do Hospital do Câncer A. C. Camargo, sob as supervisões da Profa. Dra. Maria Letícia Cintra e do Prof. Dr. José Vassallo, respectivamente.

O estágio TNM do tumor foi obtido com base nos achados histopatológicos da peça cirúrgica e os resultados da radiografia do tórax, da dosagem da desidrogenase láctica (LDH) e fosfatase alcalina e da ultrassonografia ou tomografia computadorizada de abdome e pelve, por pesquisador envolvido no estudo (Dr. José Augusto Rinck Jr), de acordo com os critérios estabelecidos pelo *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (Anexos 2 e 3).

## **2.2. Expressão da proteína mdm2**

A avaliação da expressão da proteína mdm2 em células do MC foi realizada por método imunistoquímico, com a utilização de polímeros que se ligam ao anticorpo primário com maior afinidade, evitando o problema de colorações não-específicas.

Foi realizada, inicialmente, a silanização de lâminas de vidro para a retirada de gordura e outros resíduos. Para tal, elas foram lavadas em água corrente e permaneceram em álcool absoluto durante toda à noite. A seguir, foram colocadas em acetona pura durante

um minuto, em acetona com silano durante três minutos, em acetona pura durante um minuto e, a seguir, em estufa a 110°C para secagem.

Os cortes histológicos foram obtidos de tecido tumoral incluído em parafina com a utilização de um micrótomo (Leica, Werzlar, Hessen, Alemanha). A seguir, foram transferidos para um banho-maria a 60°C para estiramento dos cortes de parafina, e foram colocados em lâminas de vidro silanizadas anteriormente.

As lâminas com os cortes de fragmentos tumorais incluídos em parafina foram colocadas em xilol aquecido em estufa a 110°C durante 15 segundos para a retirada da parafina. A seguir, o material foi submetido à lavagem durante 15 segundos em xilol a temperatura ambiente (TA), à hidratação em álcool 80% e álcool 50% durante 15 segundos cada e à lavagem em água corrente durante cinco minutos.

Posteriormente, o material foi submetido a três lavagens em água oxigenada 10% durante três minutos para o bloqueio da peroxidase endógena.

A seguir, foi realizada a recuperação antigênica. Tal procedimento visou romper as possíveis ligações entre os grupos aminos dos aminoácidos de proteínas do tecido cutâneo, com a conseqüente formação de pontes de metileno, por ação do formol utilizado para a fixação do material. Estas pontes poderiam bloquear o acesso dos anticorpos aos respectivos antígenos do tumor, mascarando-os. Para tal, as lâminas com o material fixado foram incubadas em uma panela a vapor a 95°C, com tampão citrato 10mM pH 6,0, durante 30 minutos. A seguir, foram resfriadas à temperatura ambiente durante 20 minutos, e incubadas em leite desnatado Molico<sup>®</sup> diluído em água destilada (5%) por 30 minutos para o bloqueio de reações inespecíficas. Posteriormente foram lavadas em água corrente durante cinco minutos e colocadas em solução tampão salina fosfato (PBS) onde permaneceram até o início dos procedimentos inerentes às reações imunoistoquímicas.

Para as reações imunoistoquímicas, o material recebeu 100µl do anticorpo primário específico *Mouse Monoclonal Antibody MDM2 protein* (Novocastra<sup>TM</sup>, Newcastle, UK), (diluído 1:50) e ficou incubado em câmara úmida com água a 37°C durante 30 minutos. Permaneceu em geladeira a 4°C durante toda a noite.

No dia seguinte, as lâminas com o material fixado foram retiradas da geladeira e foram submetidas a três lavagens em tampão PBS em temperatura ambiente durante cinco minutos. A seguir, receberam a solução de bloqueio do anticorpo primário e ativador da penetração do polímero (Novolink *Post Primary Block* - Novocastra<sup>TM</sup>, Newcastle, UK), que ficou incubado por 30 minutos em TA e seguida de duas lavagens com PBS.

Foi adicionado o sistema de detecção para a reação um kit com polímero de peroxidase (Novolink *Polymer Detection System* - Novocastra<sup>TM</sup>, Newcastle, UK) que reconhece imunoglobulinas e detecta quaisquer anticorpos primários ligados ao tecido cutâneo que ficou incubado por 30 minutos e posteriormente lavadas com PBS. Após a secagem das lâminas foi adicionado o substrato cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Novolink *DAB Chromogen* - Novocastra<sup>TM</sup>, Newcastle, UK) que a reação com a peroxidase produz um precipitado de coloração castanha.

As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer durante 30 segundos. A seguir, foram lavadas com água amoniacal (1%) e desidratadas em álcool e xilol, após esses procedimentos, receberam uma lamínula que foi fixada ao corte histológico com bálsamo do Canadá.

As análises do material foram realizadas considerando, inicialmente, a intensidade da expressão da proteína mdm2 em células tumorais, tendo o grau zero sido usado para a falta de expressão proteica, o grau 1 para expressão discreta, o grau 2 para expressão moderada e o grau 3 para expressão acentuada.

A seguir, foram avaliadas as porcentagens de células com expressão da proteína mdm2, tendo sido usado o grau zero para a ausência de células com expressão da proteína, o grau 1 para menos do que 10% de células com expressão da proteína, o grau 2 para 11 a 40% de células com expressão da proteína, o grau 3 para 41 a 70% de células com expressão da proteína e o grau 4 para mais que 70% de células com expressão da proteína. A somatória dos graus das duas variáveis (intensidade e porcentagem de células com expressão da proteína) foi classificada em escore final de expressão da proteína mdm2, variando de 0 à 7, foram considerados negativos valores de 0 a 3, e positivos valores acima de 4, conforme descrição prévia (MOREIRA *et al.*, 2010).

Os procedimentos técnicos e as análises foram realizados no Laboratório de Investigação em Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo Dr. Paulo Latuf Filho e pelo Prof. Dr. José Vassallo, respectivamente.

### **3. Análise molecular dos genes *P53*, *MDM2*, *BCL2* e *BAX***

#### **3.1 Extração de DNA a partir de leucócitos**

O método utilizado para a extração do DNA foi o descrito por WOODHEAD *et al.*, (1986), com modificações.

De forma sucinta, foram colhidos 4ml de sangue periférico de cada paciente e controle, em frasco estéril com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A amostra foi centrifugada a 1300 rotações por minuto (rpm) por dez minutos. Após o descarte do plasma, 500µl dos eritrócitos foram lisados em um tubo cônico de 1,5ml com uma mistura de sacarose 320mM, Tris HCl 10mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5mM e Triton X-100 1%. A seguir, o concentrado de células obtido foi ressuspenso em uma mistura de Tris HCl pH

7,5, EDTA 10mM, NaCl 10mM e dodecil sulfato sódio (SDS) 20%, compondo um tampão de digestão de proteínas, juntamente com a proteinase K 20mg/ml e incubado em banheira a 55°C por duas horas. Em seguida, foram adicionados 200µl de cloreto de lítio e incubado ao freezer a -20°C durante 15 minutos. Após, foi retirado do freezer e centrifugado por dez minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro tubo cônico de 1,5ml. A seguir, o DNA obtido foi precipitado em etanol absoluto, re-hidratado em álcool 70% e diluído em água estéril a 37°C.

### **3.2. Identificação do polimorfismo Arg72Pro do gene *P53***

A amplificação de parte do éxon 4 do gene *P53* foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação da PCR consistiu de 38µl de água estéril, 5µl de tampão (100mM de TRIS HCl, pH 8,8; 500mM de KCl), 1,5µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM MgCl<sub>2</sub>), 1µl da mistura desoxirribonucléica 10mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5µl (0,1mM) dos iniciadores direto (5'-CACCCATCTACAGTCCCCCTTGC-3') e reverso (5'-CTCAGGGCAACTGACC-GTGCAAG-3') (HONMA *et al.*, 2008) e 2,5U de *Taq* DNA polimerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) e aproximadamente 100ng de DNA em um volume final de 50µl.

A reação compreendeu 35 ciclos de incubação a 94°C (60 segundos), a 60°C (60 segundos), a 72°C (60 segundos) e 72°C (5 minutos) para a extensão final. Após a reação foi obtido um fragmento de 318 pares de bases (pb) do gene *P53*.

Os genótipos distintos do polimorfismo foram avaliados por meio da digestão enzimática dos fragmentos amplificados, com a utilização de 10µl do produto da PCR, 3,0µl de água estéril, 1,5µl de tampão e 5U da enzima *Bst*UI (*Bsh* 1236I) (MBI Fermentas,

Vilnius, Lithuania). A reação foi incubada em banho seco, a 37°C, por 16 horas. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% com brometo de etídio, para visualização dos fragmentos sob luz UV. Fragmentos de 318pb correspondeu ao alelo variante Pro e fragmentos de 182 e 136pb corresponderam ao alelo selvagem Arg. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações.

### **3.3. Identificação do polimorfismo T309G do gene *MDM2***

Parte do promotor do gene *MDM2* foi amplificado por meio da PCR. A reação da PCR consistiu de 39µl de água estéril, 5µl de tampão (100mM de TRIS HCl, pH 8,8; 500mM de KCl), 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µl da mistura desoxirribonucléico 10mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5µl (0,1mM) dos iniciadores direto (5'-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3') e indireto (5'-AGCAAGTCGGTGCTTACCTG-3') (SUN *et al.*, 2009) e 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) e aproximadamente 100ng de DNA em um volume final de 50µl.

A reação compreendeu 35 ciclos de incubação a 94°C (30 segundos), a 59°C (30 segundos), a 72°C (30 segundos) e 72°C (10 minutos) para a extensão final. Após a reação foi obtido um fragmento de 352pb do promotor do gene *MDM2*.

Os genótipos distintos do polimorfismo foram avaliados por meio da digestão enzimática dos fragmentos amplificados, com a utilização de 10µl do produto da PCR, 2,3µl de água estéril, 1,5µl de tampão, 0,2µl de BSA e 10U da enzima *Mspa*1I (New England BioLabs, Massachusetts, Estados Unidos). A reação foi incubada em banho seco, a 37°C por 16 horas. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, para visualização dos fragmentos sob luz UV.

Fragmentos de 233 e 88pb corresponderam ao alelo selvagem T e fragmentos de 187 e 88pb corresponderam ao alelo variante G. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações.

#### **3.4. Identificação do polimorfismo C(-938)A do gene *BCL2***

Parte do promotor do gene *BCL2* foi amplificada por meio da PCR. A reação da PCR consistiu de 38µl de água estéril, 5µl de tampão (100mM de TRIS HCl, pH 8,8; 500mM de KCl), 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µl da mistura desoxirribonucléica 10mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5µl (0,1mM) dos iniciadores direto (5'-GCATTTGCTGTTCGGAGTTT-3') e indireto (5'-AAGTCCTGTGATGTTTTCCCC-3') (HIRATA *et al.*, 2009a) e 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) e aproximadamente 100ng de DNA em um volume final de 50µl.

A reação compreendeu 34 ciclos de incubação a 94°C (45 segundos), a 56,5°C (45 segundos), a 72°C (45 segundos) e 72°C (5 minutos) para a extensão final. Após a reação foi obtido um fragmento de 188pb do promotor do gene *BCL2*.

Os genótipos distintos do polimorfismo C(-938)A foram avaliados por meio da digestão enzimática dos fragmentos amplificados, com a utilização de 10µl do produto da PCR, 3,0µl água estéril, 1,5µl de tampão, 0,2µL de BSA e 3,5U da enzima *BccI* (New England BioLabs, Massachusetts, Estados Unidos). A reação foi incubada em banho seco, a 37°C, por 16 horas. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, para visualização dos fragmentos sob luz UV. Fragmentos de 114 e 74pb corresponderam ao alelo selvagem A e fragmentos de 188pb

correspondeu ao alelo variante C. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações.

### **3.5 Identificação do polimorfismo G(-248)A do gene *BAX***

Parte da região 5' não traduzida do gene *BAX* foi amplificada por meio da PCR. A reação da PCR consistiu de 38µl de água estéril, 5µl de tampão (100mM de TRIS HCl, pH 8,8; 500mM de KCl), 2,5µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1µl da mistura desoxirribonucléica 10mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,5µl (0,1mM) dos iniciadores direto (5'-TTAGAGACAAGCCTGG-GCGT-3') e indireto (5'-CAATGAGCATCTCCCGATAA-3') (STARCZYNSKI *et al.*, 2005) e 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) e aproximadamente 100ng de DNA em um volume final de 50µl.

A reação compreendeu 35 ciclos de incubação a 94°C (30 segundos), a 63°C (30 segundos), a 72°C (30 segundos) e 72°C (5 minutos) para a extensão final. Após a reação foi obtido um fragmento de 280pb do promotor do gene *BAX*.

Os genótipos distintos do polimorfismo G(-248)A foram avaliados por meio da digestão enzimática dos fragmentos amplificados, com a utilização de 10µl do produto da PCR, 3µl água estéril, 1,5µl de tampão e 3U da enzima *Fnu4HI* (*SatI*) (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). A reação foi incubada em banho seco, a 55°C, por quatro horas. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3% com brometo de etídio, para visualização dos fragmentos sob luz UV. Fragmentos de 234 e 46pb corresponderam ao alelo selvagem G e fragmentos de 280pb correspondeu ao alelo variante A. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações.

### **3. Aspectos éticos**

O estudo molecular foi realizado em amostras de sangue periférico obtidas por ocasião da punção venosa realizada para a coleta de exames necessários ao diagnóstico ou acompanhamento clínico de pacientes e da doação de sangue dos controles.

A radiografia de tórax, a ultrassonografia, a cintilografia óssea foram realizadas como exames de rotina para o estadiamento do MC e programação terapêutica. Os procedimentos inerentes ao estudo foram realizados apenas após a aprovação do comitê de ética em pesquisa e após a assinatura dos termos de consentimento pelos pacientes e controles inseridos no estudo.

Parte das amostras de DNA e dados de pacientes e controles aqui avaliadas pertenceram a estudo prévio já aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP (Registro CEP nº 424/2006). O presente projeto foi aprovado pelo CEP (Anexo 4).

### **6. Análise estatística**

O teste de verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado com o intuito de verificar se ocorreu distribuição preferencial de algum dos genótipos avaliados no grupo de pacientes e controles utilizados no estudo (BEIGUELMAN, 1995).

A significância estatística das diferenças entre os grupos foi calculado por meio do teste da probabilidade exata de Fisher ou qui-quadrado.

As determinações dos riscos de ocorrência do MC, a que os pacientes e controles foram submetidos, foram obtidas por meio das razões das chances (ORs) e calculadas considerando um intervalo de confiança de 95%. Os valores das ORs foram corrigidos por

meio de modelos de regressão logística multivariada, tendo como variável dependente o grupo (pacientes e controles) e como variáveis independentes a idade, o sexo, a raça e os genótipos dos genes *P53*, *MDM2*, *BCL2* e *BAX*.

Para comparação das variáveis categóricas (expressão da proteína por imunohistoquímica considerando intensidade, percentual de células com expressão proteica e escore) em tumores de pacientes com os genótipos distintos do polimorfismo T309G do gene *MDM2* foi utilizado o teste qui-quadrado de Person ou o teste exato de Fisher.

O poder da análise (PA) foi calculado afim de verificar o tamanho do efeito mínimo susceptível de ser detectado em um estudo utilizando o tamanho da amostra (POCOCK *et al.*, 1985; HULLEY *et al.*, 1988)

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ( $P < 0,05$ ).

As análises foram realizadas com a utilização dos programas estatísticos para Windows *SPSS Statistical Package for the Social Sciences* versão 15.0 (SPSS Incorporation, Chicago, IL, USA) e *SAS Statistical Analysis System* versão 9.1.3 (SAS Institute Incorporation, Cary, NC, USA).



# **RESULTADOS**

---



## 1. Avaliação clínica

As distribuições individualizadas dos pacientes, de acordo com a idade, o sexo, a raça estão apresentadas no Anexo 5. As distribuições individualizadas dos pacientes pela presença de efélides, grau de elastose solar, relatos de queimaduras solar e incapacidade de bronzear estão apresentadas no Anexo 6.

As distribuições dos 150 pacientes com MC incluídos no estudo de acordo com as características clínicas estão apresentadas nas Tabelas 2 a 4.

**Tabela 2.** Frequências das distribuições dos pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a idade, o sexo e a raça

<b>Variável</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
<b>Idade (anos)</b>	
≤ 59	73 (48,7)
> 59	77 (51,3)
<b>Sexo</b>	
Masculino	75 (50,0)
Feminino	75 (50,0)
<b>Raça</b>	
Caucasóide	138 (92,0)
Negróide	12 (8,0)

Os pacientes apresentaram idade entre 20 e 89 anos (média ± DP: 55 anos ± 15,9 anos; mediana: 56 anos). Cerca de metade da casuística foi constituída por pacientes com idade maior do que 59 anos.

A distribuição dos pacientes por sexo não mostrou predomínio da doença em homens ou mulheres. Já a distribuição dos pacientes por raça mostrou que a doença ocorreu predominantemente em caucasóides.

**Tabela 3.** Frequências das distribuições dos pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a cor da pele, a cor dos olhos, a cor dos cabelos e a presença de nevos

<b>Variável</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
<b>Cor pele</b>	
Clara	137 (91,3)
Não clara	11 (7,4)
Não obtida	2 (1,3)
<b>Cor olhos</b>	
Claros	28 (18,7)
Não claros	62 (41,3)
Não obtida	60 (40,0)
<b>Cor cabelos</b>	
Claros	3 (2,0)
Não claros	87 (58,0)
Não obtida	60 (40,0)
<b>Nevos</b>	
Presença	69 (46,0)
Ausência	66 (44,0)
Não obtida	15 (10,0)

A maioria dos nossos pacientes apresentou pele clara, olhos escuros e cabelos escuros. Não houve distribuição preferencial entre pacientes com ou sem nevos em nossa amostra.

**Tabela 4.** Frequências das distribuições dos pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a presença de efélides, grau de elastose solar, relato de queimadura solar, incapacidade de bronzear e tabagismo

<b>Variável</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
<b>Efélides</b>	
Presença	73 (48,6)
Ausência	56 (37,3)
Não obtida	21 (14,0)
<b>Elastose solar</b>	
Grau 0	26 (17,3)
Grau I+II	31 (20,7)
Grau III+IV	41 (27,3)
Não obtida	52 (34,7)
<b>Queimaduras solar</b>	
Sim	39 (26,0)
Não	49 (32,7)
Não obtida	62 (41,3)
<b>Incapacidade de bronzear</b>	
Sim	38 (25,3)
Não	28 (18,7)
Não obtida	84 (56,0)
<b>Tabagismo</b>	
Sim	47 (31,3)
Não	89 (59,3)
Não obtida	14 (9,4)

Cerca de metade de nossa amostra apresentou efélides em partes do corpo. Proporções similares de pacientes referiram ou negaram queimadura solar e capacidade ou incapacidade para bronzear-se. Ainda, a maioria dos pacientes não tinha o hábito de fumar.

Elastose solar discreta (I+II) e avançada (graus III+IV) foram identificadas em cerca de 20% e 30% dos pacientes que puderam ser avaliados, respectivamente.

Observamos que a elastose solar foi identificada predominantemente em pacientes com idade maior do que 59 anos do que em pacientes mais jovens (44,9% *versus* 7,1%,  $P= 0,003$ ) e em caucasóides do que em negróides (72,5% *versus* 1,0%  $P= 0,01$ ). Entretanto, foi identificada de forma similar em homens e mulheres (35,7% *versus* 37,8%,  $P= 0,10$ ).

As distribuições individualizadas dos 150 controles, de acordo com a idade, o sexo e a raça estão apresentadas no Anexo 9.

Os controles apresentaram idade média de 52 anos (DP: 7) e idade mediana de 53 anos (variação: 26-60 anos). Nossos controles foram pouco mais jovens do que nossos pacientes ( $P= 0,03$ ). Setenta e cinco controles foram homens. Apenas doze controles foram negróides; os demais foram caucasóides.

## **2. Avaliação do tumor**

### **2.1. Localização, espessura de Breslow, índice de Clark e estágios TNM**

As distribuições individualizadas dos 150 pacientes de acordo com a localização, espessura de Breslow, índice de Clark e estágios TNM do tumor estão apresentadas no Anexo 7. Já as frequências das distribuições dos 150 pacientes com MC incluídas no estudo, de acordo com as características do tumor, estão apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Frequências das distribuições dos pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a localização, espessuras de Breslow, índices de Clark e estágios do tumor

<b>Variável</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
<b>Localização</b>	
Axial	80 (53,3)
Extremidades	68 (45,3)
Não obtida	2 (1,4)
<b>Clark</b>	
I+II	75 (50,0)
III+IV+V	66 (44,0)
Não obtida	9 (6,0)
<b>Breslow</b>	
≤ 1,5 mm	47 (31,3)
> 1,5 mm	96 (64,0)
Não obtida	7 (4,7)
<b>Estágios TNM</b>	
0+I+II	111 (74,0)
III+IV	36 (24,0)
Não obtida	3 (2,0)

Proporções similares de nossos pacientes apresentaram o tumor axial e em extremidades e até a derme papilar e além dela. Cerca de dois terços dos nossos pacientes apresentaram tumores com espessura maior do que 1,5mm. Em contraste, a maioria dos nossos pacientes apresentaram tumores localizados.

Também observamos que a elastose solar foi mais comum em pacientes com tumores axiais do que em pacientes com tumores periféricos (49,0% *versus* 23,5%,

$P= 0,03$ ). Frequências similares de elastose solar foram observadas em pacientes com tumores de distintas espessuras de Breslow, níveis de Clark e estágios TNM.

