

Fernanda de Toledo Gonçalves

**Genes de reparo do DNA e de
susceptibilidade genética em pacientes
com melanoma maligno**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Dra Gilka Jorge Figaro Gattás

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalves, Fernanda de Toledo

Genes de reparo do DNA e de susceptibilidade genética em pacientes com melanoma maligno / Fernanda de Toledo Gonçalves. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Gilka Jorge Fígaro Gattás.

Descritores: 1.Melanoma 2.Polimorfismo genético 3.Reparo do DNA
4.Xenobióticos/metabolismo 5.Receptor de vitamina D

USP/FM/SBD-411/09

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha família, sempre presente, me apoiando e me incentivando em todos os momentos com muito carinho.

À minha mãe, eterna ídola e ensinadora da vida, a quem devo todas as oportunidades dadas a minha pessoa, no auxílio das escolhas e decisões certas, às suas sábias palavras, ao direcionamento correto, aos caminhos que me mostra, aos princípios que me passa e ao amor incondicional que me dedica

Ao meu grande amor, Rodrigo, pelo carinho e amor irrestrito que me oferece, à força que me dá, a paciência, tolerância e compreensão que possuí em todos meus bons e maus momentos, ao incentivo, à racionalidade que me falta.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas constantes oportunidades.

A Profa. Dra. Gilka Jorge Fígaro Gattás pela valiosa orientação, pelas oportunidades de crescimento a mim concedidas, pelo exemplo e incentivo profissional, pelas imprescindíveis sugestões e pela amizade e carinho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo custeio dos meus estudos e apoio financeiro ao desenvolvimento do Projeto de Pesquisa.

Ao LIM40 do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo espaço e infraestrutura concedidos e apoio financeiro de parte da experimentação laboratorial.

Aos hospitais AC Camargo, Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) e as Clínicas de Dermatologia, Ortopedia e Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela colaboração essencial e pelas portas abertas para que esta pesquisa pudesse ser executada.

Aos pacientes dos grupos de casos e controles, pela aceitação e colaboração em participarem da presente pesquisa e compreensão da importância do estudo.

À Profa. Dra. Cíntia Fridman, que além de exemplo é uma grande amiga que não mede ajuda e sempre me apóia profissionalmente.

À amiga Priscila Kohler, pela paciência e ensinamentos, pela amizade e exemplo de pessoa batalhadora.

Aos técnicos Marcelo, Estela e Simone Kneip, pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa.

À toda equipe do Projeto “Melanoma”, em especial ao coordenador Prof. Dr. José Eluf Neto, pelo empenho, criteriosas sugestões e incentivo.

À amiga Fernanda Shimabukuro, pelo auxílio, incentivo e horas de estudo no aprendizado sobre o melanoma, ao companheirismo e amizade dedicada.

Aos amigos, colegas e funcionários do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica, Medicina Social e do Trabalho, pelo saudável convívio, incentivo e companheirismo.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos clínicos do Melanoma e condutas terapêuticas	3
1.2	Epidemiologia do melanoma	7
1.3	Fatores de risco do melanoma cutâneo maligno.....	9
1.4	Polimorfismos genéticos no melanoma.....	14
1.4.1	Polimorfismos de genes de reparo do DNA.....	15
1.4.2	Polimorfismos de genes de metabolização de xenobióticos.....	18
1.4.3	Polimorfismos do gene receptor de vitamina D	23
2	OBJETIVOS	26
3	MÉTODOS	28
3.1	Casuística	29
3.1.1	Metodologia de Seleção de Casos e Controles.....	29
3.2	Entrevistas	30
3.3	Extração de DNA e pesquisa dos polimorfismos	32
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS	48
5.1	População do estudo	49
5.2	Característica do tumor nos pacientes com melanoma	50

5.3	Características da população de estudo	51
5.4	Análise dos polimorfismos genéticos	60
5.5	Análise da contribuição dos polimorfismos genéticos e variáveis individuais e do meio ambiente.	69
5.6	Análise de Regressão Logística	73
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	104
8	REFERÊNCIAS	107

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Graus Celsius

APEX1 - Apurinic/apyrimidinic Endonuclease class 1

Arg - Arginina

ASIP - Proteína Sinalizadora de Agouti

ATP - Adenosina Trifosfato

BER - Reparo por Excisão de Base

BRAF - V-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1

BRCA2 - Breast Cancer 2

CCND1 - Ciclina D1

CDDP - Cisplatina

CDK4 - Ciclina Dependente de Kinase 4

CDKN2A - Inibidor de Kinase Ciclina Dependente 2A

CSB - Cockayne Syndrome B

CYP - Citocromo P450

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DSB - Double Strand Breaks

DTIC - Dacarbazina

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

*ERCC1 - Excision Repair Cross-complementing Rodent Repair Deficiency,
group 1*

Gln - Glutamina

GST - Glutathione S-Transferase

IC 95% - Intervalo de Confiança de 95%

Ile - Interleucina

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LIM - Laboratório de Investigação Médica