### **3. Análises do gene *P53***

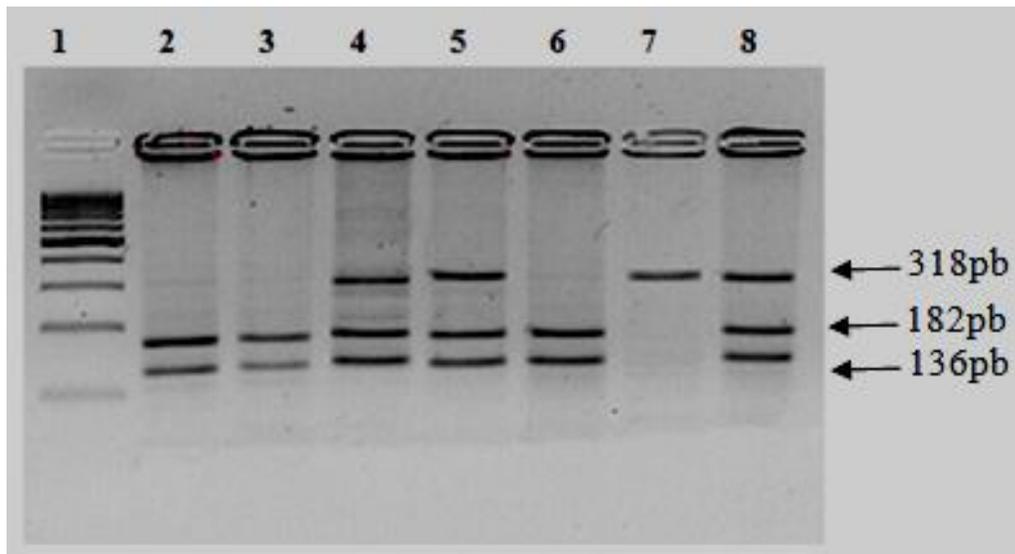
#### **3.1. Polimorfismo Arg72Pro em pacientes e controles**

As distribuições individualizadas dos pacientes com MC e controles, de acordo com os genótipos do gene *P53*, estão apresentadas nos Anexos 8 e 9.

Os grupos de pacientes e de controles estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2= 2,49$ ;  $P= 0,11$  e  $\chi^2= 0,01$ ;  $P= 0,92$ ) para o lócus do gene *P53*, respectivamente, sugerindo que não houve distribuição preferencial de algum dos genótipos avaliados no grupo de pacientes e controles utilizados no estudo.

Os genótipos do polimorfismo *P53* Arg72Pro em pacientes e controles estão apresentados na Figura 3.

As frequências dos genótipos do polimorfismo Arg72Pro do gene *P53* em pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 6.



**Figura 3.** Produtos da digestão enzimática com a enzima *Bsh* 1236I para detecção dos genótipos do polimorfismo Arg72Pro do gene *P53* em pacientes com melanoma cutâneo e controles. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. Fragmentos de 182 e 136 pares de bases (pb) correspondem ao alelo selvagem Arg. Fragmento de 318 pb corresponde ao alelo variante Pro. O marcador do tamanho do DNA de 100pb está apresentado na coluna 1. Nas colunas 2, 3 e 6 estão apresentados os resultados de indivíduos com o genótipo homocigoto selvagem ArgArg. Nas colunas 4, 5 e 8 estão apresentados os resultados de indivíduos com o genótipo heterocigoto ArgPro. Indivíduo com o genótipo homocigoto variante ProPro está apresentado na coluna 7

**Tabela 6.** Frequências dos genótipos do polimorfismo Arg72Pro do gene *P53* em pacientes com melanoma cutâneo e em controles

<b>Polimorfismo Arg72Pro</b>	<b>Pacientes n (%)</b>	<b>Controles n (%)</b>	<b>Valor de P</b>	<b>OR* (IC 95%)</b>	<b>PA</b>
ArgArg	88 (58,7)	67 (44,7)	<b>0,01</b>	<b>1,86 (1,13-3,06)</b>	76%
ArgPro	49 (32,7)	67 (44,7)	0,74	0,86 (0,37-2,03)	10%
ProPro	13 (8,6)	16 (10,6)		Referência	
ArgArg+ArgPro	137 (91,4)	134 (89,4)	0,59	1,24 (0,56-2,73)	8%
ProPro	13 (8,6)	16 (10,6)		Referência	
ArgArg	88 (58,7)	67 (44,7)	<b>0,01</b>	<b>1,79 (1,12-2,85)</b>	71%
ArgPro+ProPro	62 (41,3)	83 (55,3)		Referência	

n: número de casos; ArgArg: genótipo homocigoto selvagem; ArgPro: genótipo heterocigoto; ProPro: genótipo homocigoto variante; OR: razão das chances; IC: intervalo de confiança; \*OR: ajustada por idade, sexo e raça; PA: poder da análise

Observamos que a frequência do genótipo homocigoto selvagem ArgArg (58,7% *versus* 44,7%,  $P= 0,01$ ; PA: 76%) foi maior em pacientes do que em controles. Indivíduos com esse genótipo estiveram sob risco de 1,86 vezes maior de ocorrência do MC do que os indivíduos com os demais genótipos.

### 3.2. Polimorfismo Arg72Pro e aspectos clínicos

As frequências do polimorfismo Arg72Pro do gene *P53* em pacientes estratificados pelos aspectos clínicos estão apresentadas nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7.** Frequências dos genótipos do polimorfismo Arg72Pro do gene *P53* em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por idade, sexo e raça

<b>Polimorfismo <i>P53</i> Arg72Pro</b>							
<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>ArgArg (%)</b>	<b>ProPro+ArgPro (%)</b>	<b>Valor <i>P</i></b>	<b>ArgArg+ArgPro (%)</b>	<b>ProPro (%)</b>	<b>Valor <i>P</i></b>
<b>Idade (anos)</b>							
≤ 59	73	45 (61,6)	28 (38,4)	0,65	68 (93,1)	5 (6,9)	0,68
> 59	77	43 (55,8)	34 (44,2)		69 (89,6)	8 (10,4)	
<b>Sexo</b>							
Maculino	75	48 (64,0)	27 (36,0)	0,18	66 (88,0)	9 (12,0)	0,15
Feminino	75	40 (53,3)	35 (46,7)		71 (94,7)	4 (5,3)	
<b>Raça</b>							
Caucasiano	138	83 (60,1)	55 (39,9)	0,24	127 (92,0)	11 (8,0)	0,26
Negróide	12	5 (41,7)	7 (58,3)		10 (83,3)	2 (16,7)	

N: número de casos; ArgArg: genótipo homozigoto selvagem; ArgPro: genótipo heterozigoto; ProPro: genótipo homozigoto variante

Não observamos diferenças entre as frequências dos genótipos isolados e combinados do polimorfismo *P53* Arg72Pro em pacientes com MC estratificados por idade, sexo e raça.

**Tabela 8.** Frequências dos genótipos do polimorfismo *P53 Arg72Pro* em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por características da pele, olhos e cabelos e tabagismo

Polimorfismo <i>P53 Arg72Pro</i>							
Variável	N	ArgArg (%)	ProPro+ArgPro (%)	Valor P	ArgArg+ArgPro (%)	ProPro (%)	Valor P
<b>Pele</b>							
Clara	137	83 (60,6)	54 (39,4)	0,35	128 (93,4)	9 (6,6)	0,99
Não clara	11	4 (36,4)	7 (63,7)		8 (72,7)	3 (27,3)	
<b>Olhos</b>							
Claros	28	14 (50,0)	14 (50,0)	0,15	26 (92,8)	2 (7,2)	0,85
Não claros	62	39 (62,9)	23 (37,1)		57 (91,9)	5 (8,1)	
<b>Cabelos</b>							
Claros	3	2 (66,7)	1 (33,3)	0,75	2 (66,7)	1 (33,3)	0,13
Não claros	87	50 (57,5)	37 (42,5)		79 (90,8)	8 (9,2)	
<b>Efélides</b>							
Sim	73	42 (57,5)	31 (42,5)	0,70	69 (94,5)	4 (5,5)	0,37
Não	56	34 (60,7)	22 (39,3)		50 (89,3)	6 (10,7)	
<b>Nevos</b>							
Sim	69	40 (58,0)	29 (42,0)	0,96	65 (94,2)	4 (5,8)	0,24
Não	66	38 (57,6)	28 (42,4)		58 (87,9)	8 (12,1)	
<b>Elastose solar</b>							
Ausência	26	17 (65,4)	9 (34,6)	0,73	24 (92,3)	2 (7,7)	0,88
Presença	72	44 (61,1)	28 (38,9)		66 (91,7)	6 (8,3)	
<b>Queimadura</b>							
Sim	39	25 (64,1)	14 (35,9)	0,51	36 (92,3)	3 (7,7)	0,99
Não	49	27 (55,1)	22 (44,9)		45 (91,8)	4 (8,2)	
<b>Bronzear</b>							
Sim	38	28 (73,7)	10 (23,3)	0,15	37 (97,4)	1 (2,6)	0,45
Não	28	15 (53,6)	13 (46,4)		26 (92,8)	2 (7,2)	
<b>Tabagismo</b>							
Sim	47	30 (63,8)	17 (36,2)	0,67	39 (83,0)	8 (17,0)	0,06
Não	89	50 (56,1)	39 (43,9)		85 (95,5)	4 (4,5)	

N: número de casos; ArgArg: genótipo homocigoto selvagem; ArgPro: genótipo heterocigoto; ProPro: genótipo homocigoto variante

Frequências similares dos genótipos isolados e combinados do polimorfismo *P53* Arg72Pro foram também observadas em pacientes com MC estratificados por cor da pele, olhos e cabelos, presença ou ausência de efélides, nevos e elastose solar, antecedente de queimadura, capacidade de bronzear-se e hábito de fumar.

### 3.3. Polimorfismo Arg72Pro e aspectos do tumor

As frequências do polimorfismo Arg72Pro do gene *P53* em pacientes estratificados por aspectos do tumor estão apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Frequências dos genótipos do polimorfismo Arg72Pro do gene *P53* em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por aspectos do tumor

Polimorfismo <i>P53</i> Arg72Pro							
Variável	N	ArgArg (%)	ProPro+ArgPro (%)	Valor <i>P</i>	ArgArg+ArgPro (%)	ProPro (%)	Valor <i>P</i>
<b>Localização</b>							
Axial	80	51 (63,7)	29 (36,3)	0,35	76 (95,0)	4 (5,0)	0,07
Membros	68	36 (52,9)	32 (47,1)		59 (86,7)	9 (13,3)	
<b>Breslow</b>							
> 1,5mm	66	39 (59,1)	27 (40,9)	0,76	62 (93,9)	4 (6,1)	0,27
≤ 1,5mm	75	43 (57,3)	32 (42,7)		67 (89,3)	8 (10,7)	
<b>Clark</b>							
I+II	47	26 (55,3)	21 (44,7)	0,67	40 (85,1)	7 (14,9)	0,08
III+IV+V	96	58 (60,4)	38 (39,6)		90 (93,7)	6 (6,3)	
<b>Estágios</b>							
<b>TNM</b>							
0+I+II	111	68 (61,3)	43 (38,7)	0,41	102 (91,9)	9 (8,1)	0,87
III+IV	36	19 (52,8)	17 (47,2)		32 (88,9)	4 (11,1)	

N: número de casos; ArgArg: genótipo homocigoto selvagem; ArgPro: genótipo heterocigoto; ProPro: genótipo homocigoto variante

Frequências similares dos genótipos isolados e combinados do polimorfismo *P53* Arg72Pro foram observadas em pacientes com MC estratificados por aspectos do tumor.

#### **4. Análises do gene *MDM2***

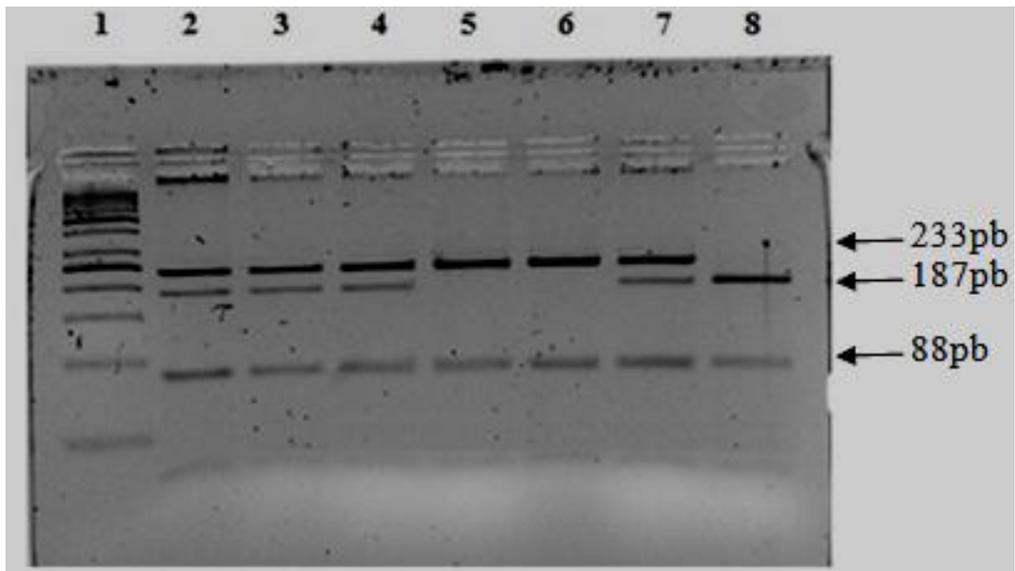
##### **4.1. Polimorfismo T309G em pacientes e controles**

As distribuições individualizadas dos pacientes com MC e controles de acordo com os genótipos do gene *MDM2* estão apresentadas nos Anexos 8 e 9.

Os grupos de pacientes e de controles estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2= 0,49$ ;  $P= 0,48$  e  $\chi^2= 0,001$ ;  $P= 0,97$ ) para o lócus do gene *MDM2*, respectivamente, sugerindo que não houve distribuição preferencial de algum dos genótipos avaliados no grupo de pacientes e controles utilizados no estudo.

Os genótipos do polimorfismo *MDM2* T309G em pacientes e controles estão apresentados na Figura 4.

As frequências do polimorfismo *MDM2* T309G em pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 10.



**Figura 4.** Produtos da digestão enzimática com a enzima *Msp*I para detecção dos genótipos do polimorfismo T309G do gene *MDM2* em pacientes com melanoma cutâneo e controles. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. Fragmentos de 233 e 187 pares de bases (pb) correspondem ao alelo selvagem T. Fragmentos de 187 e 88pb correspondem ao alelo variante G. O marcador do tamanho do DNA de 50pb, está apresentado na coluna 1. Nas colunas 2, 3, 4 e 7 estão apresentados resultados de indivíduos com o genótipo heterozigoto TG. Nas colunas 5 e 6 estão apresentados indivíduos com o genótipo homozigoto selvagem TT e na coluna 8 indivíduo com o genótipo homozigoto variante GG

**Tabela 10.** Frequências dos genótipos do polimorfismo T309G do gene *MDM2* em pacientes com melanoma cutâneo e em controles

<b>Polimorfismo T309G</b>	<b>Pacientes n (%)</b>	<b>Controles n (%)</b>	<b>Valor de P</b>	<b>OR* (IC 95%)</b>	<b>PA</b>
TT	55 (36,6)	58 (38,7)		Referência	
TG	75 (50,0)	71 (47,3)	0,63	1,13 (0,69-1,86)	8%
GG	20 (13,4)	21 (14,0)	0,82	0,92 (0,44-1,89)	4%
TT	55 (36,6)	58 (38,7)		Referência	
TG+GG	95 (63,4)	92 (61,3)	0,78	1,07 (0,66-1,72)	5%
TT+TG	130 (86,6)	129 (86,0)		Referência	
GG	20 (13,4)	21 (14,0)	0,65	0,85 (0,44-1,66)	7%

n: número de casos; TT: genótipo homozigoto selvagem; TG: genótipo heterozigoto; GG genótipo homozigoto variante; OR: razão das chances; IC: intervalo de confiança; \*OR: ajustada por idade, sexo e raça; PA: poder da análise

Frequências similares dos genótipos isolados e combinados do polimorfismo *MDM2* T309G foram observadas em pacientes e controles.

#### **4.2. Polimorfismo T309G e aspectos clínicos**

As frequências do polimorfismo *MDM2* T309G em pacientes estratificados pelos aspectos clínicos estão apresentadas nas Tabelas 11 e 12.

**Tabela 11** Frequências dos genótipos do polimorfismo T309G do gene *MDM2* em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por idade, sexo e raça

<b>Polimorfismo <i>MDM2</i> T309G</b>							
<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>TT (%)</b>	<b>GG+TG (%)</b>	<b>Valor P</b>	<b>TT+TG (%)</b>	<b>GG (%)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Idade (anos)</b>							
≤ 59	73	28 (38,3)	45 (61,7)	0,63	66 (90,0)	7 (10,0)	0,18
> 59	77	27 (35,0)	50 (65,0)		64 (83,1)	13 (16,9)	
<b>Sexo</b>							
Masculino	75	27 (36,0)	48 (64,0)	0,95	67 (89,3)	8 (10,7)	0,30
Feminino	75	28 (37,3)	47 (62,7)		63 (84,0)	12 (16,0)	
<b>Raça</b>							
Caucasóide	138	48 (34,8)	90 (65,2)	0,11	120 (86,9)	18 (13,1)	0,83
Negróide	12	7 (58,3)	5 (41,7)		10 (83,3)	2 (16,7)	

N: número de casos; TT: genótipo homozigoto selvagem; TG: genótipo heterozigoto; GG: genótipo homozigoto variante

Frequências similares dos genótipos do polimorfismo *MDM2* T309G foram observadas em pacientes estratificados por idade, sexo e raça.

**Tabela 12.** Frequências dos genótipos do polimorfismo T309G do gene *MDM2* em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por características da pele, olhos e cabelos e tabagismo

<b>Polimorfismo <i>MDM2</i> T309G</b>							
<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>TT (%)</b>	<b>GG+TG (%)</b>	<b>Valor P</b>	<b>TT+TG (%)</b>	<b>GG (%)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Pele</b>							
Clara	137	48 (35,0)	89 (65,0)	0,86	119 (86,8)	18 (13,2)	0,85
Não clara	11	6 (54,5)	5 (45,5)		9 (81,8)	2 (18,2)	
<b>Olhos</b>							
Claros	28	12 (42,8)	16 (57,2)	0,17	25 (89,3)	3 (10,7)	0,81
Não claros	62	20 (32,2)	42 (67,8)		53 (85,5)	9 (14,5)	
<b>Cabelos</b>							
Claros	3	2 (66,7)	1 (33,3)	0,25	2 (66,7)	1 (33,3)	0,38
Não claros	87	30 (34,5)	57 (65,5)		75 (86,2)	12 (13,8)	
<b>Efélides</b>							
Sim	73	21 (28,8)	52 (71,2)	0,19	63 (86,3)	10 (13,7)	0,76
Não	56	25 (44,6)	31 (55,4)		50 (89,3)	6 (10,7)	
<b>Nevos</b>							
Sim	69	23 (33,3)	46 (66,7)	0,79	55 (79,7)	14 (20,3)	<b>0,01</b>
Não	66	23 (34,8)	43 (65,2)		62 (93,9)	4 (6,1)	
<b>Exposição solar</b>							
Ausência	26	13 (50,0)	13 (50,0)	0,47	25 (96,1)	1 (3,9)	0,10
Presença	72	26 (36,1)	46 (63,9)		62 (86,1)	10 (13,9)	
<b>Queimadura</b>							
Sim	39	16 (41,0)	23 (59,0)	0,21	3 (7,7)	36 (92,3)	0,15
Não	49	15 (30,6)	34 (69,4)		10 (20,4)	39 (79,6)	
<b>Bronzear</b>							
Sim	38	10 (26,3)	28 (73,7)	0,16	33 (86,8)	5 (13,2)	0,77
Não	28	12 (42,8)	16 (57,2)		24 (85,7)	4 (14,3)	
<b>Tabagismo</b>							
Sim	47	15 (31,9)	32 (68,1)	0,49	39 (83,0)	8 (17,0)	0,28
Não	89	32 (35,9)	57 (64,1)		78 (87,6)	11 (12,4)	

N: número de casos; TT: genótipo homozigoto selvagem; TG: genótipo heterozigoto; GG: genótipo homozigoto variante

Frequências similares dos genótipos isolados e combinados do polimorfismo *MDM2* T309G foram observadas em pacientes estratificados por características da pele, olhos e cabelos e tabagismo. Apenas a frequência do genótipo homozigoto variante GG foi maior em pacientes com a presença de nevos melanocíticos do que em pacientes sem nevos melanocíticos.

#### 4.3. Polimorfismo T309G e aspectos do tumor

As frequências do polimorfismo *MDM2* T309G em pacientes estratificados por aspectos do tumor estão apresentadas na Tabela 13.

**Tabela 13.** Frequências dos genótipos do polimorfismo *MDM2* T309G em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por aspectos do tumor

Polimorfismo <i>MDM2</i> T309G							
Variável	N	TT (%)	GG+TG (%)	Valor P	TT+TG (%)	GG (%)	Valor P
<b>Localização</b>							
Axial	80	29 (36,2)	51 (63,8)	0,74	69 (86,2)	11 (13,8)	0,85
Membros	68	25 (36,7)	43 (63,3)		59 (86,8)	9 (13,2)	
<b>Breslow</b>							
> 1,5mm	66	43 (65,1)	23 (34,9)	0,80	59 (89,4)	7 (10,6)	0,39
≤1,5mm	75	47 (62,7)	28 (37,3)		64 (85,3)	11 (14,6)	
<b>Clark</b>							
I+II	47	17 (36,2)	30 (63,8)	0,87	41 (87,3)	6 (12,7)	0,79
III+IV+V	96	36 (37,5)	60 (62,5)		83 (86,5)	13 (13,5)	
<b>Estágios TNM</b>							
0+I+II	111	40 (36,0)	71 (64,0)	0,92	96 (88,5)	15 (13,5)	0,83
III+IV	36	15 (41,7)	21 (58,3)		31 (86,1)	5 (13,9)	

N: número de casos; TT: genótipo homozigoto selvagem; TG: genótipo heterozigoto; GG: genótipo homozigoto variante

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências dos genótipos do polimorfismo *MDM2* T309G em pacientes com MC estratificados por aspectos do tumor.

## **5. Análises do gene *BCL2***

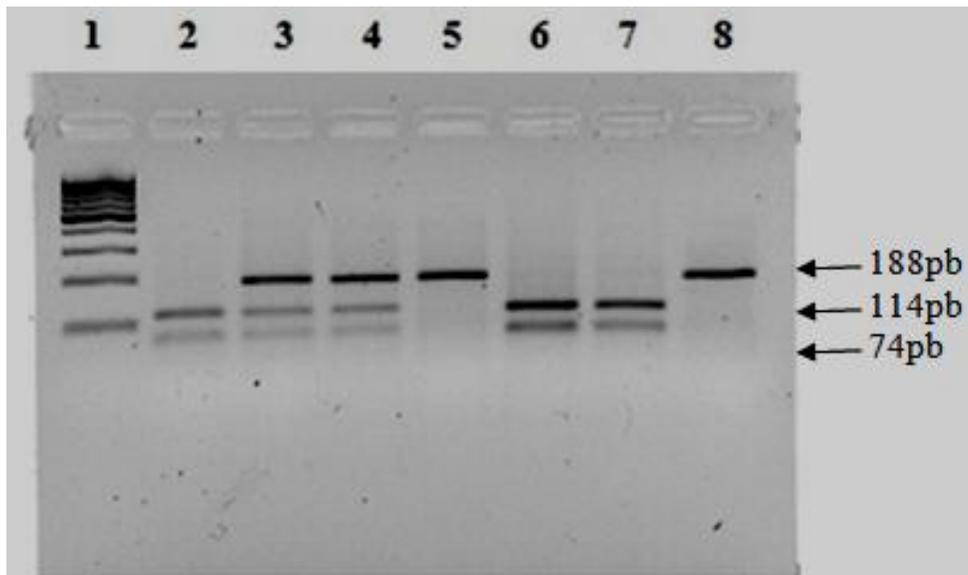
### **5.1. Polimorfismo C(-938)A em pacientes e controles**

As distribuições individualizadas dos pacientes com MC e controles, de acordo com os genótipos do gene *BCL2*, estão apresentadas nos Anexos 8 e 9.

Os grupos de pacientes e de controles estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2= 0,22$ ;  $P= 0,66$  e  $\chi^2= 2,06$ ;  $P= 0,15$ ) para o locus do gene *BCL2*, respectivamente, sugerindo que não houve distribuição preferencial de algum dos genótipos avaliados no grupo de pacientes e controles utilizados no estudo.

Os genótipos do polimorfismo *BCL2* C(-938)A em pacientes e controles estão apresentados na Figura 5.

As frequências dos genótipos do polimorfismo *BCL2* C(-938)A em pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 14.



**Figura 5.** Produtos da digestão enzimática com a enzima *BclI* para detecção dos genótipos do polimorfismo C(-938)A do gene *BCL2* em pacientes com MC e controles. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. Fragmentos de 114 e 74 pares de bases (pb) correspondem ao alelo selvagem C e fragmentos de 188pb correspondem ao alelo variante A. O marcador do tamanho do DNA de 100pb está apresentado na coluna 1. Nas colunas 2, 6 e 7 estão apresentados resultados de indivíduos com o genótipo homozigoto selvagem CC, nas colunas 3 e 4 estão apresentados os resultados de indivíduos com o genótipo heterozigoto CA e nas colunas 5 e 8 estão apresentados os resultados obtidos de indivíduos com o genótipo homozigoto selvagem AA

**Tabela 14.** Frequências dos genótipos do polimorfismo *BCL2* C(-938)A em pacientes com melanoma cutâneo e em controles

<b>Polimorfismo C(-938)A</b>	<b>Pacientes n (%)</b>	<b>Controles n (%)</b>	<b>Valor de P</b>	<b>OR* (IC 95%)</b>	<b>PA</b>
CC	36 (24,0)	45 (30,0)		Referência	
CA	72 (48,0)	82 (54,7)	0,80	1,07 (0,61-1,86)	5%
AA	42 (28,0)	23 (15,3)	<b>0,004</b>	<b>2,87 (1,40-5,90)</b>	<b>97%</b>
CC	36 (24,0)	45 (30,0)		Referência	
CA+AA	114 (76,0)	105 (70,0)	0,23	1,37 (0,82-2,30)	23%
CC+CA	108 (72,0)	127 (84,7)		Referência	
AA	42 (28,0)	23 (15,3)	<b>0,006</b>	<b>2,24 (1,25-4,00)</b>	<b>81%</b>

n: número de casos; CC: genótipo homozigoto selvagem; CA: genótipo heterozigoto; AA genótipo homozigoto variante; OR: razão das chances; IC: intervalo de confiança; \*OR: ajustada por idade, sexo e raça; PA: poder da análise

A frequência do genótipo homozigoto variante AA foi maior em pacientes do que em controles quando avaliados isoladamente (28,0% versus 15,3%,  $P= 0,004$ , PA: 97%). Indivíduos com esse genótipo estiveram sob risco de 2,87 vezes maior de ocorrência da doença do que os indivíduos com os demais genótipos.

## 5.2. Polimorfismo C(-938)A e aspectos clínicos

As frequências do polimorfismo C(-938)A do gene *BCL2* em pacientes e controles estratificados pelos aspectos clínicos estão apresentadas na Tabela 15 e 16.

**Tabela 15.** Frequências dos genótipos do polimorfismo *BCL2* C(-938)A em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por idade, sexo e raça

<b>Polimorfismo <i>BCL2</i> C(-938)A</b>							
<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>CC (%)</b>	<b>AA+CA (%)</b>	<b>Valor P</b>	<b>CC+CA (%)</b>	<b>AA (%)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Idade (anos)</b>							
≤ 59	73	17 (23,3)	56 (72,7)	0,79	21 (28,7)	52 (71,3)	0,77
> 59	77	19 (24,7)	58(75,3)		21 (27,3)	56 (72,7)	
<b>Sexo</b>							
Masculino	75	14 (18,6)	61 (81,4)	0,13	21 (28,0)	54 (72,0)	0,99
Feminino	75	22 (29,3)	53 (70,7)		21 (28,0)	54 (72,0)	
<b>Raça</b>							
Caucasóide	138	32 (23,1)	106 (76,9)	0,49	102 (73,9)	36 (26,1)	0,08
Negróide	12	4 (33,3)	8 (66,7)		6 (50,0)	6 (50,0)	

N: número de casos; CC: genótipo homozigoto selvagem; CA: genótipo heterozigoto; AA: genótipo homozigoto variante

Frequências similares dos genótipos do polimorfismo *BCL2* C(-938)A foram observadas em pacientes estratificados por idade, sexo e raça.

**Tabela 16.** Frequências dos genótipos do polimorfismo *BCL2* C(-938)A em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por características da pele, olhos e cabelos e tabagismo

<b>Polimorfismo <i>BCL2</i> C(-938)A</b>							
<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>CC (%)</b>	<b>AA+CA (%)</b>	<b>Valor P</b>	<b>CC+CA (%)</b>	<b>AA (%)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Pele</b>							
Clara	137	32 (23,3)	105 (76,6)	0,66	100 (73,0)	37 (27,0)	0,82
Não clara	11	4 (36,4)	7 (63,6)		6 (54,5)	5 (45,5)	
<b>Olhos</b>							
Claros	28	5 (17,8)	23 (82,2)	0,91	19 (67,8)	9 (32,2)	0,47
Não claros	62	15 (24,2)	47 (75,8)		45 (72,6)	17 (27,4)	
<b>Cabelos</b>							
Claros	3	1 (33,3)	2 (66,7)	0,70	2 (66,7)	1 (33,3)	0,82
Não claros	87	21 (24,1)	66 (75,9)		63 (72,4)	24 (27,6)	
<b>Efélides</b>							
Sim	73	20 (27,4)	53 (72,6)	0,80	51 (69,9)	22 (30,1)	0,23
Não	56	14 (25,0)	42 (75,0)		42 (75,0)	14 (25,0)	
<b>Nevos</b>							
Sim	69	15 (21,7)	54 (78,3)	0,37	46 (66,7)	23 (33,3)	0,19
Não	66	19 (28,8)	47 (71,2)		51 (77,3)	15 (22,7)	
<b>Elastose solar</b>							
Ausência	26	10 (38,5)	16 (61,5)	0,28	18 (69,2)	8 (30,8)	0,72
Presença	72	18 (25,0)	54 (75,0)		55 (76,4)	17 (23,6)	
<b>Queimadura</b>							
Sim	39	9 (23,0)	30 (77,0)	0,81	28 (71,8)	11 (28,2)	0,96
Não	49	11 (22,4)	38 (77,6)		35 (71,4)	14 (28,6)	
<b>Bronzear</b>							
Sim	38	7 (18,4)	31 (81,6)	0,53	26 (68,4)	12 (31,6)	0,23
Não	28	8 (28,6)	20 (71,4)		22 (78,6)	6 (21,4)	
<b>Tabagismo</b>							
Sim	47	11 (23,4)	36 (76,6)	0,84	35 (74,5)	12 (25,5)	0,99
Não	89	24 (26,9)	65 (73,1)		66 (74,1)	23 (25,9)	

N: número de casos; CC: genótipo homocigoto selvagem; CA: genótipo heterocigoto; AA: genótipo homocigoto variante

Frequências similares dos genótipos do polimorfismo *BCL2* C(-938)A em pacientes estratificados por características da pele, olhos e cabelos e tabagismo.

### 5.3. Polimorfismo C(-938)A e aspectos do tumor

As frequências do polimorfismo C(-938)A do gene *BCL2* em pacientes estratificados por aspectos anatomopatológico do tumor estão apresentadas na Tabela 17.

**Tabela 17.** Frequências do polimorfismo C(-938)A do gene *BCL2* em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por aspectos do tumor

<b>Polimorfismo <i>BCL2</i> C(-938)A</b>							
<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>CC (%)</b>	<b>AA+CA (%)</b>	<b>Valor P</b>	<b>CC+CA (%)</b>	<b>AA (%)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Localização</b>							
Axial	80	16 (20,0)	64 (80,0)	0,45	57 (71,2)	23 (28,8)	0,44
Membros	68	19 (27,9)	49 (72,1)		50 (73,5)	18 (26,5)	
<b>Breslow</b>							
>1,5mm	66	16 (24,2)	50 (75,8)	0,96	46 (69,7)	20 (30,3)	0,43
≤1,5mm	75	18 (24,0)	57 (76,0)		56 (74,6)	19 (25,4)	
<b>Clark</b>							
I+II	47	14 (29,8)	33 (70,2)	0,36	37 (78,7)	10 (21,3)	0,20
III+IV+V	96	21 (21,9)	75 (78,1)		66 (68,7)	30 (31,3)	
<b>Estágios TNM</b>							
0+I+II	111	27 (24,3)	84 (75,7)	0,76	81 (73,0)	30 (27,0)	0,81
III+IV	36	8 (22,2)	28 (77,8)		24 (66,7)	12 (33,3)	

N: número de casos; CC: genótipo homozigoto selvagem; CA: genótipo heterozigoto; AA: genótipo homozigoto variante

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências do polimorfismo C(-938)A do gene *BCL2* em pacientes estratificados por aspectos do tumor.

## **6. Análises do gene *BAX***

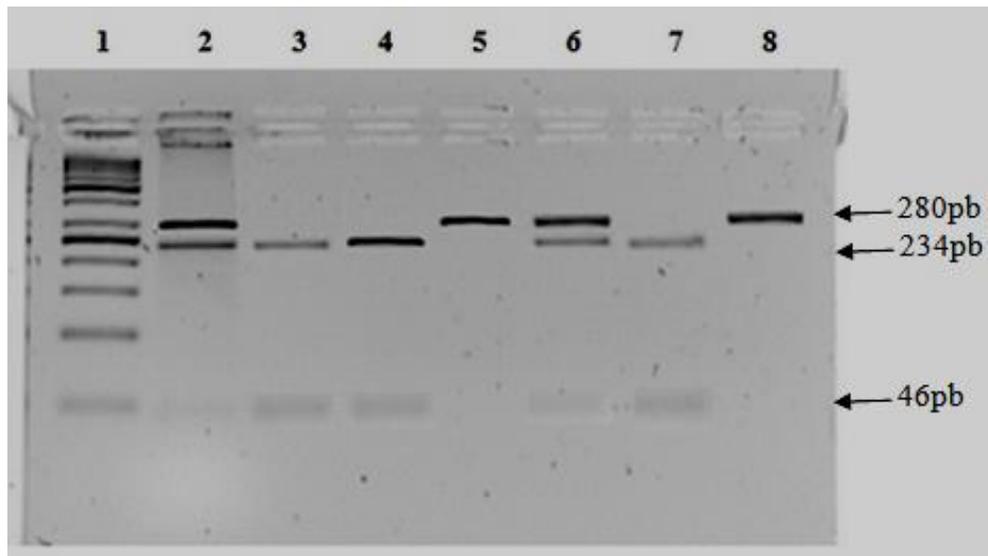
### **6.1. Polimorfismo G(-248)A em pacientes e controles**

As distribuições individualizadas dos pacientes com MC e controles, de acordo com os genótipos do gene *BAX*, estão apresentadas nos Anexos 8 e 9.

Os grupos de pacientes e de controles estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2= 1,85$ ;  $P= 0,17$  e  $\chi^2= 2,78$ ;  $P= 0,24$ ) para o locus do gene *BAX*, respectivamente, sugerindo que não houve distribuição preferencial de algum dos genótipos avaliados no grupo de pacientes e controles utilizados no estudo.

Os genótipos do polimorfismo *BAX* G(-248)A em pacientes e controles estão apresentados na Figura 6.

As frequências dos genótipos do polimorfismo *BAX* G(-248)A em pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 18.



**Figura 6.** Produtos da digestão enzimática com a enzima *TauI* para detecção do genótipo do polimorfismo G(-248)A do gene *BAX* em pacientes com melanoma cutâneo e controles. Gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. Fragmentos de 234 e 46 pares de bases (pb) correspondem ao alelo selvagem G e fragmentos de 280pb correspondem ao alelo variante A. O marcador do tamanho do DNA de 50pb está apresentado na coluna 1. Na coluna 2 e 6 estão apresentados resultados de indivíduos com o genótipo heterozigoto GA, nas colunas 3, 4 e 7 estão apresentados os resultados de indivíduos com o genótipo homozigoto selvagem GG e nas colunas 5 e 8 estão apresentados os resultados obtidos de indivíduos com o genótipo homozigoto variante AA

**Tabela 18.** Frequências dos genótipos do polimorfismo *BAX* G(-248)A em pacientes com melanoma cutâneo e em controles

<b>Polimorfismo G(-248)A</b>	<b>Pacientes n (%)</b>	<b>Controles n (%)</b>	<b>Valor de P</b>	<b>OR* (IC 95%)</b>	<b>PA</b>
GG	120 (80,0)	114 (76,0)		Referência	
GA	30 (20,0)	35 (23,3)	0,49	0,82 (0,47-1,43)	6%
AA	0 (0,0)	1 (0,7)	1,00	§	§
GG	120 (80,0)	114 (76,0)		Referência	
GA+AA	30 (20,0)	36 (24,0)	0,44	0,80 (0,46-1,40)	12%
GG+GA	150 (100,0)	149 (99,3)	1,00	Referência	§
AA	0 (0,0)	1 (0,7)	1,00	§	

n: número de casos; GG: genótipo homocigoto selvagem; GA: genótipo heterocigoto; AA genótipo homocigoto variante; OR: razão das chances; IC: intervalo de confiança; \*OR: ajustada por idade, sexo e raça; PA: poder da análise; § valor não calculado

Não foram observadas diferenças nas frequências dos genótipos isolados ou combinados entre pacientes e controles. Riscos similares de ocorrência foram observados em indivíduos com os distintos genótipos.

## **6.2. Polimorfismo G(-248)A e aspectos clínicos**

As frequências dos genótipos do polimorfismo G(-248)A do gene *BAX* em pacientes e controles estratificados pelos aspectos clínicos estão apresentadas na Tabela 19 e 20.

**Tabela 19.** Frequências do polimorfismo *BAX* G(-248)A em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por idade, sexo e raça

<b>Polimorfismo <i>BAX</i> G(-248)A</b>				
<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>GG (%)</b>	<b>AA+GA (%)</b>	<b>Valor de <i>P</i></b>
<b>Idade (anos)</b>				
≤ 59	73	58 (79,4)	15 (20,6)	0,87
> 59	77	62(80,5)	15 (19,5)	
<b>Sexo</b>				
Masculino	75	61 (81,3)	14 (18,7)	0,70
Feminino	75	59 (78,6)	16 (21,4)	
<b>Raça</b>				
Caucasóide	138	111 (80,4)	27 (19,6)	0,66
Negróide	12	9 (75,0)	3 (25,0)	

N: número de casos; GG: genótipo homocigoto selvagem; GA: genótipo heterocigoto; AA: genótipo homocigoto variante. A combinação dos genótipos GG+GA *versus* AA não foi possível de ser avaliada pela ausência de pacientes com o genótipo homocigoto variante AA

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências do polimorfismo do gene *BAX* G(-248)A em pacientes, em relação à idade, ao sexo e a raça.

**Tabela 20.** Frequências do polimorfismo *BAX G(-248)A* em pacientes estratificados por características da pele, olhos e cabelos e tabagismo

<b>Polimorfismo <i>BAX G(-248)A</i></b>				
<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>GG (%)</b>	<b>AA+GA (%)</b>	<b>Valor de <i>P</i></b>
<b>Pele</b>				
Clara	137	26 (18,9)	111 (81,0)	0,66
Não clara	11	3 (27,3)	8 (72,7)	
<b>Olhos</b>				
Claros	28	4 (14,3)	24 (85,7)	0,41
Não claros	62	14 (22,6)	48 (77,4)	
<b>Cabelos</b>				
Claros	3	2 (66,7)	1 (33,3)	0,08
Não claros	87	17 (19,5)	70 (80,5)	
<b>Efélides</b>				
Sim	73	16 (21,9)	57 (78,1)	0,51
Não	56	10 (17,8)	46 (82,2)	
<b>Nevos</b>				
Sim	69	56 (81,1)	13 (18,9)	0,73
Não	66	52 (78,8)	14 (21,2)	
<b>Elastose solar</b>				
Ausência	26	18 (69,2)	8 (30,8)	0,37
Presença	72	60 (83,3)	12 (16,7)	
<b>Queimadura solar</b>				
Sim	39	30 (76,9)	9 (23,1)	0,68
Não	49	39 (79,6)	10 (20,4)	
<b>Bronzear</b>				
Sim	38	32 (84,2)	6 (15,8)	0,22
Não	28	20 (71,4)	8 (28,6)	
<b>Tabagismo</b>				
Sim	47	39 (83,0)	8 (17,0)	0,51
Não	89	69 (77,5)	20 (22,5)	

N: número de casos; GG: genótipo homocigoto selvagem; GA: genótipo heterocigoto; AA: genótipo homocigoto variante. A combinação dos genótipos GG+GA *versus* AA não foi possível de ser avaliada pela ausência de pacientes com o genótipo homocigoto variante AA

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências do polimorfismo G(-248)A do gene *BAX* em pacientes com MC, em relação aos aspectos clínicos e hábitos.

### 6.3. Polimorfismo G(-248)A e aspectos do tumor

As frequências dos genótipos do polimorfismo G(-248)A do gene *BAX* em pacientes estratificados por aspectos anatomopatológico do tumor estão apresentadas na Tabela 21.

**Tabela 21.** Frequências do polimorfismo *BAX* G(-248)A em pacientes com melanoma cutâneo estratificados por aspectos do tumor

<b>Polimorfismo <i>BAX</i> G(-248)A</b>				
<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>GG (%)</b>	<b>AA+GA (%)</b>	<b>Valor P</b>
<b>Localização</b>				
Axial	80	66 (82,5)	14 (17,5)	0,46
Membros	68	52 (76,5)	16 (23,5)	
<b>Breslow</b>				
>1,5mm	66	55 (83,3)	11 (16,7)	0,49
≤1,5mm	75	59 (78,7)	16 (21,3)	
<b>Clark</b>				
I+II	47	36 (76,6)	11 (23,4)	0,39
III+IV+V	96	80 (83,3)	16 (16,7)	
<b>Estadiamento clínico</b>				
0+I+II	111	87 (78,4)	24 (21,6)	0,27
III+IV	36	31 (86,1)	5 (13,9)	

N: número de casos; GG: genótipo homocigoto selvagem; GA: genótipo heterocigoto; AA: genótipo homocigoto variante. A combinação dos genótipos GG+GA *versus* AA não foi possível de ser avaliada pela ausência de pacientes com o genótipo homocigoto variante AA

Não foram observadas diferenças significativas entre as frequências dos genótipos do polimorfismo G(-248)A do gene *BAX* em pacientes com MC estratificados por aspectos do tumor.

#### **7. Combinação dos polimorfismos dos genes *P53*, *MDM2*, *BCL2* e *BAX***

As frequências dos genótipos dos polimorfismos gênicos associados dois a dois em pacientes e controles estão apresentadas na Tabela 22.

**Tabela 22.** Frequências dos genótipos combinados dos polimorfismos *P53* Arg72Pro, *MDM2* T309G, *BCL2* C(-938)A e *BAX* G(-248)A em pacientes com melanoma cutâneo e em controles

<b>Polimorfismos Combinados</b>	<b>Pacientes n (%)</b>	<b>Controles n (%)</b>	<b>Valor de P</b>	<b>OR* (IC 95%)</b>	<b>PA†</b>
<b><i>P53 + MDM2</i></b>					
ArgArg+GG	15 (20,8)	15 (16,3)	0,43	1,38 (0,62-3,11)	20%
ProPro+ArgPro + TT+TG	57 (79,2)	77 (83,7)			
ArgArg+ArgPro + TG+GG	85 (96,6)	85 (90,4)	0,11	3,28 (0,77-14,00)	60%
ProPro + TT	3 (3,4)	9 (9,6)			
<b><i>P53+BCL2</i></b>					
ArgArg+AA	26 (36,1)	14 (16,9)	<b>0,002</b>	<b>3,43 (1,28-7,47)</b>	<b>99%</b>
ProPro+ArgPro + CC+CA	46 (63,9)	74 (84,1)			
ArgArg+ArgPro + AA+CA	104 (97,2)	97 (92,4)	0,11	3,14 (0,76-12,92)	50%
ProPro + CC	3 (2,8)	8 (7,6)			
<b><i>P53 + BAX</i></b>					
ArgArg+AA	26 (29,5)	15 (15,3)	<b>0,008</b>	<b>2,71 (1,29-5,70)</b>	<b>95%</b>
ProPro+ArgPro + GG+GA	62 (70,5)	83 (84,7)			
ArgArg+ArgPro + AA+GA	27 (73,0)	30 (75,0)	0,95	0,96 (0,33-2,84)	<1%
ProPro + GG	10 (27,0)	10 (25,0)			
<b><i>MDM2 + BCL2</i></b>					
GG + AA	8 (7,7)	4 (3,5)	0,19	2,28 (0,65-7,96)	35%
TT+TG + CC+CA	96 (92,3)	110 (96,5)			
GG+TG + AA+CA	68 (88,3)	67 (77,0)	0,07	2,23 (0,92-5,43)	75%
TT + CC	9 (11,7)	20 (23,0)			
<b><i>MDM2 + BAX</i></b>					
GG + AA	0 (0,0)	0 (0,0)			
TT+TG + GG+GA	130 (100,0)	128 (100,0)	§	§	
GG+TG + AA+GA	17 (28,8)	19 (47,5)	0,77	0,89 (0,40-1,98)	7%
TT + GG	42 (71,2)	41 (52,5)			
<b><i>BCL2 + BAX</i></b>					
AA + AA	0 (0,0)	0 (0,0)	§	§	
CC+CA + GG+GA	108 (100,0)	126 (100,0)			
AA+CA + AA+GA	23 (44,2)	29 (43,3)	0,94	0,97 (0,46-2,06)	<1%
CC + GG	29 (55,8)	38 (56,7)			

ArgArg, TT, CC GG: genótipos homocigotos selvagem; ProPro, GG, AA, AA: genótipos homocigotos variante para os genes *P53*, *MDM2*, *BCL2* e *BAX*; OR: razão das chances; IC: intervalo de confiança; \*OR: ajustada por idade, sexo e raça; PA: poder da análise; §: não calculado

Observamos que a frequência do genótipo combinado *P53* ArgArg e *BCL2* AA foi maior em pacientes do que em controles (36,1% versus 16,9%;  $P= 0,002$ ; PA: 99%). Indivíduos com os respectivos genótipos estiveram sob risco de 3,43 vezes maior de ocorrência da doença do que aqueles com os demais genótipos.