Lys - Lisina

MAL - Melanoma Acrolentiginoso

MC1R - Receptor de Melanocortina 1

MÊS - Melanoma Expansivo Superficial

Met - Metionina

MM - Melanoma Maligno

MN - Melanoma Nodular

NER - Reparo por Excisão de Nucleotídeo

OGG1-8 - oxoguanine DNA Glycosylase

OR - Odds Ratio

PCR - Reacção em Cadeia da Polimerase

RNA - Ácido ribonucléico

ROS - Espécie Reativa de Oxigênio

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*

SPF - Fator de proteção solar

SSB - *Single Strand Breaks*

SUS - Sistema Único de Saúde

TFIIH - Fator de Transcrição Hormonal II

Thr - Treonina

Trp - Triptofano

TYR - Tirosinase

UV - Ultravioleta -

UVA - Ultravioleta A

UVB - Ultravioleta B

Val - Valina

VDR - Receptor de Vitamina D

VDRE - Elementos de Resposta a Vitamina D

WHO - *World Health Organization*

XPC - Xeroderma Pigmentosum C

XPD - Xeroderma Pigmentosum D

XPF - Xeroderma Pigmentosum F

XRCC1 - X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1

XRCC2 - X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 2

XRCC3 - X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Distribuição das características histopatológicas do tumor de pacientes com melanoma, de acordo com a classificação de Clark e índice de Breslow	50
Tabela 2:	Distribuição de fatores individuais e demográficos avaliados nos 193 pacientes com melanoma e nos 208 controles	54
Tabela 3:	Distribuição das características fenóticas entre pacientes com melanoma e controles	55
Tabela 4:	Histórico de exposição solar e radiação artificial relatado pelos pacientes com melanoma e pelos controles.....	58
Tabela 5:	Antecedentes clínico-dermatológicos relatados pelos pacientes com melanoma e pelos controles	59
Tabela 6:	Freqüências alélicas e distribuição genotípica do <i>CYP1A1/Mspl</i> , <i>CYP2E1/PstI</i> , <i>GSTP1/Bsma</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>XRCC1/Mspl</i> , <i>XRCC3/NcoI</i> , <i>XPd/PstI</i> , <i>VDR/FokI</i> e <i>VDR/TaqI</i> no grupo controle	61
Tabela 7:	Freqüências alélicas e distribuição genotípica do <i>CYP1A1/Mspl</i> , <i>CYP2E1/PstI</i> , <i>GSTP1/Bsma</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>XRCC1/Mspl</i> , <i>XRCC3/NcoI</i> , <i>XPd/PstI</i> , <i>VDR/FokI</i> e <i>VDR/TaqI</i> no grupo de pacientes com melanoma	62
Tabela 8:	Distribuição da freqüência (%) de polimorfismos de genes das fases I e II de metabolização, a saber, <i>CYP1A1/Mspl</i> , <i>CYP2E1/PstI</i> , <i>GSTP1/Bsma</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> , nos pacientes com melanoma e nos controles	64
Tabela 9:	Distribuição das interações gene-gene das enzimas de metabolização de fase I (CYPs) e fase II (GSTs) nos pacientes com melanoma maligno e nos controles	65
Tabela 10:	Distribuição da freqüência (%) de polimorfismos dos genes de reparo <i>XRCC1/Mspl</i> , <i>XRCC3/NcoI</i> e <i>XPd/PstI</i> nos pacientes portadores de melanoma e nos controles.....	66
Tabela 11:	Distribuição das interações gene-gene dos polimorfismos dos genes de reparo do DNA <i>XRCC1/194/Mspl</i> , <i>XRCC1/399/Mspl</i> , <i>XRCC3/NcoI</i> e <i>XPd/PstI</i> nos pacientes com melanoma maligno e controles	67