Os genótipos combinados *P53* ArgArg e *BAX* AA também foram maiores em pacientes do que em controles (29,5% versus 15,3%;  $P= 0,008$ ; PA: 95%). Indivíduos com os respectivos genótipos estiveram sob risco de 2,71 vezes maior de ocorrência da doença do que indivíduos com os demais genótipos.

### **7.1. Genótipos combinados em pacientes por aspectos clínicos e do tumor**

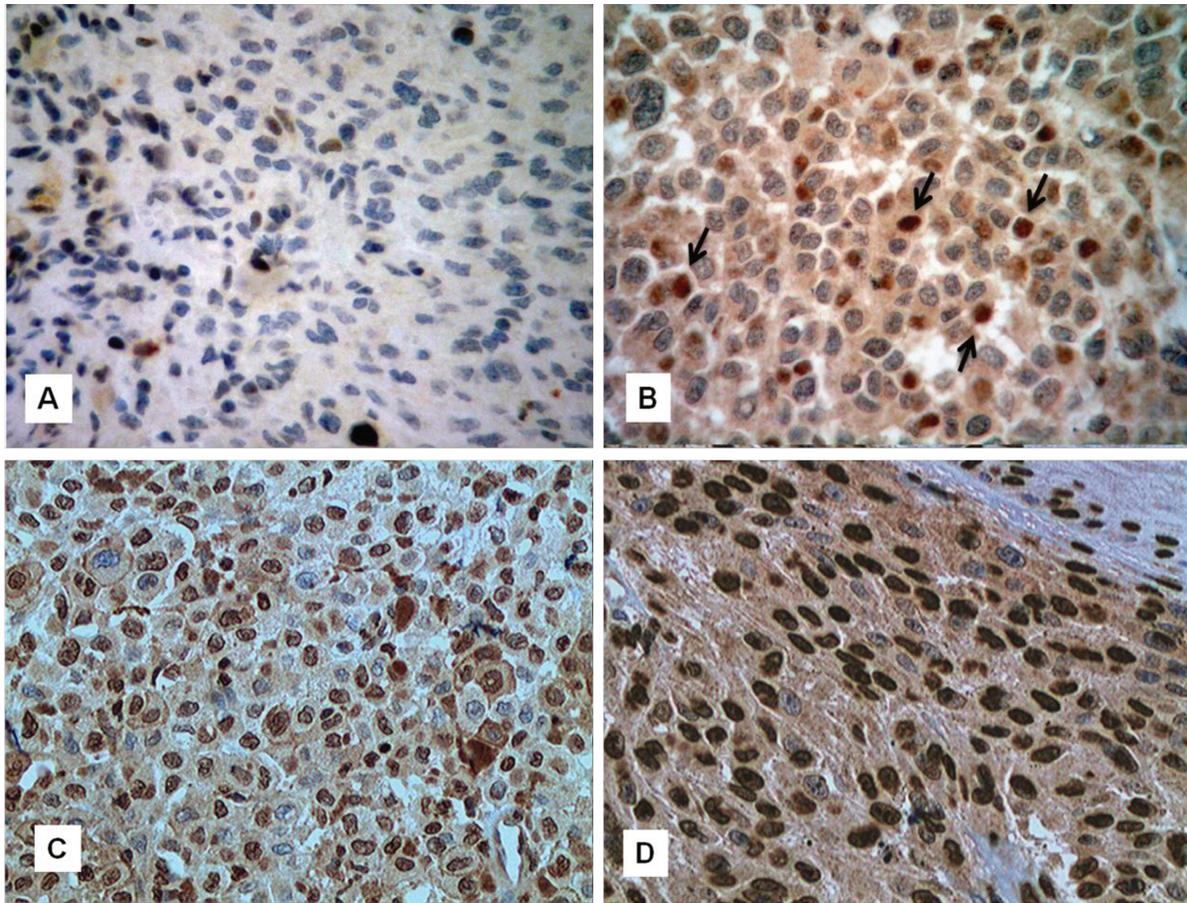
Observamos que a frequência dos genótipos combinados *P53* ArgArg e *MDM2* GG foi maior em pacientes com nevos melanocíticos do que em pacientes sem nevos melanocíticos (30,7% versus 7,1%;  $P= 0,02$ ).

Frequências similares das demais combinações de genótipos foram observadas em pacientes estratificados por aspectos clínicos e do tumor.

## **8. Expressão da proteína mdm2**

A expressão da proteína mdm2 foi avaliada em 59 pacientes com MC (Figura 7).

As distribuições individualizadas dos pacientes de acordo com a intensidade da expressão, percentual de células com expressão da proteína e o escore final de expressão da proteína estão apresentadas no Anexo 8. Já as frequências dos genótipos do polimorfismo *MDM2* T309G em pacientes estratificados por variáveis de expressão proteica estão apresentadas nas Tabelas 23 a 25.



**Figura 7.** Expressão da proteína mdm2 em células de melanoma cutâneo por imunohistoquímica e utilizando o anticorpo *Mouse Monoclonal Antibody MDM2 protein* (Novocastra™) **A:** negativo; **B:** coloração fraca, núcleos raros (setas); **C:** coloração moderada na maioria dos núcleos; **D:** coloração intensa. Ampliação original **A:** 400x; **B, C** e **D:** 640x

**Tabela 23.** Frequências dos genótipos do polimorfismo T309G do gene *MDM2* em pacientes com melanoma cutâneo estratificados pela intensidade de expressão da proteína mdm2

Polimorfismo <i>MDM2</i> T309G							
Intensidade Coloração	Nº	TT (%)	TG+GG (%)	P valor	TT+TG (%)	GG (%)	P valor
Grau 0	5	1 (20,0)	4 (80,0)	Ref.	4 (80,0)	1 (20,0)	Ref.
Grau 1	4	0 (0,0)	4 (100,0)	1,00	3 (75,0)	1 (25,0)	1,00
Grau 2	18	12 (66,7)	6 (33,3)	0,12	16 (88,9)	2 (11,1)	0,53
Grau 3	32	12 (37,5)	20 (62,5)	0,63	27 (84,4)	5 (15,6)	1,00
Grau 0	5	1 (20,0)	4 (80,0)	Ref.	4 (80,0)	1 (20,0)	Ref.
Graus 1+2+3	54	24 (44,4)	30 (55,6)	0,38	46 (85,2)	8 (14,8)	0,57
Graus 0+1	9	1 (12,5)	8 (87,5)	Ref.	7 (77,8)	2 (22,2)	Ref.
Graus 2+3	50	24 (48,0)	26 (52,0)	0,06	43 (86,0)	7 (14,0)	0,61

Grau 0: ausência de coloração (negativo); Grau 1: intensidade fraca; Grau 2: intensidade moderada; Grau 3: intensidade acentuada; N: número de indivíduos; TT: genótipo homocigoto selvagem; TG: genótipo heterocigoto; GG: genótipo homocigoto variante

Observamos frequências similares quando comparamos a intensidade da marcação do anticorpo em células positivas para a expressão da proteína mdm2 nos diferentes genótipos para os polimorfismos do gene *MDM2* T309G.

**Tabela 24.** Frequências dos genótipos do polimorfismo T309G do gene *MDM2* em pacientes com melanoma cutâneo estratificados pela porcentagem das células que expressam a proteína mdm2

Polimorfismo <i>MDM2</i> T309G							
Porcentagem	Nº	TT (%)	TG+GG (%)	P valor	TT+TG (%)	GG (%)	P valor
Grau 0	5	1 (20,0)	4 (80,0)	Ref.	4 (80,0)	1 (20,0)	Ref.
Grau 1	2	0 (0,0)	2 (100,0)	1,00	1 (50,0)	1 (50,0)	1,00
Grau 2	3	0 (0,0)	3 (100,0)	1,00	3 (100,0)	0 (0,0)	1,00
Grau 3	2	2 (100,0)	0 (0,0)	0,14	2 (100,0)	0 (0,0)	1,00
Grau 4	47	22 (46,8)	25 (53,2)	0,36	40 (85,1)	7 (14,9)	1,00
Grau 0	5	1 (20,0)	4 (80,0)	Ref.	4 (80,0)	1 (20,0)	Ref.
Graus 1+2+3+4	54	24 (44,4)	30 (55,6)	0,38	46 (85,2)	8 (14,8)	0,57
Graus 0+1	7	1 (14,3)	6 (85,7)	Ref.	5 (71,4)	2 (28,6)	Ref.
Graus 2+3+4	52	24 (46,1)	28 (53,9)	0,22	45 (86,5)	7 (13,5)	0,28

Grau 0: ausência de células positivas ; Grau 1: <10% células positivas; Grau 2: 10 a 40% células positivas; Grau 3: 40 a 70% células positivas; Grau 4: >70% células positivas; N: número de indivíduos; TT: genótipo homocigoto selvagem; TG: genótipo heterocigoto; GG: genótipo homocigoto variante

**Tabela 25.** Frequências dos genótipos do polimorfismo T309G do gene *MDM2* em pacientes com melanoma cutâneo estratificados pelo escore final de expressão da proteína mdm2

<b>Polimorfismo <i>MDM2</i> T309G</b>							
<b>Escore Final</b>	<b>Nº</b>	<b>TT (%)</b>	<b>TG+GG (%)</b>	<b>Valor P</b>	<b>TT+TG (%)</b>	<b>GG (%)</b>	<b>Valor P</b>
<b>0-2 (Negativo)</b>	7	1 (14,3)	6 (85,7)	Ref.	5 (71,4)	2 (28,6)	Ref.
<b>3-7</b>	52	24 (46,1)	28 (53,9)	0,22	45 (86,5)	7 (13,5)	0,28
<b>0-3 (Negativo)</b>	8	1 (12,5)	7 (87,5)	Ref.	6 (75,0)	2 (25,0)	Ref.
<b>4-7</b>	51	24 (47,0)	27 (53,0)	0,12	44 (86,3)	7 (13,7)	0,59

Escore final: somatória dos graus de intensidade e graus de porcentagem de células marcadas. Nº: número de indivíduos; TT: genótipo homocigoto selvagem; TG: genótipo heterocigoto; GG: genótipo homocigoto variante

Observamos expressões similares da proteína mdm2 em pacientes estratificados por genótipos do polimorfismo *MDM2* T309G.

# **DISCUSSÃO**

---



A incidência do MC aumenta rapidamente, superando qualquer outro tipo de câncer (SCHAFFER *et al.*, 2004; GODAR *et al.*, 2011). O MC é um tumor com altas taxas de mortalidade devido ao seu potencial metastático e ausência de resposta ao tratamento. Além disso, vários de seus aspectos, como a etiologia e a fisiopatologia, ainda estão por serem determinados com exatidão, o que justificou a realização desse estudo.

O rápido crescimento da incidência do MC está possivelmente relacionado à combinação dos seguintes fatores: maior exposição da pele aos raios UV da luz solar, à depleção da camada de ozônio e aumento da longevidade com deficiências nos sistemas de reparo e de indução de apoptose (RAUTERBERG & JUNG, 1993; FEARS *et al.*, 2002).

Quando os nossos pacientes com MC foram distribuídos por idade, observou-se que a idade mediana foi de 59 anos, à semelhança de dados brasileiros (NASER, 2011) e de outros países (JEMAL *et al.*, 2004; BALCH *et al.*, 2001).

A distribuição dos nossos pacientes por sexo foi idêntica entre homens e mulheres. No entanto, o tumor habitualmente é mais comum em homens (MACKIE *et al.*, 2009; TUCKER, 2009; JEMAL *et al.*, 2012). A incidência do MC triplicou entre os homens (corresponde ao quinto tumor masculino) e duplicou entre as mulheres (corresponde ao sétimo tumor feminino) (SCHAFFER *et al.*, 2004; JEMAL *et al.*, 2012). O aumento da incidência do tumor em mulheres parece ter relação com hormônios reprodutivos, uma vez que ocorre aumento de pigmentação da pele e maior propensão ao desenvolvimento de nevos durante a gravidez (LEA *et al.*, 2007).

A distribuição dos nossos pacientes por raça mostrou que a doença ocorreu predominantemente em caucasóides, de forma semelhante às descrições obtidas em outros estudos (MACKIE *et al.*, 2009, SHOO *et al.*, 2009, TUCKER *et al.*, 2009, WHITEMAN *et al.*, 2011), incluindo estudos epidemiológicos brasileiros (NASER, 2011; MORENO *et al.*,

2012). Já é bem conhecido o fato de que indivíduos de pele escura têm menor propensão para MC, pois o pigmento melanina protege dos efeitos deletérios dos raios UV da luz solar (KANAVY & GERSTEINBLITH, 2011). Indivíduos de pele escura, em geral, apresentam o tumor em regiões não pigmentadas da pele, como as regiões palmo-plantares (SHOO *et al.*, 2009). Assim, o MC é uma doença que predomina em caucasóides devido a pele clara, o que explica as elevadas taxas principalmente em países como Estados Unidos e Austrália e na Europa (MACKIE *et al.*, 2009, WHITEMAN *et al.*, 2011). Entretanto, vale comentar que a população brasileira é altamente heterogênea e composta predominantemente por indivíduos miscigenados (PENA *et al.*, 2011), o que não nos permite afirmar com precisão a origem étnica de nosso pacientes e controles.

Observamos que a maior parte dos nossos pacientes apresentaram pele clara, olhos e cabelos escuros. Entre as características fenotípicas mais comuns de portadores de MC estão a de pele clara, olhos claros (verdes e azuis) e cabelos claros (loiro e ruivo) (GANDINI *et al.*, 2005). Indivíduos com perfil “claro” para pele, olhos e cabelo, são considerados mais fotossensíveis do que indivíduos com perfil “não claro” para pele, olhos e cabelos devido a maior quantidade de melanina. Além disso, há um padrão conhecido de interrelação entre essas características, ou seja, indivíduos ruivos possuem tendência para a presença de efélides e olhos azuis, enquanto indivíduos com cabelos escuros, raramente possuem efélides e frequentemente possuem olhos escuros. Claramente, cor dos olhos e cabelos não podem ser associados diretamente ao MC, mas tendem a ser fatores de risco em virtude da sua relação com o fenótipo da pele. Vale comentar que olhos e cabelos claros são pouco frequentes em indivíduos de nossa população, na qual europeus foram miscigenados com ameríndios, asiáticos e negróides (PENA *et al.*, 2011).

Nevos foram identificados em 46% dos nossos casos. A presença de nevos é um importante fator de risco para o surgimento do MC. A presença de múltiplos nevos está relacionada com acúmulo de melanócitos e a quantidade de melanina, com intensa exposição solar e histórico de queimadura solar (GANDINI *et al.*, 2005; NAGORE *et al.*, 2010). Ainda, há evidências de que melanócitos em nevos estão mais propensos a transformação maligna; 25 a 50% dos MC estão associados com nevos (WHITEMAN *et al.*, 2003).

Observamos que proporções similares dos nossos pacientes apresentaram tumor axial e de extremidades. É frequentemente observado que a localização do MC é mais comum em sítios com maior exposição solar, como cabeça e pescoço, tronco e membros superiores e inferiores (CAINI *et al.*, 2009; NAGORE *et al.*, 2010).

WHITEMAN *et al.*, (2003) sugeriram a relação entre nevos e exposição solar, no surgimento do MC em diferentes locais do corpo. Foi observado que o MC localizado na cabeça e no pescoço são mais frequentes em indivíduos com alguns nevos e intensa queratose solar, sugerindo, que após a exposição solar, os melanócitos presentes nos nevos estão propensos e induzidos a proliferar, tornando-se inicialmente neoplásico. Em contraste, MC com surgimento no tronco é mais frequente em pacientes com a presença de muitos nevos, discreta queratose solar e menor exposição solar. Assim, indivíduos com baixa tendência para desenvolver nevos exigem uma exposição solar contínua que irá impulsionar o início para o desenvolvimento maligno. Assim, o surgimento do MC são mais frequentes em locais mais susceptíveis à exposição solar crônica. Entretanto, o tumor pode também ocorrer em regiões menos expostas ao sol, e podem ser decorrentes de lesões pré-malignas como os nevos, o que pode ter acontecido em nossos casos, uma vez que o Brasil é um país tropical, com alta exposição a raios UV da luz solar, e onde pessoas usam

roupas leves devido ao calor. Porém, gostaríamos de comentar que é possível que a presença de nevos tenha sido subestimada em nosso estudo, uma vez que foram avaliadas por exame clínico geral em pacientes e informações verbais de controles.

Efélides foram identificadas em apenas 48,6% dos nossos casos. As efélides também são lesões pigmentares na pele em resposta a exposição solar, e também estão relacionada com aumento do risco para o MC (CAINI *et al.*, 2009). Aspectos fenotípicos, como cor da pele, cor dos cabelos, cor dos olhos, presença de nevos e efélides, estão associados com aumento do risco para o surgimento do MC, visto que compõem um grupo de características que determinam maior sensibilidade solar, com maior tendência à queimaduras (GANDINI *et al.*, 2005). Entretanto, o MC também acomete indivíduos com ausência de efélides, uma vez que são características de indivíduos de pele clara e com dificuldade em bronzear. É possível que novamente a composição étnica de nossa população atue no sentido de proteger indivíduos dessa lesão cutânea.

Foi possível fazer avaliação para elastose solar em 98 pacientes da nossa amostra. Setenta e dois pacientes (74,5%) apresentaram elastose solar em diferentes graus. Observamos que a elastose solar foi mais freqüente em pacientes com idade maior do que 59 anos do que em pacientes mais jovens (44,9% *versus* 28,6%,  $P= 0,003$ ), indicando a relação de acúmulo de dano solar com a idade (FEARS *et al.*, 2002 ). Como esperado, a presença de elastose solar também foi mais freqüente em pacientes caucasóides do que em negróides (72,5% *versus* 1,0%;  $P= 0,01$ ) e em tumores localizados na região axial (cabeça, pescoço, tronco e dorso) do que nas extremidades (49,0% *versus* 23,5%,  $P= 0,03$ ). A elastose solar é um marcador relacionado ao dano acumulado da luz solar (THOMAS *et al.*, 2010). Está intimamente relacionada com a localização do tumor, sendo identificada principalmente na região da cabeça, pescoço, locais mais expostos a radiação, e

principalmente em indivíduos caucasóides, devido a reduzida quantidade de melanina (VON THALER *et al.*, 2009).

Observamos que a maioria dos nossos pacientes não tinham o hábito de fumar. A associação entre MC e o hábito tabagista não está estabelecida. Foi observado que fumantes de longa data estiveram sob risco menor de ocorrência do MC do que indivíduos que nunca fumaram (FREEDMAN *et al.*, 2003; DELANCEY *et al.*, 2011). No entanto, esses resultados devem ser vistos com cautela, já que o hábito de fumar relaciona-se com diversas condições cutâneas como má cicatrização, ressecamento e envelhecimento precoce causado pela alteração na síntese de colágeno com aumento de elastose na pele (FREIMAN *et al.*, 2004).

Notamos que nossos pacientes apresentaram, em geral, tumores espessos (maior que 1,5mm) e restritos à pele (estágios I e II).

Avaliados em conjunto, os resultados deste estudo indicam que os nossos pacientes com MC apresentaram características clínicas e anatomopatológicas do tumor semelhantes ao observado em estudos brasileiros e de outros países e, portanto, constituíram um grupo representativo da doença na nossa região estudada.

As amostras de pacientes e controles estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os loci dos genes *P53* ( $\chi^2= 2,49$ ,  $P= 0,11$  e  $\chi^2= 0,01$ ,  $P= 0,92$ ), *MDM2* ( $\chi^2= 0,49$ ,  $P= 0,48$  e  $\chi^2= 0,001$ ,  $P= 0,97$ ), *BCL2* ( $\chi^2= 0,22$ ,  $P= 0,66$  e  $\chi^2= 2,06$ ,  $P= 0,15$ ) e *BAX* ( $\chi^2= 1,85$ ,  $P= 0,17$  e  $\chi^2= 2,78$ ,  $P= 0,24$ ), indicando que a amostra de controles é representativa da nossa população e sugerindo que as frequências dos diferentes genótipos dos polimorfismos *P53* Arg72Pro, *MDM2* T309G, *BCL2* C(-938)A e *BAX* G(-248)A foram similares em pacientes e controles.

A frequência do genótipo homozigoto selvagem ArgArg do gene *P53* foi maior em pacientes do que em controles (58,7% versus 44,7%;  $P= 0,01$ ; PA: 76%). Indivíduos com esse genótipo estiveram sob risco quase duas vezes maior de ocorrência do tumor do que indivíduos com os demais genótipos (OR: 1,86; IC 95%: 1,13-3,06).

Os nossos resultados estão de acordo com dois estudos conduzidos nos Estados Unidos (SHEN *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2007) mas, foram divergentes dos obtidos na Alemanha (GWOSDZ *et al.*, 2006) e na Grécia (STEFANAKI *et al.*, 2007), nos quais o genótipo homozigoto variante ProPro do gene *P53* esteve associado a maior risco de ocorrência do MC. Quando comparamos os nossos controles aos controles alemães, observamos que a frequência do genótipo ArgArg foi maior em alemães do que em brasileiros (59,0% versus 44,7%;  $P= 0,009$ ), indicando que a diferença nos resultados encontrados pode ser decorrente da origem étnica. Entretanto, diferença étnica não foi explicação para as diferenças encontradas em nosso estudo e no estudo conduzido em gregos, visto que frequências similares do genótipo ArgArg foram observadas em controles gregos e brasileiros (50,4% versus 44,7%,  $P=0,35$ ).

Além disso, frequências similares do polimorfismo Arg72Pro em pacientes com MC e controles foram observadas em três outros estudos, conduzidos por HAN *et al.*, (2006), POVEY *et al.*, (2007) e CAPASSO *et al.*, (2010) nos Estados Unidos, Escócia e Itália, respectivamente, sugerindo que indivíduos com os diferentes genótipos estiveram sob risco similar de ocorrência da doença. Recentemente, uma meta-análise conduzida por JIANG *et al.*, 2011, avaliou 2.860 pacientes com câncer de pele do tipo melanoma e não melanoma, e foi sugerido que esse polimorfismo possui pouca influência na origem do câncer de pele.

De fato, o gene *P53* possui um papel importante na manutenção da integridade do genoma, assim, atuando na parada do ciclo celular para ativação da via de reparo, bem

como na indução na via da apoptose, quando a lesão do DNA causados pela luz UV não pôde ser reparada (VOUSDEN, 2002). Assim, é possível que alterações na sequência do DNA, causada pelo polimorfismo Arg72Pro altere a susceptibilidade para o MC. A proteína codificada pelo alelo selvagem Arg é mais eficiente na indução da apoptose do que a proteína codificada pelo alelo variante Pro (THOMAS *et al.*, 1999; DUMONT *et al.*, 2003; PIM *et al.*, 2004; SIDDIQUE & SABAPATHY, 2006). Entretanto, foi observado que a proteína codificada pelo alelo selvagem Arg é menos eficaz no reparo de DNA do que a proteína codificada pelo alelo variante Pro (SIDDIQUE & SABAPATHY, 2006). Assim, é possível que o aumento do risco em MC associado ao genótipo ArgArg, seja devido a deficiência no reparo de lesões causadas pela luz UV.

Não observamos diferenças entre as frequências do polimorfismo *P53* Arg72Pro, quando os nossos pacientes foram estratificados por aspectos clínicos e aspectos tumorais. SHEN *et al.* (2003), observaram aumento da frequência do genótipo ArgArg em pacientes com pele fototipo III+IV (sempre se bronzeiam e nunca queimam), que são características fenotípicas de baixo risco. Em contraste, o genótipo ProPro foi associado ao aumento do risco de MC em indivíduos com olhos e cabelos escuros e pele fototipo III+IV por STEFANAKI *et al.* (2007). Diferentes padrões de exposição ao sol podem modificar a influência de fatores de risco para o MC e provocar diferentes interações entre fatores genéticos e ambientais e, talvez, explicar a associação dos diferentes genótipos do gene *P53* com risco aumentado de MC em indivíduos com maior pigmentação, que pelo menos na teoria devem compor um grupo de menor risco.

Observamos frequências similares dos genótipos do polimorfismo *MDM2* T309G em nossos pacientes e controles. Resultados similares foram identificados em dois estudos americanos (HAN *et al.*, 2009; FIROZ *et al.*, 2009) e um italiano (CAPASSO *et al.*, 2009).

Os resultados, em seu conjunto, sugerem o que polimorfismo *MDM2* T309G não influencia o risco de ocorrência do MC.

A frequência do genótipo homozigoto variante GG foi maior em pacientes com a presença de nevos do que pacientes com os genótipos TT+TG (20,3% *versus* 6,1%;  $P= 0,02$ ), sugerindo que esse genótipo esteja associado com o MC que resulta da transformação maligna de nevos. Não há estudos que avaliaram a presença de nevos com o polimorfismo *MDM2* T309G. Não observamos diferenças entre as frequências desse polimorfismo entre os pacientes estratificados pelas demais características clínicas e tumorais. Apenas CAPASSO *et al.* (2009) observaram aumento da frequência do genótipo homozigoto variante GG em pacientes com tumores mais espessos (Breslow maior que 0,75mm).

Em nosso estudo, a expressão da proteína mdm2 foi similar em 59 tumores de MC avaliados quando comparada com os diferentes genótipos do polimorfismo T309G.

BOND *et al.* (2004) realizaram um estudo funcional da proteína mdm2 em linhagens de células saudáveis e de portadores da síndrome de Li Fraumeni, com os diferentes genótipos do polimorfismo T309G. Observaram que o genótipo homozigoto variante GG altera o sítio de ligação para o fator de transcrição Sp1, com aumento da expressão de RNA mensageiro e da referida proteína. Além disso, aumento de expressão da proteína mdm2 foi associada com o genótipo homozigoto variante GG, em 90 tumores de carcinoma de células renais e 54 tumores de glioma respectivamente, pela técnica de imunistoquímica na população japonesa (HIRATA *et al.*, 2007; TSUIKI *et al.*, 2007). Já WANG *et al.* (2009) avaliaram 101 pacientes americanos com câncer de próstata, e observaram que a proteína mdm2 foi mais expressa em caucasóides do que em negróides,

mas não observaram alteração na expressão da proteína mdm2 nos genótipos distintos do polimorfismo *MDM2* T309G.

POLSKY *et al.* (2002) não observaram diferenças na expressão da proteína mdm2 em 134 pacientes com MC estratificados por dados clínicos e tumorais, no entanto, não relacionaram a expressão da proteína com os distintos genótipos do polimorfismo *MDM2* T309G. Assim, até onde atinge o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avaliou a expressão da proteína mdm2 em pacientes com MC com os diferentes genótipos do polimorfismo *MDM2* T309G; esses resultados necessitam confirmação por outros estudos com maiores casuísticas.

A frequência do genótipo homozigoto variante AA do polimorfismo do gene *BCL2* C(-948)A foi maior em nossos pacientes do que em nossos controles (28,0% *versus* 15,3%;  $P= 0,004$ ; PA: 97%). Indivíduos com esse genótipo estiveram sob risco de quase três vezes maior de ocorrência da doença do que indivíduos com os demais genótipos (OR: 2,87; IC 95%: 1,40-5,90). Esta é a primeira descrição da associação do polimorfismo gênico e risco de MC. O genótipo homozigoto variante AA do polimorfismo *BCL2* C(-948)A esteve associado com aumento da expressão da proteína antiapoptótica bcl2 em outros tumores como carcinoma de células renais e em leucemia linfocítica crônica respectivamente (HIRATA *et al.*, 2009b; NUCKEL *et al.*, 2009). Além disso, TANG *et al.* (1998) e LEITER *et al.* (2000), avaliaram que a expressão da proteína bcl2 foi maior em melanoma metastático do que em melanoma primário e em pele normal, mas não relacionaram a expressão da proteína com o polimorfismo C(-948)A.

Não observamos diferenças entre as frequências do polimorfismo *BCL2* C(-938)A em nossos pacientes estratificados por aspectos clínicos e biológicos do tumor. Até onde atinge o nosso conhecimento não há estudos que avaliaram a influência desse polimorfismo

gênico no risco e nas manifestações clínicas e biológicas do MC. É sabido que a proteína bcl2 está mais expressa em melanoma durante a progressão do tumor refletindo no aumento do potencial maligno causado pela inibição da apoptose e avanço na proliferação celular.

O aumento da expressão da proteína antiapoptótica bcl2 resulta na inibição da apoptose e reflete na progressão do MC, aumento do potencial maligno e principalmente na resistência terapêutica (TANG *et al.*, 1998; LEITER *et al.*, 2000; SOENGAS *et al.*, 2003).

Frequências similares dos genótipos distintos do polimorfismo BAX G(-248)A foram avaliados em nossos pacientes e controles. Não foram observadas diferenças nas frequências dos genótipos do polimorfismo BAX G(-248)A em leucemia linfocítica crônica e em câncer de cabeça e pescoço (SAXENA *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2007). O genótipo homozigoto variante AA esteve associado com redução na expressão da proteína bax e pior sobrevida em leucemia linfocítica crônica (SAXENA *et al.*, 2002; STARCZYNSKI *et al.*, 2005).

TANG *et al.* (1998), estudaram o aumento da expressão da proteína bax em dez casos com melanoma metastático por imunistoquímica e *Western Blot*. Em contraste, LEITER *et al.* (2000) não encontraram alteração na expressão dessa proteína pró-apoptótica em amostras de melanoma primário, melanoma metastáticos, nevos e de pele normal. Assim, diferenças encontradas na variação da expressão da proteína bax podem estar relacionadas com mutações ou polimorfismos gênicos no gene P53. O gene BAX possui um sítio de ligação para a proteína p53 que atua como fator de transcrição, assim, aumento na expressão da proteína p53 parece estar relacionada com aumento na ativação transcricional da proteína bax. De fato, o papel e a expressão da proteína bax no MC é controverso.

Não observamos diferenças entre as frequências do polimorfismo BAX G(-248)A quando os nossos pacientes foram estratificados por aspectos clínicos e do tumor. Até onde

atinge o nosso conhecimento, não há estudos que avaliaram a influência do risco desse polimorfismo gênico associado ao MC.

Quando avaliamos os genótipos combinados dos polimorfismos dos genes *P53* e *BCL2* observamos que as frequências dos genótipos ArgArg e AA dos respectivos genes, foram maiores em pacientes do que em controles do nosso estudo (36,1% versus 16,9%;  $P=0,002$ ; PA: 99%). Indivíduos com os genótipos combinados estiveram sob risco de 3,43 vezes maior de ocorrência do tumor (IC 95%: 1,28-7,47). Apenas CHEN *et al.* (2007) avaliaram os polimorfismos dos genes *P53* e *BCL2* combinados em câncer de cabeça e pescoço e não observaram diferença nas frequências dos genótipos combinados entre pacientes e controles.

A combinação dos polimorfismos dos genes *P53* e *BAX* os genótipos ArgArg e AA dos respectivos genes, foram maiores em pacientes do que em controles (29,5% versus 15,3%;  $P=0,008$ ; PA: 95%). Indivíduos com esses genótipos associados estiveram sob risco de 2,71 vezes maior de ocorrência da doença (IC 95%: 1,29-5,70). No estudo americano conduzido nos por CHEN *et al.* (2007) os genótipos combinados dos genes *P53* e *BAX* ArgPro e AA foram associados com aumento do risco para o câncer de cabeça e pescoço. A discrepância nos resultados pode ser decorrente do tamanho amostral, visto que a casuística do estudo americano foi constituída por 814 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 934 controles.

Os resultados da combinação dos polimorfismos dos genes *P53*, *MDM2*, *BCL2* e *BAX* sugerem que eles possam atuar de forma sinérgica no mecanismo de apoptose no MC.

O gene supressor *P53* interagem com numerosos sinais que controlam a proliferação celular normal e apoptose. Além disso, a proteína p53 atua como fator de transcrição por ligações em sítios específicos em genes alvos envolvidos no controle do ciclo celular,

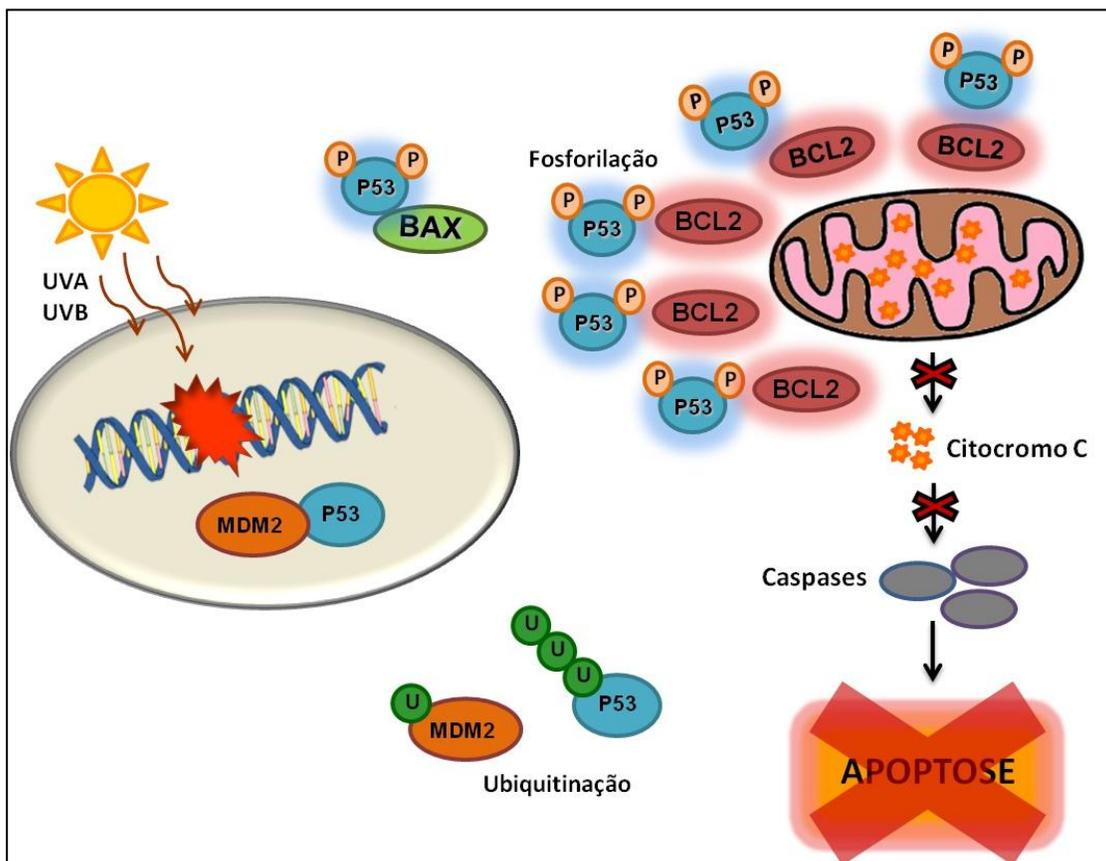
reparo de DNA e apoptose. Em resposta ao dano no DNA ou outras formas de *stress*, o p53 promove parada do ciclo celular e apoptose. Em condições fisiológicas, a atividade funcional do p53 é negativamente regulada pela oncoproteína mdm2 através da associação física direta, enquanto o p53 aumenta o nível transcricional da mdm2, que são co-reguladas por um sistema de *feedback*. Há evidências de que p53 reduz a expressão de genes antiapoptóticos como o *BCL2* e aumenta a expressão de genes pró-apoptóticos como *BAX*. No entanto, essas condições normais podem ser alteradas por vários fatores como: *splicing* alternativo, mutações ou polimorfismos gênicos que poderão refletir no comportamento celular.

Além disso, alteração no balanço existente entre as proteínas bcl (antiapoptótica) e bax (pró-apoptótica) podem resultar na resistência à apoptose celular que estão intimamente relacionadas com a promoção do processo de carcinogênese e a resistência à terapêutica medicamentosa

De modo geral, os resultados do nosso estudo sugerem que os polimorfismos *P53* Arg72Pro, *BCL2* C(-948)A, isolados ou associados, bem como os polimorfismo associados *P53* Arg72Pro e *BAX* G(-248)A alteram o risco de ocorrência do MC em nossa região. É importante salientar que é o primeiro estudo que avaliou a influência dos polimorfismos dos genes *BCL2* C(-948)A e *BAX* G(-248)A no risco do MC

Para justificar tal associação, aventamos a hipótese de que a proteína p53 codificada pelo alelo selvagem Arg possa ser menos eficaz no reparo de DNA por raios UV da luz solar, enquanto que os alelos variantes A dos polimorfismos *BCL2* C(-948)A aumenta a resistência a apoptose e *BAX* G(-248)A diminui a indução na apoptose, atuando juntamente na inibição da apoptose em células lesadas (Figura 8).

É evidente que maior número de pacientes com MC e de indivíduos saudáveis, de regiões distintas do Brasil, sejam avaliados futuramente para confirmar estes resultados em nossa população. Se confirmados esses resultados, julgamos que indivíduos com esses genótipos mereçam receber recomendações adicionais para proteção da pele dos efeitos nocivos dos raios UV para a prevenção da doença e seguimento dermatológico periódico para detectar lesões precoces do tumor.



**Figura 8.** Representação esquemática da expressão da p53 codificada pelo alelo selvagem Arg com a tentativa na indução da apoptose; redução da expressão proteína bax (pró-apoptótica) codificada pelo alelo variante A; aumento da expressão da proteína bcl2 (antiapoptótica) codificada pelo alelo variante A. Como resultado final uma célula resistente à apoptose após seu DNA ser danificado pela radiação UV da luz solar



# CONCLUSÕES

---



- O genótipo homozigoto selvagem ArgArg do polimorfismo *P53* Arg72Pro, o genótipo variante AA do polimorfismo *BCL2* C(-948)A isolados ou associados, bem como o genótipo selvagem ArgArg do polimorfismo *P53* Arg72Pro associado genótipo variante AA do polimorfismo *BAX* G(-248)A aumentam o risco de MC em nossa amostra;
- O polimorfismo *MDM2* T309G não alterou o risco do MC em nossa amostra;
- O genótipo homozigoto variante GG do polimorfismo *MDM2* T309G esteve associado com a presença de nevos melanocíticos em pacientes com MC em nossa região e,
- Os demais aspectos clínicos, histopatológicos e tumorais dos pacientes não estiveram associados com os polimorfismos dos genes *P53*, *MDM2*, *BCL2* e *BAX*;
- O polimorfismo *MDM2* T309G não alterou expressão da proteína mdm2 em MC.



# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



American Cancer Society (2011). Cancer Facts & Figures. Atlanta, GA. Disponível em < <http://www.cancer.org> > Acesso 04 Fev 2012

Bakos L (2006). Melanoma cutâneo: estudo de base populacional no Brasil. *An Bras Dermatol* 81(5):402

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19(16):3635-3648 Review

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran DG, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm Jr MC, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK (2009). Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J Clin Oncol.* 27(36):6199-6206

Beiguelman B (1995). Dinâmica dos Genes nas Famílias e Populações. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 2.ed. p. 1-472

Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ (2004). A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119(5):591-602

Breslow A (1970). Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of Surgery* 172(5):902-908

Brown CY, Mize GJ, Pineda M, George DL, Morris DR (1999). Role of two upstream open reading frames in the translational control of oncogene mdm2. *Oncogene* 18(41):5631-5637

Caini S, Gandini S, Sera F, Raimondi S, Fagnoli MC, Boniol M, Armstrong BK (2009). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *Eur J Cancer* 45(17):3054-3063

Capasso M, Ayala F, Avvisati A, Russo R, Gambale A, Mozzilo N, Ascierto PA, Iolascon A (2010). *MDM2* SNP309 and *p53* Arg72Pro in cutaneous melanoma: association between SNP309GG genotype and tumor Breslow thickness. *Journal of Human Genetics* 55(8):518-524

Chen K, Hu Z, Wang LE, Sturgis EM, Naggar KE, Zhang W, Wei Q (2007). Single nucleotide polymorphism at the TP53-binding or responsive promoter regions of *BAX* and *BCL2* genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 28(9): 2008-2012

Chin L, Merlino G, Depinho RA (1998). Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes & Development* 12(22):3467-3481

Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, Horner JW 2ND, Depinho RA (1997). Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. *Genes & Development* 11(21):2822-34

Clark WH JR, From L, Bernardino EA Mihm MC (1969). The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 29:705-727

DeLancey JO, Hannan LM, Gapstur SM, Thun MJ (2011). Cigarette smoking and the risk of incident and fatal melanoma in a large prospective cohort study. *Cancer Causes Control* 22(6):937-942

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (2005). *Cancer principles & practice of oncology*. In: *Melanoma*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC RD, George DL, Murphy M (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nature Genetics*, 33(3):357-365

Duncan BB, Schmidt MI, Polanczyk CA, Mengue SS (1992). Altos coeficientes de mortalidade em populações adultas brasileiras – uma comparação internacional. *Rev Assoc Med Bras* 38:138-142

Elsaeber O, Leiter U, Buettner PG, Eigentler TK, Meier F, Weide B, Metzler G, Breuninger H, Garbe C (2012). Prognosis of Sentinel Node Staged Patients with Primary Cutaneous Melanoma. PLoS One 7(1):e29791

Fears TR, Bird CC, Guerry D, Sagebiel RW, Gail MH, Elder DE, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Tucker MA (2002). Average midrange ultraviolet radiation flux and time outdoors predict melanoma risk. Cancer Res 62(14):3992-3996

Fegan C, Starczynski J, Pratt G, Pepper C (2006). The role of the Bax gene polymorphism G(-248)A in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 20(8):1460-1461

Fernandes NC, Calmon R, Maceira JP, Cuzzi T, Silva CSC (2005). Cutaneous melanoma: Prospective study of 65 cases. An Bras Dermatol 80(1):25-34

Ferreira CG, Rocha JC (2004). Oncologia molecular. São Paulo: editora Atheneu

Finn L, Markovic SN, Joseph RW (2012). Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. BMC Med 10:23

Firoz EF, Warycha M, Zakrzewski J, Pollens D, Wang G, Shapiro R, Berman R, Pavlick A, Manga P, Ostrer H, Celebi JT, Kamino H, Darvishian F, Rolnitzky L, Goldberg JD, Osman I, Polsky (2009). Association of MDM2 SNP309, age of onset, and gender in cutaneous melanoma. Clinical Cancer Research 15(7): 2573-2580

Fitzpatrick TB (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. Archives Dermatology 124:869-871

Folkard M, Prise KM, Turner CJ, Michael BD (2002). The production of single strand and double strand breaks in DNA in aqueous solution by vacuum UV photons below 10 eV. Radiat Prot Dosimetry 99(4):147-149

Freedman DM, Sigurdson A, Doody MM, Rao RS, Linet MS (2003). Risk of melanoma in relation to smoking, alcohol intake, and other factors in a large occupational cohort. Cancer Causes Control 14(9):847-857

Freiman A, Bird G, Metelitsa AI, Barankin B, Lauzon GJ (2004). Cutaneous effects of smoking. *J Cutan Med Surg* 8(6):415-423

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, Boyle P, Melchi CF (2005). Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 41(14):2040-2059

Glinsky GV, Glinsky VV, Ivanova AB, Hueser CJ (1997). Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Letters* 115(2):185-193

GLOBOCAN (2008). Cancer incidence and mortality worldwide Fast stats, Lyon, França: IARC press

Gluck I, Simon AJ, Catane R, Pfeffer R, Schachter J, Rechavi G, Bar J (2009). Germline analysis of thymidine/guanidine polymorphism at position309 of the promoter in malignant melanoma patients. *Melanoma Res* 19(4):199-202