Tabela 12: Distribuição da frequência (%) de polimorfismos no gene receptor de vitamina D (<i>VDR/FokI</i> e <i>VDR/TaqI</i>) nos pacientes portadores de melanoma e nos controles.....	68
Tabela 13: Contribuição de características fenotípicas, ascendência e antecedentes clínico-dermatológicos que mostraram associação positiva para alguns polimorfismos genéticos estudados no melanoma maligno considerando os pacientes com a doença e os controles	70
Tabela 14: Contribuição do fototipo cutâneo, histórico de exposição e proteção solar e exposição à radiação artificial que mostraram associação positiva para alguns polimorfismos genéticos estudados no melanoma maligno considerando os pacientes com a doença e controles.....	72
Tabela 15. Resultado da análise de regressão logística múltipla e escalonada com as variáveis de exposição, histórico clínico-dermatológico e a variável genética que influenciaram o risco de melanoma.....	74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Produto da reação de PCR-RFLP para CYP1A1/Mspl, analisado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo.....33
- Figura 2.** Produto da reação de PCR-RFLP para CYP2E1/PstI analisado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo.....34
- Figura 3.** Produto da reação de PCR-RFLP para GSTP1/BsmI analisado em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata.....35
- Figura 4.** Produto da reação multiplex de PCR para GSTT1 e GSTM1, analisado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo.....37
- Figura 5.** Produto da reação de PCR-RFLP multiplex para XRCC1/Mspl, analisado em gel agarose ultra pura 1000 (Invitrogen) 2%, corado com brometo de etídeo.....39
- Figura 6.** Produto da reação de PCR-RFLP para XRCC3/NcoI, analisado em gel de agarose ultra pura 1000 (Invitrogen) a 2% corado com brometo de etídeo.....40
- Figura 7.** Produto da reação de PCR-RFLP para XPD/PstI, analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.....42
- Figura 8.** Produto da reação de PCR-RFLP para VDR/FokI, analisado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.....43
- Figura 9.** Produto da reação de PCR-RFLP para VDR/TaqI, analisado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo.....44

RESUMO

Gonçalves FT. *Genes de reparo do DNA e de susceptibilidade genética em pacientes com melanoma maligno* [tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 132p.

O melanoma é uma lesão maligna da pele, com alta taxa de mortalidade cuja incidência vem aumentando nos últimos anos. Os principais fatores de risco são a história familiar da doença, presença de nevos benignos múltiplos ou nevos atípicos e melanoma prévio. Imunossupressão, sensibilidade ao sol e exposição intermitente e intensa à radiação UV da luz solar, sem proteção, são fatores de risco adicionais. O objetivo deste estudo caso-controle de base hospitalar foi avaliar a contribuição de polimorfismos de genes de metabolização de xenobióticos (*CYP1A1/Mspl*, *CYP2E1/PstI*, *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1/Bsma*), de genes de reparo do DNA (*XRCC1/Mspl*, *XRCC3/NcoI* e *XPDPstI*) e do gene do receptor de vitamina D (*VDR/FokI* e *VDR/TaqI*) no risco de melanoma. Consentiram em participar 193 pacientes com melanoma (49,7% homens e 50,3% mulheres, média de $52 \pm 14,28$ anos) e 208 controles (51,4% homens e 48,6% mulheres, média de $48 \pm 15,24$ anos) que após responderem a um questionário detalhado sobre hábitos e tipos de exposição a fatores de risco cederam amostras biológicas para análise do DNA por PCR-RFLP. Os principais fatores de risco para o melanoma foram ascendência européia ($p < 0,001$), cor de olhos claros ($p < 0,001$), presença de nevos ($p < 0,001$), histórico de queimadura grave na adolescência ($p < 0,001$), falta de filtro solar ($p < 0,034$) e exposição à lâmpadas fluorescentes ($p = 0,001$). Quanto à análise dos polimorfismos de genes de metabolização de xenobióticos somente o *GSTT1* nulo revelou associação inversamente positiva com o risco de melanoma maligno (OR ajustado = 0,60; IC95% = 0,37-0,97). Entretanto, essa associação não se manteve após a análise de regressão múltipla escalonada. Os polimorfismos *VDR/FokI* e *VDR/TaqI* não modificaram a susceptibilidade ao melanoma maligno na comparação entre os grupos. Na análise conjunta do fenótipo-genótipo, indivíduos com olhos verdes e genótipo *VDR/FokI* polimórfico, apresentaram risco praticamente seis vezes maior de melanoma (OR ajustado = 5,93; IC95% = 1,49-23,59). A associação entre os polimorfismos em pelo menos um dos alelos dos genes de reparo do DNA, *XRCC3/NcoI* e *XPDPstI* aumentou praticamente duas vezes o risco de melanoma tanto na análise estatística multivariada (OR ajustado = 1,84; IC95% = 1,08-3,14) quanto na regressão logística múltipla escalonada (OR ajustado = 2,32; IC95% = 1,01-5,36). Na interação gene-meio ambiente a falta do uso de filtro solar dobrou o risco de melanoma em indivíduos com polimorfismo *XPDPstI* (OR ajustado = 2,17; IC95% = 1,12-4,17). A identificação de polimorfismos genéticos associados com doenças multifatoriais como o caso do melanoma maligno devem ser estimuladas em nosso meio, principalmente por vivermos em um país tropical com alta incidência solar em praticamente todo seu território. A identificação de marcadores genéticos de susceptibilidade pode propiciar medidas precoces e eficazes de prevenção do câncer.