Godar DE (2011). Worldwide increasing incidences of cutaneous malignant melanoma. *J Skin Cancer* doi:10.1155/2011/858425

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD (2002). Polymorphism in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(12):1513-1530

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M (2004). *AJCC Manual de Estadiamento do Câncer*. Artmed editora. 6ª edição

Grossman D, Altieri DC (2001). Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Review* 20:3-11

Gwodz C, Scheckenbach K, Lieven O, Reifenberger J, Knopf A, Bier H, Balz V (2006). Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer* 118(3):577-582

Han J, Cox DG, Colditz GA, Hunter DJ (2006). The p53 codon 72 polymorphism, sunburns, and risk of skin cancer in US Caucasian women. *Molecular Carcinogenesis* 45(9):694-700

Hansson J (2008). Familial melanoma. *The Surgical Clinics of North America* 88(4):897-916

Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Kawamoto K, Suehiro Y, Tanaka Y, Dahiya R (2007). MDM2 SNP309 polymorphism as risk factor for susceptibility and poor prognosis in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13(14):4123-4129

Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N, Suehiro Y, Shahryari V, Tabatabai ZL, Igawa M, Dahiya R (2009a). Bcl2 -938C/A polymorphism carries increased risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Journal of Urology* 181(4):1907-1912

Hirata H, Hinoda Y, Nobuyuki K, Suehiro Y, Tabatabai ZL, Ishii N, Dahiya R (2009b). The Bcl2 – 938CC genotype has poor prognosis and lower survival in renal cancer. *The Journal Urology* 182(2):721-727

Honma HN, De Capitani EM, Perroud MW Jr, Barbeiro AS, Toro IF, Costa DB, Lima CS, Zambon L (2008). Influence of p53 codon 72 exon 4, GSTM1, GSTT1 and GSTP1\*B polymorphisms in lung cancer risk in a Brazilian population. *Lung Cancer* 61:152-162

Horikawa-Miura M, Matsuda N, Yoshida M, Okumura Y, Mori T, Watanabe M (2007). The greater lethality of UVB radiation to cultured human cells is associated with the specific activation of a DNA damage-independent signaling pathway. *Radiat Res* 167(6):655-662

Hsu SM, Raine L (1981). Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29(11):1349-1353

Hulley SB (1988). Cummings SR. *Designing Clinical Research*. Baltimore: Williams & Wilkins

Hussain SP, Hollstein MH, Harris CC (2000). P53 tumor suppressor gene: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and human risk assessment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 919:79-85

Hussein MR, Haemel AK, Wood GS (2003). Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* 199:275-288

INCA-Instituto Nacional do Câncer (2012). Estimativas de câncer 2012. Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso 10 Abril 2012

Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, WU X, Jamison PM, Wingo PA, Howe HL, Anderson RN, Edwards BK (2004). Annual report to the nation on the status of cancer, with a special feature regarding survival. *Cancer* 101(1):3-27

Jemal A, Devesa SS, Hartge P, Tucker MA (2001). Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *J Natl Cancer Inst* 93(9):678-683

Jemal A, Fressie B, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90

Jiang DK, Wang WZ, Ren WH, Yao L, Peng B, Yu L (2011). TP53 Arg72Pro polymorphism and skin cancer risk: a meta-analysis. *J Invest Dermatol* 131(1):220-228

Jin X, Turcott E, Englehardt S, Mize GJ, Morris DR (2003). The two upstream open reading frames of oncogene mdm2 have different translational regulatory properties. *J Biol Chem* 278(28):25716-25721

Kaelin WG JR (1999). The p53 gene family. *Oncogene* 18(3):7701-7705

Kallio JP, Hirvikoski P, Helin H, Luukkaala T, Tammela TL, Kellokumpu-Lehtinen P, Martikainen PM (2004). Renal cell carcinoma MIB-1, Bax and Bcl-2 expression and prognosis. *Journal of Urology* 172(6):2158-2161

Kanavy HE, Gerstenblith MR (2011). Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 30(4):222-228

Kielbassa C, Roza L, Epe B (1997). Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* 18(4):811-816

Köhler KF, Petzl-Erler ML (2006). No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *International Journal Immunogenetics* 33(2):141-144

Lea CS, Holly EA, Hartge P, Lee JS, Guerry D 4th, Elder DE, Halpern A, Sagebiel RW, Tucker MA (2007). Reproductive risk factors for cutaneous melanoma in women: a case-control study. *Am J Epidemiol* 165(5):505-513

Lehnerdt GF, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Kelava A, Nürkell H, Lang S, Schmid KW, Siffert W, Bachmann HS (2009). The regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Annals of Oncology* 20(6):1094-1099

Leiter U, Schmid RM, Kaskel P, Peter RU, Krähn G (2000). Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* (5):225-232

Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991) The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351(6326):453-456

Li C, Chen K, Liu Z, Wang L, Gershenwald JE, Lee JE, Prieto VG, Duvic M, Grimm EA, Wie Q (2007) polymorphisms of TP53 Arg72Pro, but not P73 G4C14>A4tA4 and P21 Ser31Arg, contribute to risk of cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 128(6):1585-1588

Li G, Bush JA, Ho VC (2000). P53-Dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin. *The Society for Investigative Dermatology* 114(3):514-519

Livingstone E, Zimmer L, Vaubel J, Schadendorf D (2012). Current advances and perspectives in the treatment of advanced melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges.* doi: 10.1111/j.1610-0387.2012.07895.x

Lotze MT, Dallal RM, Kirkwood JM, Flickinger JC (2001). Section 2: Cutaneous Melanoma. In: Cancer Principles & Practice of Oncology. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Taunton, MA. p2012-2069

Mackie RM, Hauschild A, Eggermont AM (2009). Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 20 Suppl 6:vi1-7. Review

Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV (1987). Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Molecular and Cellular Biology* 7(2):961-963

Mendes GL, Koifman RJ, Koifman S (2010). Mortality frequency and trends attributed to melanoma in Brazil from 1980-2005. *J Toxicol Environ Health A* 73:850-857

Mendonça GA (1992). Increasing risk of cutaneous melanoma in Brazil. *Rev Saude Publica* 26(4):290-4

Michael D, Oren M (2003). The p53-MDM2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* 13:49-58

Ministério da Saúde (2011). Portal da Saúde SUS. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>> Acesso 10 Abril 2012

Miyashita T, Reed JC (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80(2):293-299

Moon JH, Sohn SK, Lee MH, Jang JH, Kim K, Jung CW, Kim DH (2009). BCL2 gene polymorphism could predict the treatment outcomes in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia Research* 34(2):166-172

Moreira RM, Schenka AA, Latuf-Filho P, Penná AL, Lima CSP, Soares FA, Trevisan MAS, Vassallo J (2011). Immunohistochemical analysis of vascular density and área in colorectal carcinoma using different markers and comparison with clinicopathologic prognosis factors. *Tumor Biol* 32:527-534

Moreno M, Schmitt RL, Lang MG, Gheno V (2012). Epidemiological profile of patients with cutaneous melanoma in a region of southern Brazil. *J Skin Cancer* 2012:917346

Nagore E, Hueso L, Botella-Estrada R, Alfaro-Rubio A, Serna I, Guallar J, González I, Ribes I, Guillen C (2010). Smoking, sun exposure, number of nevi and previous neoplasias are risk factors for melanoma in older patients (60 years and over). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24(1):50-57

Nan H, Qureshi AA, Hunter DJ, Han J (2009). A functional SNP in the MDM2 promoter, pigmentary, phenotypes, and risk of skin cancer. *Cancer Causes Control* 20:171-179

Naser N (2011). Cutaneous melanoma: a 30-year-long epidemiological study conducted in a city in southern Brazil, from 1980-2009. *An Bras Dermatol* 86(5):932-41

Nurckel H, Frey UH, Bau M, Sellmann L, Stanell J, Düring J, Jöckel KH, Dühsen U, Siffert W (2006). Association of a novel regulatory polymorphism (938C>A) in and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109(1):290-297

Ortega MM, Honma HN, Zambon L, Lorand-Metze I, Costa FF, De Souza CA, Lima CSP (2007). GSTM1 and Codon 72 P53 Polymorphism in Advanced Multiple Myeloma. *Ann. Haematol* 86(11):815-19

Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G (2011). The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6(2):e17063

Pim D, Banks L (2004). P53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 108(2):196-199

Pocock SJ (1985). *Clinical Trials: A Practical Approach*. New York: Wiley & Sons

Polsky D, Bastian BC, Hazan C, Melzer K, Pack J, Houghton A, Busam K, Cordon-Cardo C, Osman I (2001). HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma. *Cancer Res* 61(20):7642-7646

Povey EJ, Darakhshan F, Robertson K, Bisset Y, Mekky M, Rees J, Doherty V, Kavanagh G, Anderson N, Campbell H, Mackie R, Melton WD (2007). DNA repair gene polymorphisms and genetic predisposition to cutaneous melanoma. *Carcinogenesis* 28(5):1087-1093

Rauterberg A, Jung EG (1993). UV exposure, skin cancer and decreased in the ozone layer. *Ther Umsch* 50(12):804-807

Robles AL, Harris CC (2001). P53 mediated apoptosis and genomic instability diseases. *Acta Oncology* 40:696-701

Salvio AG, Assumpção Júnior A, Segalla JG, Panfilo BL, Nicolini HR, Didone R (2011). One year experience of a model for melanoma continuous prevention in the city of Jaú (São Paulo), Brazil. *An Bras Dermatol* 86(4):669-674

Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP (2002). Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Letters* 187(2):199-205

Schafer AJ, Hawkins JR (1998). DNA variation and the future of human genetics. *Nat Biotechnol* 16(1):33-9

Schaffer JV, Rigel DS, Kopf AW, Bolognia JL (2004). Cutaneous melanoma – past, present and future. *J Am Acad Dermatol* 51(1 Suppl):65-69

Seto M, Jaeger U, Hockett RD, Graninger W, Bennett S, Goldman P, Korsmeyer SJ (1988). Alternative promoters and exons, somatic mutations and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO Journal* 7(1):123-138

Shen H, Liu Z, Strom SS, Spitz MR, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI, Mansfield PF, Duvic M, Ananthaswamy HN, Wei Q (2003). P53 codon 72 Arg homozygotes are associated with an increased risk of cutaneous melanoma. *Journal Invest Dermatol* 121(6):1510-1514

Shoo BA, Kashani-Sabet M (2009). Melanoma arising in African, Asian, Latino and Native-American populations. *Semin Cutan Med Surg* 28(2):96-102

Siddique M, Sabapathy K (2006). Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene* 15:3489-3500

Soengas MS, Lowe SW (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138–3151

Souza RJ, Mattedi AP, Rezende ML, Corrêa Mde P, Duarte EM (2009). An estimate of the cost of treating melanoma disease in the state of Sao Paulo-Brazil. *An Bras Dermatol* 84(3):237-243

Starczynski J, Pepper C, Pratt G, Hooper L, Thomas A, Milligan D, BentleY P, Fegan C (2005). Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic Leukemia once treatment is initiated. *J Clin Oncol* 23(7):1514-1521

Sun YF, Leu JD, Chen SM, Lin IF, Lee YJ (2009). Results based on 124 cases of breast cancer and 97 controls from Taiwan suggest that the single nucleotide polymorphism (SNP309) in the MDM2 gene promoter is associated with earlier onset and increased risk of breast cancer. *BMC Cancer* 13:9-13

Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, Zhou X, Ho VC, Trotter MJ (1998). Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 4(8):1865-1871

Testori A, Rutkowski P, Marsden J, Bastholt L, Chiarion-Sileni V, Hauschild A, Eggermont AM (2009). Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 20 Suppl 6:vi22-9

Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G (1999). Two polymorphic variants of wild type p53 differ biochemically and biologically. *Molecular and cellular Biology* 19(2):1092-1100

Thomas NE, Krickler A, From L, Busam K, Millikan RC, Ritchey ME, Armstrong BK, Lee-Taylor J, Marrett LD, Anton-Culver H, Zanetti R, Rosso S, Gallagher RP, Dwyer T, Goumas C, Kanetsky PA, Begg CB, Orlow I, Wilcox H, Paine S, Berwick M (2010). Associations of cumulative sun exposure and phenotypic characteristics with histologic solar elastosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19(11):2932-2941

Thornborrow EC, Patel S, Mastropietro AE, Schwartzfarb EM, Manfredi JJ (2002). A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes. *Oncogene* 21(7):990-999

Tsuiki H, Nishi T, Takeshima H, Yano S, Nakamura H, Makino K, Kuratsu J (2007). Single nucleotide polymorphism 309 affects murin-double-minute 2 protein expression but not glioma tumorigenesis. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 47(5):203-208

Tucker MA (2009). Melanoma Epidemiology. *Hematol Oncol Clin* 23:83-95

Udayakumar D, Tsao H (2009). Melanoma genetics: an update on risk-associated genes. *Hematol Oncol Clin North Am* 23(3):415-429

Von Thaler AK, Kamenisch Y, Berneburg M (2010). The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis. *Exp Dermatol* 19(2):81-88

Vousden KH, Lu X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2:594-604

Walker G (2008). Cutaneous melanoma: how does ultraviolet light contribute to melanocyte transformation?. *Future Oncol* 4(6):841-856

Wang G, Firoz EF, Rose A, Blochin E, Christos P, Pollens D, Mazumdar M, Gerald W, Oddoux C, Lee P, Osman I (2009). MDM2 expression and regulation in prostate cancer racial disparity. *Int J Clin Exp Pathol* 2(4):353-360

Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M (2009). P53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 9(2):95-107

Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC (2011). The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res* 24(5):879-897

Wojcik I, Szybka M, Golanska E, Rieske P, Blonski JZ, Robak T, Bartkowiak J (2005). Abnormalities of the P53, MDM2, BCL2 and BAX genes in acute leukemias. *Neoplasma* 52(4):318-324

Woodhead JL, Fallon R, Figuered H (1986). Alternative methodology of gene diagnosis. In: *Human Genetic Diseases - A practical approach* (K.E. Davies, ed.), pp. 51-64, Oxford: IRL Press

Wünsch Filho V, Gattás GJ (2001). Molecular biomarkers in cancer: implications for epidemiological research and public health. *Cad Saúde Pública* 17(3):4367-4380

Zhan Q, Kontny U, Iglesias M, Alamo IJ, Yu K, HollandeR MC, Woodworth CD, Fornace AJJ (1999). Inhibitory effect of BCL2 on P53-mediated trans-activator following genotoxic stress. *Oncogene* 18(2):297-304

Zhang Z, Zhang R (2005). P53-independent activities of *MDM2* and their relevance to cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets* 5(1):9-20



**ANEXOS**



## ANEXO 1

### Ficha de coleta dos dados

#### 1) Identificação

Iniciais: \_\_\_\_\_ HC \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### 2) Dados Tumorais:

2,1) Data do Diagnóstico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

2,2) Espessura de Breslow (mm): \_\_\_\_\_

2,3) Nível de Clark: I(  ), II(  ) III(  ) IV(  ) V(  )

2,4) T: 1<sup>a</sup>(  ) 1b(  ) 2<sup>a</sup>(  ) 2b(  ) 3<sup>a</sup>(  ) 3b(  ) 4<sup>a</sup>(  ) 4 b(  )

2,5) N: 0(  ) 1<sup>a</sup>(  ) 1b(  ) 2<sup>a</sup>(  ) 2b(  ) 2c(  ) 3(  )

2,6) M: 1<sup>a</sup>(  ) 1b(  ) 1c(  )

2,7) EC: IA(  ) IB(  ) IIA(  ) IIC(  ) IIIA(  ) IIIB(  ) IIIC(  ) IV(  )

2,8) DHL: \_\_\_\_\_ (Anotar o valor de normalidade do laboratório)

#### 3) Caracteres Pessoais:

3,1) Cor da Pele: Branco(  ) Negro(  ) Pardo(  )

3,2) Cor dos olhos: Azul(  ) Verde(  ) Castanho(  ) Preto(  )

3,3) Cabelo: Preto(  ) Castanho(  ) Loiro(  ) Ruivo(  )

3,4) Efélides e ceratose actínica: Sim(  ) Não(  )

3,5) Nevos: Sim(  ) Não(  )

#### 4) Antecedentes pessoais:

4,1) Fumo: Sim(  ) Não(  )

4,2) Exposição Solar: Sim(  ) Não(  ) Por quanto tempo: \_\_\_\_\_ anos

4,3) Queimaduras Solares: Sim(  ) Não(  )

4,4) Incapacidade de Bronzear: Sim(  ) Não(  )

4,5) Câncer de Pele Não Melanoma: Sim(  ) Não(  )

4,6) Câncer de Pele Melanoma: Sim(  ) Não(  )

4,7) Outro tipo de Câncer: Sim ( \_\_\_\_\_ ) Não(  )

#### 5) Antecedente Familiares:

5,1) Câncer de Pele Não Melanoma: \_\_\_\_\_

5,2) Câncer de Pele Melanoma: \_\_\_\_\_

5,3) Outros Tumores: \_\_\_\_\_



## ANEXO 2

### Classificação do sistema de estadiamento TNM para o melanoma cutâneo

Categorias	Descrições
<b>Categoria T</b>	<b>Tumor</b>
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Melanoma <i>in situ</i>
T1	Melanoma $\leq 1$ mm de espessura, com ou sem ulceração
T1a	Melanoma $\leq 1$ mm de espessura e nível II ou III sem ulceração
T1b	Melanoma $\leq 1$ mm de espessura e nível IV ou V, ou com ulceração
T2	Melanoma 1,01 – 2 mm de espessura, com ou sem ulceração
T2a	Melanoma 1,01 – 2 mm de espessura, sem ulceração
T2b	Melanoma 1,01 – 2 mm de espessura, com ulceração
T3	Melanoma 2,01 – 4 mm de espessura, com ou sem ulceração
T3a	Melanoma 2,01 – 4 mm de espessura, sem ulceração
T3b	Melanoma 2,01 – 4 mm de espessura, com ulceração
T4	Melanoma $> 4$ mm de espessura, com ou sem ulceração
T4a	Melanoma $> 4$ mm de espessura, sem ulceração
T4b	Melanoma $> 4$ mm de espessura, com ulceração
<b>Categoria N</b>	<b>Linfonodos regionais</b>
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados (previamente removidos)
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo
N1a	Metástase clinicamente oculta (microscópica)
N1b	Metástase clinicamente aparente (macroscópica)
N2	Metástases em dois a três linfonodos ou metástases regionais intralinfática sem comprometimento nodal
N2a	Metástase clinicamente oculta (microscópica)
N2b	Metástase clinicamente aparente (macroscópica)
N2c	Metástases satélite ou em trânsito, <i>sem</i> metástase em linfonodos regionais
N3	Metástase em 4 ou mais linfonodos, ou linfonodos metastáticos fusionados, ou satélite(s) <i>com</i> metástase em linfonodos regionais
<b>Categoria M</b>	
MX	Metástases a distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases a distância
M1	Metástases a distância
M1a	Metástases em pele, tecido subcutâneo ou linfonodos distantes
M1b	Metástases pulmonares
M1c	Metástases para outros sítios viscerais ou à distância associada a LDH elevado



### ANEXO 3

#### Grupos de estágios e características TNM do melanoma cutâneo

Estágio	Classificação TNM		
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1a	N0	M0
<b>IB</b>	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
<b>IIB</b>	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1-4a	N1a	M0
	T1-4a	N2a	M0
<b>IIIB</b>	T1-4b	N1a	M0
	T1-4b	N2a	M0
	T1-4a	N1b	M0
	T1-4a	N2b	M0
	T1-4a/b	N2c	M0
<b>IIIC</b>	T1-4b	N1b	M0
	T1-4b	N2b	M0
<b>IV</b>	qualquer T	N3	M0
	qualquer T	qualquer N	M1

Tis: melanoma *in situ*, T: tumor primário, N: linfonodos regionais, M: metástase  distância



## ANEXO 4

### Parecer Comitê de Ética em Pesquisa



CEP, 22/09/09.  
(PARECER CEP: N° 424/2006)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

### PARECER

#### I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DOS ALELOS DO SISTEMA DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE MU 1 (*GSTM1*) E THETA 1 (*GSTT1*) NA SUSCEPTIBILIDADE AO MELANOMA MALIGNO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Augusto Rinck Junior

#### II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o projeto intitulado “INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS *TP53* ARG72PRO, *MDM2* T309G, *BLC2* C938A E *BAX* G248A, RELACIONADOS COM APOPTOSE CELULAR, NA SUSCEPTIBILIDADE AO MELANOMA MALIGNO”, com a finalidade de dissertação de mestrado da aluna Cristiane de Oliveira, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

#### III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de setembro de 2009.

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187



## ANEXO 5

Distribuição dos 150 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com idade, sexo, raça, cor da pele, cor dos olhos, cor dos cabelos, presença de nevos e hábito tabagista

Nº	Iniciais	Idade	Sexo	Raça	Cor Pele	Cor Olhos	Cor Cabelos	Nevos	Fumo
1	AS	71	M	C	branco	NA	NA	sim	não
2	AD	76	F	C	branco	não claro	não claros	não	NA
3	AAV	43	F	C	branco	não claro	não claros	sim	sim
4	AC	67	M	C	branco	claro	não claros	não	sim
5	BGS	26	M	C	branco	não claro	não claros	não	não
6	BJ	79	M	C	branco	não claro	não claros	não	sim
7	BGL	56	F	C	branco	não claro	não claros	não	não
8	CO	57	F	C	branco	não claro	não claros	não	não
9	CV	47	M	C	branco	claro	claros	sim	não
10	CF	73	M	C	branco	não claro	não claros	não	não
11	DSF	40	F	C	branco	claro	claros	sim	sim
12	EAM	32	F	C	branco	NA	NA	NA	NA
13	GMG	31	F	C	branco	claro	não claros	não	não
14	JS	23	F	C	branco	não claro	não claros	sim	NA
15	JGL	70	M	C	branco	claro	não claros	não	não
16	JDJ	62	M	C	branco	não claro	não claros	não	NA
17	LPA	20	F	C	branco	não claro	não claros	não	NA
18	MPR	52	F	C	branco	claro	claros	não	NA
19	MLG	42	F	C	branco	NA	NA	NA	não
20	MPB	80	F	C	branco	não claro	não claros	não	NA
21	MSBM	36	F	C	branco	não claro	não claros	sim	não
22	OKG	76	M	C	branco	claro	não claros	não	sim
23	RFB	31	M	C	branco	NA	NA	NA	NA
24	RCCM	45	F	C	branco	claro	claros	sim	NA
25	RLL	50	M	C	branco	não claro	não claros	não	sim
26	RRS	64	F	C	branco	não claro	não claros	sim	sim
27	SO	32	F	C	branco	NA	NA	Sim	não
28	VC2	37	F	C	branco	não claro	não claros	sim	não
29	LMS	82	F	C	branco	claro	não claros	não	não
30	NPJ	37	M	C	branco	NA	NA	não	não
31	MCS	66	M	C	branco	não claro	não claros	não	não
32	DCG	68	F	C	branco	não claro	não claros	não	NA
33	MIAN	46	F	C	branco	não claro	não claros	não	não
34	JMP	50	M	C	branco	claro	não claros	sim	não
35	SML	63	F	C	branco	não claro	não claros	sim	não

36	LFS	73	F	P	não branco	não claro	não claros	não	não
37	CTL	42	F	P	não branco	não claro	não claros	não	não
38	MB	35	M	C	branco	claro	NA	sim	NA
39	CG	54	M	C	branco	claro	claros	sim	sim
40	RS	37	M	C	branco	NA	NA	não	não
41	MABH	53	F	C	branco	não claro	não claros	sim	não
42	JAN	63	M	C	branco	claro	não claros	não	não
43	RRB	40	F	C	branco	claro	claros	sim	não
44	ABS	68	F	C	branco	NA	NA	NA	não
45	HB	45	M	C	branco	NA	NA	sim	não
46	AB	71	M	C	branco	não claro	não claros	não	sim
47	MAS	71	F	C	branco	NA	NA	NA	não
48	MRS	70	M	C	branco	claro	claros	não	NA
49	MAAS	45	F	C	branco	claro	claros	sim	NA
50	ZSM	58	F	P	não branco	não claro	não claros	não	não
51	IBCP	61	F	C	branco	NA	NA	NA	não
52	NPPA	37	F	C	branco	não claro	não claros	sim	não
53	PAV	56	M	C	branco	NA	NA	não	não
54	MLF	58	F	C	branco	NA	NA	NA	sim
55	RMSM	32	F	C	branco	NA	NA	sim	não
56	SB	44	M	C	branco	claro	não claros	não	não
57	JB	64	M	C	branco	não claro	não claros	sim	não
58	EAFC	52	F	C	branco	NA	NA	sim	não
59	OZ	86	M	C	branco	NA	NA	sim	sim
60	PLF	32	F	C	branco	claro	não claros	sim	não
61	LSL	84	F	C	branco	NA	NA	não	não
62	HCZ	80	F	C	branco	NA	NA	sim	não
63	WC	49	M	C	branco	não claro	não claros	sim	não
64	AM	66	F	C	branco	NA	NA	não	não
65	RLAS	42	F	C	branco	não claro	não claros	sim	sim
66	RB	29	F	C	branco	não claro	não claros	sim	sim
67	AB	68	M	C	branco	NA	NA	não	sim
68	ADCN	55	M	C	branco	NA	NA	não	não
69	MPLS	69	M	C	branco	NA	NA	não	sim
70	LCSA	51	F	C	branco	NA	NA	NA	NA
71	ACF	62	F	C	branco	claro	não claros	sim	não
72	JCM	69	M	C	branco	NA	NA	NA	não
73	LFS	47	F	C	branco	NA	NA	sim	não
74	FC	71	M	C	branco	NA	NA	não	sim
75	ABM	60	F	C	branco	claro	não claros	não	não
76	VLADA	66	F	N	não branco	NA	NA	sim	não
77	ALA	47	M	C	branco	NA	NA	não	não
78	SMN	56	M	C	branco	claro	claros	não	não

79	WS	73	M	C	branco	claro	NA	não	sim
80	EAM	40	F	C	branco	NA	NA	não	não
81	ACM	72	F	C	branco	NA	NA	não	não
82	BF	56	M	C	branco	NA	NA	não	não
83	PJFO	55	M	C	branco	não claro	não claros	não	sim
84	IPO	56	F	N	não branco	não claro	não claros	sim	não
85	NLDT	24	F	C	branco	não claro	claros	sim	sim
86	BJP	65	M	N	não branco	não claro	não claros	sim	não
87	MCCT	41	F	C	branco	NA	NA	não	não
88	JV	72	M	C	branco	não claro	não claros	não	sim
89	JBO	79	M	C	branco	claro	não claros	sim	sim
90	FDC	38	M	C	branco	não claro	não claros	sim	sim
91	VSA	48	F	C	branco	não claro	claros	sim	não
92	ABG	78	F	C	branco	não claro	não claros	não	não
93	JDGM	63	M	C	branco	NA	NA	não	sim
94	EA	31	F	C	branco	NA	NA	não	não
95	RAS	64	M	C	branco	claro	claros	sim	sim
96	GM	68	M	C	branco	não claro	não claros	sim	sim
97	JAS	55	M	C	branco	NA	NA	sim	não
98	DSS	81	F	C	branco	NA	NA	não	não
99	JPNJ	42	M	C	branco	não claro	claros	sim	sim
100	GCB	47	F	N	branco	não claro	não claros	não	sim
101	JW	34	F	C	branco	não claro	claros	sim	sim
102	ND	64	M	C	branco	claro	claros	sim	sim
103	PN	73	M	C	branco	claro	claros	sim	sim
104	AS	46	M	C	branco	não claro	não claros	não	não
105	MCBR	56	F	C	branco	NA	NA	Não	não
106	VJ	51	M	C	branco	NA	NA	sim	sim
107	LSO	48	F	C	não branco	NA	NA	sim	sim
108	ELV	41	M	N	branco	NA	NA	sim	sim
109	JB2	40	M	C	branco	NA	NA	NA	não
110	HNO	61	F	C	branco	NA	NA	não	não
111	SRJ	56	M	C	branco	NA	NA	não	não
112	DCS	NA	F	C	NA	NA	NA	NA	
113	SLJF	51	M	C	branco	NA	NA	sim	sim
114	NCA	42	M	N	não branco	NA	não claros	não	sim
115	NA	76	M	C	branco	NA	NA	NA	sim
116	LFBS	34	F	C	branco	NA	NA	não	sim
117	LMM	71	F	C	branco	NA	NA	NA	não
118	JERS	63	M	C	branco	NA	NA	sim	não
119	LRCN	62	M	C	branco	NA	NA	sim	sim
120	AGO	50	M	C	branco	NA	NA	NA	não
121	MF	49	M	C	branco	não claro	não claros	sim	sim

122	ER	39	M	C	branco	não claro	não claros	não	não
123	JFPO	25	F	C	branco	não claro	não claros	sim	não
124	WJBF	56	M	C	branco	não claro	não claros	sim	sim
125	MEKS	45	F	A	branco	não claro	não claros	não	não
126	AF	78	M	C	branco	não claro	não claros	sim	sim
127	JCV	57	M	C	branco	não claro	não claros	sim	não
128	WSG	56	M	P	não branco	não claro	não claros	não	sim
129	IA	72	F	C	branco	NA	NA	não	não
130	MJS	72	M	C	branco	NA	NA	sim	não
131	MC	71	F	C	branco	não claro	não claros	não	sim
132	APS	78	F	C	branco	não claro	não claros	sim	não
133	AMMT	37	F	C	branco	não claro	não claros	sim	não
134	TSP	60	F	P	não branco	não claro	não claros	não	não
135	ICOS	51	M	C	branco	não claro	não claros	sim	não
136	VP	38	M	A	branco	não claro	não claros	não	não
137	ST	62	F	C	branco	não claro	não claros	não	não
138	LSP	80	M	C	branco	NA	NA	sim	não
139	BG	88	F	C	branco	claro	claros	sim	não
140	MLAS	50	M	C	branco	não claro	claros	não	sim
141	RJG	53	M	C	branco	não claro	não claros	sim	sim
142	CAB	41	M	C	branco	não claro	não claros	sim	não
143	JAM	60	M	C	branco	NA	NA	sim	sim
144	JARJ	44	M	C	branco	NA	NA	sim	não
145	AMLG	36	F	C	branco	não claro	não claros	sim	não
146	LWE	89	F	C	branco	NA	NA	sim	não
147	ETA	46	M	P	não branco	NA	NA	NA	não
148	TMM	24	F	C	branco	não claro	não claros	sim	não
149	ML	77	M	C	branco	NA	NA	NA	sim
150	APB	60	F	C	branco	claro	não claros	sim	não

F: feminino; M: masculino; C: caucasóide; N: negróide; NA: não avaliado

## ANEXO 6

Distribuição dos 150 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com presença de efélides, exposição solar, queimaduras solares e a incapacidade de bronzear

Nº	Iniciais	Efélides	Grau elastose solar	Queimadura Solar	Incapacidade Bronzear
1	AS	sim	III	NA	NA
2	AD	sim	NA	sim	NA
3	AAV	não	0	sim	NA
4	AC	sim	IV	não	NA
5	BGS	não	NA	não	sim
6	BJ	não	NA	não	não
7	BGL	sim	III	NA	sim
8	CO	não	0	não	não
9	CV	sim	III	sim	NA
10	CF	sim	IV	NA	NA
11	DSF	sim	0	sim	NA
12	EAM	NA	0	NA	NA
13	GMG	não	II	não	NA
14	JS	não	0	sim	NA
15	JGL	sim	NA	não	não
16	JDJ	sim	0	sim	NA
17	LPA	não	NA	não	NA
18	MPR	sim	III	não	NA
19	MLG	sim	0	NA	sim
20	MPB	sim	II	sim	NA
21	MSBM	não	0	sim	NA
22	OKG	sim	NA	não	sim
23	RFB	NA	I	NA	NA
24	RCCM	sim	I	sim	NA
25	RLL	sim	II	sim	não
26	RRS	sim	NA	não	não
27	SO	NA	I	NA	NA
28	VC2	sim	0	sim	sim
29	LMS	não	IV	não	NA
30	NPJ	não	III	NA	NA
31	MCS	não	III	não	não
32	DCG	sim	III	sim	NA
33	MIAN	sim	0	não	NA
34	JMP	não	I	não	NA

35	SML	sim	II	sim	NA
36	LFS	não	0	não	não
37	CTL	não	0	não	NA
38	MB	NA	0	NA	NA
39	CG	sim	III	sim	sim
40	RS	não	0	NA	NA
41	MABH	não	I	não	NA
42	JAN	sim	IV	não	NA
43	RRB	sim	NA	não	sim
44	ABS	NA	III	NA	NA
45	HB	sim	II	NA	NA
46	AB	sim	II	sim	não
47	MAS	NA	IV	NA	NA
48	MRS	sim	III	sim	NA
49	MAAS	não	I	sim	NA
50	ZSM	não	NA	não	não
51	IBCP	NA	IV	NA	NA
52	NPPA	não	0	não	NA
53	PAV	não	III	NA	NA
54	MLF	NA	NA	NA	NA
55	RMSM	NA	NA	NA	NA
56	SB	não	I	sim	NA
57	JB	não	NA	não	sim
58	EAFC	não	0	NA	NA
59	OZ	sim	IV	NA	NA
60	PLF	não	I	não	NA
61	LSL	sim	IV	NA	sim
62	HCZ	sim	IV	NA	sim
63	WC	não	IV	sim	não
64	AM	sim	IV	NA	NA
65	RLAS	não	I	não	NA
66	RB	não	0	não	sim
67	AB	não	IV	NA	sim
68	ADCN	NA	IV	NA	NA
69	MPLS	não	0	NA	NA
70	LCSA	NA	NA	NA	NA
71	ACF	sim	NA	não	não
72	JCM	NA	II	NA	NA
73	LFS	NA	II	NA	NA
74	FC	sim	IV	NA	NA
75	ABM	sim	III	não	NA
76	VLADA	sim	I	NA	NA
77	ALA	não	II	NA	NA

78	SMN	não	NA	não	sim
79	WS	sim	NA	NA	sim
80	EAM	não	II	sim	sim
81	ACM	não	III	NA	NA
82	BF	não	I	NA	NA
83	PJFO	não	NA	sim	sim
84	IPO	sim	NA	sim	não
85	NLDT	sim	NA	sim	sim
86	BJP	sim	NA	não	não
87	MCCT	não	I	NA	Na
88	JV	sim	0	não	não
89	JBO	sim	IV	não	sim
90	FDC	sim	NA	não	sim
91	VSA	sim	NA	não	não
92	ABG	não	I	sim	sim
93	JDGM	Não	NA	NA	NA
94	EA	NA	NA	NA	NA
95	RAS	sim	NA	sim	não
96	GM	sim	III	não	sim
97	JAS	não	III	NA	NA
98	DSS	sim	III	NA	NA
99	JPNJ	sim	NA	sim	sim
100	GCB	não	NA	não	sim
101	JW	sim	NA	sim	sim
102	ND	sim	NA	não	sim
103	PN	sim	NA	não	sim
104	AS	sim	NA	sim	não
105	MCBR	sim	I	NA	NA
106	VJ	não	II	NA	sim
107	LSO	NA	0	NA	NA
108	ELV	não	NA	NA	NA
109	JB2	NA	II	NA	NA
110	HNO	sim	III	sim	sim
111	SRJ	sim	NA	NA	NA
112	DCS	NA	NA	NA	NA
113	SLJF	sim	NA	NA	NA
114	NCA	não	0	NA	NA
115	NA	NA	NA	não	NA
116	LFBS	não	III	NA	NA
117	LMM	NA	III	NA	NA
118	JERS	sim	I	NA	NA
119	LRCN	NA	IV	NA	Na
120	AGO	NA	NA	NA	NA

121	MF	sim	NA	sim	sim
122	ER	sim	NA	sim	sim
123	JFPO	sim	NA	não	sim
124	WJBF	sim	NA	sim	não
125	MEKS	sim	NA	sim	não
126	AF	sim	NA	sim	sim
127	JCV	não	NA	sim	sim
128	WSG	não	NA	não	não
129	IA	sim	IV	NA	NA
130	MJS	não	II	NA	NA
131	MC	não	III	não	sim
132	APS	sim	NA	sim	não
133	AMMT	sim	NA	não	não
134	TSP	não	0	não	não
135	ICOS	não	I	sim	sim
136	VP	não	NA	NA	NA
137	ST	não	NA	sim	não
138	LSP	não	II	NA	NA
139	BG	sim	IV	não	sim
140	MLAS	não	NA	não	sim
141	RJG	não	II	não	não
142	CAB	sim	0	sim	sim
143	JAM	não	IV	NA	NA
144	JARJ	sim	0	NA	NA
145	AMLG	sim	NA	sim	sim
146	LWE	sim	IV	não	não
147	ETA	sim	NA	NA	NA
148	TMM	sim	0	não	não
149	ML	NA	IV	NA	NA
150	APB	sim	0	não	não

NA: não avaliado

## ANEXO 7

Distribuição dos 150 pacientes com melanoma cutâneo de acordo com a localização, o estágio TNM, as espessuras de Breslow e os níveis de Clark

Nº	Iniciais	Localização	TNM	Espessura Breslow	Índice Clark
1	AS	dorso	IIA	3,0	IV
2	AD	braço	Ia	0,2	I
3	AAV	pé	Ia	0,93	II
4	AC	face	IIb	4,0	IV
5	BGS	perna	IIIc	4,2	V
6	BJ	axila	IV	4,2	IV
7	BGL	braço	0	IS	I
8	CO	pé	IV	1,8	III
9	CV	perna	IIIa	2,4	III
10	CF	braço	Ib	0,65	II
11	DSF	dorso	IIb	2,6	II
12	EAM	dorso	IIIb	NA	III
13	GMG	braço	Ib	1,2	IV
14	JS	braço	Ia	0,7	III
15	JGL	pé	IIIb	1,7	IV
16	JDJ	tronco	Ib	0,9	III
17	LPA	perna	Ia	0,4	II
18	MPR	braço	IIIc	6,0	V
19	MLG	pé	Ib	0,87	IV
20	MPB	tronco	Ib	0,48	II
21	MSBM	coxa	IIa	2,04	III
22	OKG	face	Ia	0,35	II
23	RFB	dorso	Ib	1,00	IV
24	RCCM	dorso	Ia	0,34	II
25	RLL	ombro	Ia	0,3	II
26	RRS	coxa	Ib	1,4	III
27	SO	dorso	Ia	0,78	III
28	VC2	pescoço	IIb	3,9	IV
29	LMS	face	Ia	0,83	III
30	NPJ	braço	Ia	0,59	III
31	MCS	ombro	0	IS	I
32	DCG	braço	IIc	5,0	IV
33	MIAN	dorso	IIIc	2,9	IV

34	JMP	dorso	Ia	0,59	III
35	SML	pé	IIa	3,13	IV
36	LFS	pé	0	IS	I
37	CTL	pé	0	IS	I
38	MB	braço	0	IS	I
39	CG	dorso	0	IS	I
40	RS	braço	IIIb	3,64	IV
41	MABH	braço	Ia	0,69	II
42	JAN	face	0	IS	I
43	RRB	pé	Ib	1,00	III
44	ABS	dorso	IIC	5,6	IV
45	HB	dorso	IIC	5,0	IV
46	AB	tronco	IIIc	4	IV
47	MAS	pescoço	0	IS	I
48	MRS	tronco	0	IS	I
49	MAAS	braço	Ia	0,15	II
50	ZSM	abdome	IIa	1,5	III
51	IBCP	cabeça	IIa	1,7	IV
52	NPPA	dorso	Ia	0,27	II
53	PAV	dorso	Ia	0,70	III
54	MLF	costas	Ia	0,56	ii
55	RMSM	coxa	NA	NA	NA
56	SB	braço	Ia	0,48	II
57	JB	face	0	IS	I
58	E AFC	pé	Ia	0,79	II
59	OZ	face	IIC	7,83	V
60	PLF	tronco	IIb	2,5	IV
61	LSL	tronco	Ib	1,85	III
62	HCZ	face	Ia	0,97	III
63	WC	cabeça	Ia	0,38	II
64	AM	pescoço	0	IS	I
65	RLAS	dorso	IIb	3,9	III
66	RB	tronco	IIIb	4,5	IV
67	AB	face	IIC	6,3	V
68	ADCN	cabeça	Ia	0,16	II
69	MPLS	pé	Ib	1,63	IV
70	LCSA	perna	Ia	0,66	II
71	ACF	coxa	Ia	0,55	II
72	JCM	abdome	0	IS	I
73	LFS	perna	IIb	IS	I
74	FC	ombro	Ia	0,62	III
75	ABM	perna	IIb	3,2	IV
76	VLADA	perna	0	IS	I

77	ALA	tronco	IIa	1,27	IV
78	SMN	cabeça	Ib	0,8	III
79	WS	dorso	0	IS	I
80	EAM	perna	Ia	0,46	III
81	ACM	perna	IIb	2,3	III
82	BF	tronco	IIc	12	III
83	PJFO	cabeça	IIb	12,5	V
84	IPO	pé	IV	3,8	IV
85	NLDT	perna	IIIb	2,75	III
86	BJP	axila	IV	NA	NA
87	MCCT	perna	Ia	0,47	II
88	JV	mão	IIb	3,18	V
89	JBO	cabeça	IIc	5	IV
90	FDC	perna	IIIa	1,5	III
91	VSA	dorso	IIb	3,7	III
92	ABG	abdome	IIIc	2,8	IV
93	JDGM	dorso	IV	NA	NA
94	EA	ombro	Ia	0,5	II
95	RAS	braço	IV	2,5	IV
96	GM	dorso	Ib	1,14	III
97	JAS	dorso	IIb	3,7	III
98	DSS	SSP	IIIc	SP	SP
99	JPNJ	NA	IV	NA	NA
100	GCB	pé	IV	3,8	IV
101	JW	tronco	Ia	0,65	III
102	ND	braço	IV	9,4	IV
103	PN	dorso	IIIb	5	IV
104	AS	coxa	Ib	0,84	IV
105	MCBR	costas	Ib	1,87	IV
106	VJ	tronco	Ia	0,78	III
107	LSO	pé	0	IS	I
108	ELV	SSP	IIIB	NA	NA
109	JB2	dorso	IIA	3	IV
110	HNO	perna	NA	2,48	V
111	SRJ	pescoço	IA	0,35	II
112	DCS	NA		NA	NA
113	SLJF	dorso	Ia	NA	I
114	NCA	pé	0	NA	I
115	NA	braço	IIC	5,4	III
116	LFBS	face	IIA	2,95	IV
117	LMM	dorso	IIIB	10	V
118	JERS	dorso	IIC	4,3	IV
119	LRCN	abdome	IIIC	12	IV

120	AGO	dorso	IIC	9	IV
121	MF	perna	IIIA	2	IV
122	ER	face	NA	2,3	NA
123	JFPO	glúteo	IV	1,2	III
124	WJBF	perna	IIIC	0,6	III
125	MEKS	perna	IIIB	1,6	III
126	AF	cabeça	IIB	5	IV
127	JCV	cabeça	IV	4	V
128	WSG	pé	IV	5	IV
129	IA	braço	IA	0,28	II
130	MJS	dorso	IB	1,25	III
131	MC	costas	IV	2,6	III
132	APS	pé	IIC	5	V
133	AMMT	braço	IA	0,7	II
134	TSP	pé	IIIC	2	IV
135	ICOS	braço	IIA	3,6	IV
136	VP	pé	IB	1,35	III
137	ST	dorso	IIIB	2,3	III
138	LSP	perna	IIA	2,8	IV
139	BG	ombro	IIC	7,8	IV
140	MLAS	pé	IIIA	1,4	III
141	RJG	dorso	IA	0,28	II
142	CAB	braço	IA	1,2	IV
143	JAM	braço	IB	1,45	IV
144	JARJ	braço	IB	1,15	I
145	AMLG	dorso	IB	1,4	IV
146	LWE	face	0	is	I
147	ETA	abdome	IIIB	1,8	IV
148	TMM	face	IIC	8	III
149	ML	face	0	IS	I
150	APB	coxa	IIA	1,8	III

SSP: sem sítio primário; IS: “*in situ*”

## ANEXO 8

Distribuição dos 150 pacientes com melanoma cutâneo de acordo os genótipos dos polimorfismos

*P53* Arg72Pro, *MDM2* T309G, *BCL2* C(-938)A, *BAX* G(-248)A e a expressão da proteína mdm2

Nº	Iniciais	<i>P53</i> Arg72Pro	<i>MDM2</i> T309G	<i>BCL2</i> C(-938)A	<i>BAX</i> G(-248)A	Intensidade	%	Escore final
1	AS	Arg/Pro	GG	AA	GG	3	4	7
2	AD	Pro/Pro	TG	CA	GG	NA	NA	NA
3	AAV	Arg/Arg	TT	AA	GA	3	4	7
4	AC	Pro/Pro	TG	CA	GG	3	4	7
5	BGS	Arg/Arg	TG	CA	GG	NA	NA	NA
6	BJ	Arg/Arg	TG	CA	GG	NA	NA	NA
7	BGL	Arg/Arg	TG	CC	GG	NA	NA	NA
8	CO	Arg/Arg	TG	CC	GG	NA	NA	NA
9	CV	Arg/Arg	TG	CA	GG	NA	NA	NA
10	CF	Arg/Arg	TG	CA	GG	3	4	7
11	DSF	Arg/Arg	TT	CC	GG	NA	NA	NA
12	EAM	Arg/Arg	TT	CA	GG	NA	NA	NA
13	GMG	Arg/Pro	TG	CA	GG	2	4	6
14	JS	Arg/Arg	TT	CA	GG	3	4	7
15	JGL	Arg/Pro	TT	AA	GG	NA	NA	NA
16	JDJ	Arg/Pro	TT	AA	GG	NA	NA	NA
17	LPA	Arg/Arg	TG	AA	GG	3	4	7
18	MPR	Arg/Arg	TT	AA	GG	NA	NA	NA
19	MLG	Arg/Arg	TT	CA	GG	NA	NA	NA
20	MPB	Arg/Arg	GG	CA	GA	3	4	7
21	MSBM	Arg/Arg	TG	CC	GG	NA	NA	NA
22	OKG	Arg/Arg	TG	CA	GG	NA	NA	NA
23	RFB	Arg/Arg	TG	CC	GG	3	4	7
24	RCCM	Arg/Pro	TT	CA	GG	3	4	7
25	RLL	Arg/Arg	TG	CC	GG	NA	NA	NA
26	RRS	Arg/Arg	GG	CA	GA	NA	NA	NA
27	SO	Arg/Arg	GG	AA	GA	2	4	6
28	VC2	Arg/Pro	TG	AA	GG	NA	NA	NA
29	LMS	Arg/Pro	GG	CA	GG	3	4	
30	NPJ	Arg/Arg	TG	AA	GA	3	4	7
31	MCS	Arg/Arg	TT	CA	GG	NA	NA	NA
32	DCG	Arg/Pro	TG	AA	GG	0	0	0
33	MIAN	Arg/Arg	TG	CC	GA	NA	NA	NA
34	JMP	Arg/Pro	TG	CA	GG	NA	NA	NA

35	SML	Arg/Arg	TT	AA	GG	3	4	7
36	LFS	Arg/Arg	GG	CC	GG	NA	NA	NA
37	CTL	Arg/Arg	TT	CA	GG	NA	NA	NA
38	MB	Arg/Pro	TT	AA	GG	3	4	7
39	CG	Arg/Arg	TG	CA	GG	3	4	7
40	RS	Arg/Arg	TT	CA	GG	NA	NA	NA
41	MABH	Pro/Pro	TG	CA	GG	NA	NA	NA
42	JAN	Arg/Pro	TG	CC	GG	3	4	7
43	RRB	Arg/Pro	TT	CA	GA	NA	NA	NA
44	ABS	Arg/Arg	TT	CA	GG	NA	NA	NA
45	HB	Arg/Pro	TG	CC	GG	3	4	7
46	AB	Arg/Arg	TT	CA	GG	2	3	5
47	MAS	Arg/Arg	TG	CA	GG	3	4	7
48	MRS	Arg/Arg	TG	AA	GG	NA	NA	NA
49	MAAS	Arg/Arg	TT	AA	GG	NA	NA	NA
50	ZSM	Arg/Arg	TG	AA	GG	NA	NA	NA
51	IBCP	Arg/Pro	TT	AA	GG	3	4	7
52	NPPA	Arg/Pro	TG	CC	GG	NA	NA	NA
53	PAV	Arg/Arg	TT	CC	GG	2	4	6
54	MLF	Arg/Pro	TT	CA	GG	NA	NA	NA
55	RMSM	Arg/Pro	TG	CA	GG	NA	NA	NA
56	SB	Pro/Pro	TT	CC	GA	NA	NA	NA
57	JB	Arg/Arg	GG	CC	GA	NA	NA	NA
58	EAFC	Arg/Pro	TG	CC	GG	3	4	7
59	OZ	Arg/Arg	TG	CC	GG	1	4	5
60	PLF	Arg/Arg	GG	CA	GG	3	4	7
61	LSL	Arg/Arg	TG	CA	GG	2	4	6
62	HCZ	Arg/Arg	GG	AA	GG	3	4	7
63	WC	Arg/Arg	TT	CA	GA	3	4	7
64	AM	Arg/Pro	TG	CC	GG	NA	NA	NA
65	RLAS	Arg/Arg	GG	AA	GG	1	1	2
66	RB	Arg/Pro	TG	CA	GG	NA	NA	NA
67	AB	Arg/Arg	TG	CA	GG	2	4	6
68	ADCN	Arg/Arg	TT	CA	GG	2	3	5
69	MPLS	Arg/Arg	TG	CC	GG	NA	NA	NA
70	LCSA	Arg/Pro	TT	CA	GA	NA	NA	NA
71	ACF	Arg/Pro	TG	CC	GG	NA	NA	NA
72	JCM	Arg/Arg	TT	CA	GA	2	4	6
73	LFS	Arg/Arg	GG	CA	GG	NA	NA	NA
74	FC	Arg/Arg	TG	CC	GA	NA	NA	NA
75	ABM	Arg/Pro	TT	CA	GA	2	4	6
76	VLADA	Arg/Pro	TG	AA	GG	0	0	0
77	ALA	Arg/Pro	TT	CA	GG	2	4	6

78	SMN	Arg/Arg	TG	AA	GG	NA	NA	NA
79	WS	Arg/Arg	TG	CA	GG	NA	NA	NA
80	EAM	Arg/Arg	TT	CC	GG	3	4	7
81	ACM	Arg/Pro	GG	CA	GA	0	0	0
82	BF	Pro/Pro	TG	AA	GG	NA	NA	NA
83	PJFO	Arg/Arg	TG	CA	GG	NA	NA	NA
84	IPO	Arg/Pro	TT	CC	GA	NA	NA	NA
85	NLDT	Arg/Arg	GG	CC	GG	NA	NA	NA
86	BJP	Arg/Arg	GG	AA	GG	NA	NA	NA
87	MCCT	Arg/Arg	TG	AA	GA	NA	NA	NA
88	JV	Arg/Arg	TG	AA	GA	NA	NA	NA
89	JBO	Arg/Arg	TT	CA	GG	2	4	6
90	FDC	Arg/Pro	TG	CC	GG	NA	NA	NA
91	VSA	Arg/Arg	TG	CC	GG	NA	NA	NA
92	ABG	Arg/Arg	TT	CA	GG	0	0	0
93	JDGM	Arg/Arg	TT	CA	GA	NA	NA	NA
94	EA	Arg/Pro	TG	CA	GG	NA	NA	NA
95	RAS	Arg/Pro	TG	AA	GG	NA	NA	NA
96	GM	Arg/Arg	TG	CA	GG	3	4	7
97	JAS	Arg/Arg	TG	CA	GG	0	0	0
98	DSS	Arg/Pro	TG	CC	GG	1	1	2
99	JPNJ	Arg/Arg	TG	CA	GA	NA	NA	NA
100	GCB	Arg/Pro	TG	AA	GG	NA	NA	NA
101	JW	Arg/Arg	TT	CC	GG	NA	NA	NA
102	ND	Arg/Arg	GG	AA	GG	NA	NA	NA
103	PN	Arg/Pro	TT	AA	GG	NA	NA	NA
104	AS	Arg/Arg	TT	CA	GG	3	4	7
105	MCBR	Arg/Pro	TT	CA	GG	3	4	7
106	VJ	Arg/Arg	TT	AA	GG	2	4	6
107	LSO	Pro/Pro	TG	AA	GG	1	2	3
108	ELV	Arg/Arg	TT	AA	GG	NA	NA	NA
109	JB2	Arg/Arg	TG	CA	GA	NA	NA	NA
110	HNO	Arg/Arg	TG	CC	GG	NA	NA	NA
111	SRJ	Arg/Arg	TT	AA	GG	NA	NA	NA
112	DCS	Pro/Pro	TG	CA	GA	NA	NA	NA
113	SLJF	Arg/Arg	GG	AA	GG	2	4	6
114	NCA	Pro/Pro	TT	CC	GA	3	4	7
115	NA	Arg/Arg	GG	CA	GG	NA	NA	NA
116	LFBS	Arg/Arg	TG	CC	GG	NA	NA	NA
117	LMM	Arg/Arg	TT	AA	GG	2	4	6
118	JERS	Arg/Pro	TG	CA	GG	2	2	4
119	LRCN	Pro/Pro	TG	CA	GG	3	2	5
120	AGO	Arg/Arg	TG	AA	GG	NA	NA	NA

121	MF	Arg/Arg	TG	CA	GG	NA	NA	NA
122	ER	Arg/Pro	TG	CA	GA	NA	NA	NA
123	JFPO	Arg/Arg	GG	AA	GG	NA	NA	NA
124	WJBF	Pro/Pro	GG	CA	GG	NA	NA	NA
125	MEKS	Arg/Pro	TG	CC	GG	NA	NA	NA
126	AF	Arg/Arg	TG	CA	GA	NA	NA	NA
127	JCV	Arg/Arg	TT	AA	GG	2	4	6
128	WSG	Pro/Pro	TT	CA	GG	2	4	6
129	IA	Arg/Arg	TG	CC	GG	3	4	7
130	MJS	Arg/Arg	TT	CA	GG	NA	NA	NA
131	MC	Arg/Pro	TT	AA	GG	NA	NA	NA
132	APS	Arg/Pro	TG	CA	GG	3	4	7
133	AMMT	Arg/Pro	TT	CA	GG	NA	NA	NA
134	TSP	Arg/Pro	TT	CC	GA	2	4	6
135	ICOS	Arg/Arg	TG	CA	GG	NA	NA	NA
136	VP	Arg/Pro	TT	CA	GG	NA	NA	NA
137	ST	Arg/Pro	TG	CA	GG	NA	NA	NA
138	LSP	Arg/Pro	TT	CC	GG	3	4	7
139	BG	Arg/Arg	TG	CC	GG	NA	NA	NA
140	MLAS	Pro/Pro	TG	CA	GG	NA	NA	NA
141	RJG	Arg/Pro	TT	CA	GG	3	4	7
142	CAB	Arg/Arg	TG	AA	GA	NA	NA	NA
143	JAM	Arg/Pro	TT	CA	GG	NA	NA	NA
144	JARJ	Arg/Arg	TG	CA	GG	NA	NA	NA
145	AMLG	Arg/Pro	TG	AA	GG	NA	NA	NA
146	LWE	Arg/Pro	TG	CA	GA	NA	NA	NA
147	ETA	Arg/Pro	TT	AA	GG	NA	NA	NA
148	TMM	Arg/Arg	TT	AA	GA	NA	NA	NA
149	ML	Pro/Pro	GG	CC	GG	NA	NA	NA
150	APB	Arg/Arg	TT	CA	GA	NA	NA	NA

**P53**: ArgArg genótipo homozigoto selvagem, Arg/Pro genótipo heterozigoto, Pro/Pro genótipo homozigoto variante; **MDM2**: TT genótipo homozigoto selvagem, TG genótipo heterozigoto, GG genótipo homozigoto variante; **BCL2**: CC genótipo homozigoto selvagem, CA genótipo heterozigoto, AA genótipo homozigoto variante; **BAX**: GG genótipo homozigoto selvagem, GA genótipo heterozigoto, AA genótipo homozigoto variante, **Intensidade de marcação**: Grau 0 negativo, Grau 1 fraca, Grau 2 moderada, Grau 3 forte, **Porcentagem de células marcadas**: Grau 0 ausência, Grau 1 até 10%, Grau 2 até 40%; Grau 3 até 70% e Grau 4 até 100%; Escore final de expressão: somatória dos graus de intensidade de porcentagem, valores de 0, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

## ANEXO 9

Distribuição dos 150 controles de acordo com idade, sexo, raça, genótipos dos polimorfismos dos genes *P53* Arg72Pro, *MDM2* T309G, *BCL2* C(-938)A, *BAX* G(-248)A

Nº	Iniciais	Idade	Sexo	Raça	<i>P53</i> Arg72Pro	<i>MDM2</i> T309G	<i>BCL2</i> C(-938)A	<i>BAX</i> G(-248)A
1	MARC	57	F	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
2	PBS	51	M	C	Arg/Arg	GG	CC	GG
3	SMS	54	M	N	Pro/Pro	TT	CC	GG
4	MLVS	57	F	C	Pro/Pro	TT	CA	GG
5	MHPS	51	F	C	Arg/Arg	TT	CA	GG
6	EPT	59	M	N	Arg/Pro	TT	CA	GG
7	NPS	55	M	C	Arg/Pro	TT	CC	GG
8	NGAB	50	F	C	Arg/Pro	TT	CA	GA
9	MVG	57	M	C	Arg/Arg	TT	AA	GG
10	FB	54	M	C	Arg/Arg	GG	CC	GG
11	WMC	52	M	C	Arg/Arg	TG	AA	GG
12	JFN	59	M	C	Arg/Pro	TT	CC	GG
13	NMJG	53	F	C	Arg/Pro	GG	CC	GG
3144	JC	52	M	C	Arg/Arg	TT	CA	GG
15	CD	54	M	C	Arg/Pro	TG	CC	GG
16	BE	53	M	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
17	JAS	51	M	N	Arg/Pro	TT	CA	GA
18	CSF	52	F	C	Arg/Arg	TT	CA	GA
19	JFS	57	M	C	Arg/Arg	TG	AA	GG
20	ET	55	M	C	Arg/Arg	TT	CC	GG
21	JRC	50	M	C	Arg/Arg	TT	AA	GG
22	ANP	56	M	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
23	JCS	50	M	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
24	OJ	58	M	C	Arg/Arg	GG	AA	GA
25	VO	50	M	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
26	LTG	51	F	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
27	JML	50	M	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
28	HJM	50	M	C	Arg/Pro	TT	CA	GG
29	MC	55	M	C	Arg/Arg	TT	AA	GA
30	MN	53	M	C	Arg/Pro	TG	CC	GG
31	ADC	52	M	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
32	APM	56	M	C	Arg/Arg	GG	CC	GG
33	JBBM	51	M	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
34	MLS	56	F	C	Arg/Arg	TG	AA	GG
35	MGB	54	M	C	Arg/Pro	TG	CC	GG

36	GPS	51	M	C	Arg/Pro	TG	CC	GA
37	EBN	52	M	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
38	UT	50	M	C	Arg/Arg	TT	CA	GG
39	JGS	53	M	C	Arg/Pro	TT	CC	GA
40	JGAS	55	M	C	Arg/Arg	GG	CA	GG
41	PJS	55	M	C	Arg/Arg	TG	CC	GG
42	ASL	57	F	C	Arg/Pro	TT	CA	GA
43	DAS	53	M	C	Arg/Arg	GG	AA	GG
44	JRC	51	M	C	Arg/Pro	TT	CC	GG
45	JPS	55	M	C	Arg/Pro	TG	AA	GG
46	JCL	53	M	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
47	IRP	56	F	C	Arg/Pro	TG	CA	GA
48	LAS	56	F	C	Arg/Arg	TT	CA	GA
49	AVG	52	F	C	Arg/Pro	TT	AA	GG
50	JMS	53	F	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
51	VSPF	56	F	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
52	JAF	59	M	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
53	JAC	58	M	C	Arg/Arg	TG	CC	GG
54	AD	52	M	C	Arg/Arg	TT	AA	GA
55	HCL	56	F	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
56	LGO	57	M	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
57	WMS	57	M	C	Arg/Pro	TT	CC	GG
58	RBAN	56	M	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
59	ABS	51	M	C	Arg/Arg	TT	CA	GG
60	MABB	51	F	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
61	TAF	50	F	C	Arg/Arg	GG	CA	GA
62	FLGF	50	M	C	Arg/Arg	GG	AA	GA
63	CJF	52	M	C	Arg/Pro	TG	AA	GA
64	LGT	59	M	C	Arg/Pro	TG	AA	GA
65	MCP	50	F	C	Arg/Arg	TT	CA	GA
66	JPML	52	M	C	Arg/Arg	TT	AA	GG
67	HPL	58	M	N	Arg/Arg	TG	CC	GG
68	JSN	58	M	C	Arg/Arg	GG	CA	GG
69	AS	51	M	C	Pro/Pro	TT	CC	GG
70	JSFP	50	M	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
71	SPU	50	F	C	Arg/Pro	TT	CC	GG
72	CAP	50	M	C	Arg/Pro	TT	AA	GA
73	SFR	56	M	C	Arg/Pro	GG	AA	GG
74	BA	56	M	C	Pro/Pro	TT	CC	GG
75	JPA	57	M	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
76	RRE	55	M	C	Arg/Pro	TG	AA	GG
77	MPM	59	F	C	Arg/Arg	TG	AA	GG
78	MJGJ	51	F	N	Arg/Arg	TG	CA	GG

79	RFM	58	M	C	Arg/Arg	TT	AA	GA
80	LC	56	M	C	Arg/Pro	TG	CC	GG
81	ECB	49	F	C	Pro/Pro	GG	CA	GA
82	MJB	58	M	C	Arg/Arg	TT	AA	GG
83	LASB	55	M	C	Arg/Arg	GG	CA	GG
84	MHP	60	M	C	Arg/Pro	TG	AA	GG
85	OC	51	M	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
86	JDS	60	M	C	Pro/Pro	TT	CA	GG
87	IF	57	M	C	Pro/Pro	TT	CC	GA
88	WF	60	M	C	Arg/Pro	TT	CC	GG
89	JS	54	M	C	Arg/Pro	TT	CA	GG
90	KK	56	M	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
91	JPLF	52	M	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
92	JMS	50	M	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
93	CM	59	M	C	Arg/Arg	TT	CC	GG
94	MS	54	M	C	Arg/Pro	TG	CA	GA
95	CR	51	F	C	Arg/Pro	GG	CA	GG
96	AFDO	59	F	N	Arg/Pro	TT	CC	GG
97	ZF	54	F	C	Arg/Arg	TG	CC	GG
98	ESR	60	M	N	Pro/Pro	TT	CC	GG
99	TJPR	54	F	C	Arg/Pro	TT	CC	GG
100	AP	59	M	C	Arg/Arg	GG	CA	GG
101	AR	58	M	C	Arg/Pro	TG	CC	GG
102	MCT	58	F	C	Arg/Arg	TT	CA	GG
103	CM	54	F	C	Pro/Pro	TT	CA	GG
104	AAZ	57	F	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
105	IMLC	52	F	C	Arg/Arg	TG	CC	GG
106	TFM	53	F	C	Arg/Arg	TT	CA	GG
107	MACG	52	F	C	Arg/Pro	GG	CA	GA
108	MARSM	50	F	C	Arg/Arg	TG	CC	GG
109	EPI	58	F	C	Arg/Pro	TT	CA	GA
110	DMB	54	F	C	Arg/Arg	GG	CA	GG
111	CMC	50	F	C	Pro/Pro	TG	CC	GG
112	EAB	55	F	C	Arg/Arg	TT	CA	GG
113	ONISM	52	F	C	Arg/Arg	TT	CA	GG
114	BA	55	F	C	Arg/Pro	TT	CA	GG
115	GSPS	56	F	C	Arg/Arg	TG	CC	GG
116	MSOR	54	F	C	Arg/Pro	TG	CC	GG
117	BMSJ	54	F	C	Arg/Arg	TT	CC	GG
118	EF	60	F	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
119	GMC	58	F	C	Arg/Arg	GG	CA	GG
120	MSCO	53	F	C	Arg/Pro	TG	CA	GA
121	NRP	52	F	C	Arg/Pro	TG	CA	GA

122	MJC	53	F	C	Arg/Pro	TT	AA	GG
123	SCM	56	F	C	Arg/Pro	TT	CA	GG
124	MDAL	52	F	C	Arg/Pro	TG	CC	GG
125	DAA	53	F	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
126	LFC	53	F	C	Arg/Pro	GG	CC	GA
127	MLGF	55	F	C	Arg/Pro	TT	CA	GG
128	MGR	56	F	C	Arg/Arg	TG	CA	GA
129	MHZ	54	F	C	Arg/Pro	TT	CA	GA
130	MHS	51	F	C	Arg/Arg	TT	CC	GA
131	SBSF	55	F	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
132	MAR	40	F	C	Arg/Pro	TG	CC	GG
133	MLMG	43	F	C	Arg/Pro	TT	CA	GA
134	PAP	23	F	N	Pro/Pro	TG	CA	GA
135	JK	36	F	C	Arg/Pro	TT	CA	GG
136	SRAN	30	F	N	Arg/Arg	GG	CA	GG
137	ACML	25	F	N	Pro/Pro	TT	CC	GA
138	ALP	43	F	C	Arg/Pro	TT	CA	GG
139	CBSL	50	F	N	Pro/Pro	TG	CA	GG
140	SRSS	27	F	N	Arg/Pro	TG	CA	GG
141	ARR	43	F	C	Arg/Pro	TG	CA	GG
142	MPB	52	F	C	Pro/Pro	TG	CC	GA
143	SSS	32	F	C	Arg/Arg	TT	CA	GA
144	MFS	25	F	C	Pro/Pro	TG	CA	GG
145	MSCO	59	F	C	Arg/Arg	TG	CA	GA
146	ASL	43	F	C	Arg/Pro	TG	CC	GG
147	RARB	40	F	C	Pro/Pro	TG	CA	GA
148	CAVS	38	F	C	Arg/Arg	GG	CC	GG
149	MRCS	39	F	C	Arg/Arg	TG	CA	GG
150	AMSJL	31	F	C	Arg/Pro	TT	CC	GG

**P53**: ArgArg genótipo homozigoto selvagem, Arg/Pro genótipo heterozigoto, Pro/Pro genótipo homozigoto variante; **MDM2**: TT genótipo homozigoto selvagem, TG genótipo heterozigoto, GG genótipo homozigoto variante; **BCL2**: CC genótipo homozigoto selvagem, CA genótipo heterozigoto, AA genótipo homozigoto variante; **BAX**: GG genótipo homozigoto selvagem, GA genótipo heterozigoto, AA genótipo homozigoto variante