Descritores: 1.Melanoma 2.Polimorfismo genético 3.Reparo do DNA 4.Xenobióticos/metabolismo 5.Receptor de vitamina D

SUMMARY

Gonçalves FT. *DNA repair and genetic susceptibility genes in malignant melanoma patients* [thesis]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 132p.

Melanoma is a malignant skin lesion, with high mortality rate and its incidence has been rising in the last years. The main risk factors are melanoma family history, presence of multiple benign or atypical nevi and previous melanoma. Immunosuppression, sun sensitivity and intermittent and intense exposure to UV sunlight radiation, without protection, are additional risk factors. The aim of this hospital based case-control study was to evaluate the contribution of genetic polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes (*CYP1A1/Mspl*, *CYP2E1/PstI*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1/BsmI*), DNA repair genes (*XRCC1/Mspl*, *XRCC3/NcoI* and *XPB/PstI*) and vitamin D receptor genes (*VDR/FokI* and *VDR/TaqI*) to the risk of melanoma. All participants, including 193 melanoma patients (49.7% men and 50.3% women, mean age 52 ± 14.28 years old) and 208 controls (51.4% men and 48.6% women, mean age 48 ± 15.24 years old) gave written informed consent to participate in the study and agreed to donate a sample of blood to analysis of DNA by PCR-RFLP and answer a questionnaire regarding phenotypic characteristics, personal habits and questions regarding sun exposure that could be associated to the disease. The main risk factors to melanoma were European ancestries ($p < 0.001$), light colored eyes ($p < 0.001$), presence of nevi ($p < 0.001$), history of sunburns during the adolescence ($p < 0.001$), no use of sunblock ($p < 0.034$) and exposure of fluorescent lamps ($p < 0.001$). Regarding the genes polymorphisms, only *GSTT1* null genotype showed as an inversely positive factor (OR adjusted = 0.60; 95%CI = 0.37-0.97) to malignant melanoma. However, this association disappeared with multiple regression analysis. The *VDR/FokI* and *VDR/TaqI* polymorphisms did not alter the susceptibility to malignant melanoma in the comparison between groups. A joint analysis of phenotype-genotype, individuals with green eyes and polymorphic genotype *VDR/FokI*, presented almost six times more risk to melanoma (OR adjusted = 5.93, 95% CI = 1.49-23.59). The association between polymorphisms, in at least one polymorphic allele of DNA repair genes *XRCC3/NcoI* and *XPB/PstI* increased almost twice the risk of melanoma in the multivariate statistic analysis (OR adjusted = 1.84, 95%CI = 1.08-3.14) and in multiple logistic regression (OR adjusted = 2.32, 95%CI = 1.01-5.36). In the interaction gene-environment the lack of sunscreen doubled the risk of melanoma in individuals with polymorphisms of *XPB/PstI* (OR adjusted = 2.17, 95%CI = 1.12-4.17). The identification of genetic polymorphisms associated with diseases such as multi factorial case of malignant melanoma should be encouraged in our country, mainly because we live in a tropical country with high solar irradiation in almost all its territory. The identification of genetic markers of susceptibility may provide early and effective prevention of cancer.

Descriptors: 1.Melanoma 2.Genetic polymorphic 3. DNA repair 4.Xenobiotics/Metabolizing 5.Vitamin D receptor

1 INTRODUÇÃO

O melanoma (MM) é um tumor maligno de origem neuroectodérmica pouco comum. Forma-se a partir dos melanócitos, que são células especializadas em pigmentação, responsáveis pela produção de melanina, o pigmento que caracteriza a cor da pele, olhos e dos cabelos. Os melanoblastos, células precursoras dos melanócitos, migram da crista neural para toda a epiderme durante a embriogênese e em consequência desse fato, o tumor apresenta grande capacidade de disseminação, mesmo em fases iniciais, já que as características de invasão e metástase podem ser consideradas prerrogativas inatas deste tipo celular. O melanoma na maioria das vezes origina-se na pele, embora possa surgir a partir de mucosas ou em outros locais para os quais migram as células da crista neural (Machado et al., 2004, Slominski et al., 2004).

A identificação do melanoma como uma doença não é recente, sendo descrito possivelmente pela primeira vez no século cinco antes de Cristo por Hipócrates, que se referiu a esta neoplasia como uma lesão negra tipo herpética (Giblin e Thomas, 2007). Segundo Giblin e Thomas (2007) o termo “melanoma” foi originalmente empregado em 1838, por Robert Carswell, que o utilizou para descrever lesões malignas pigmentadas da pele. Em 1858, Pemberton preconizava e realizava a excisão ampla e profunda da lesão como tratamento da doença. Anos depois, em 1907, Handley recomendava a ressecção em blocos com margens amplas (Giblin e Thomas, 2007).

Segundo Machado e colaboradores (2004), nas décadas de 50 e 60, vários pesquisadores como Allen, Spitz, Petersen e Bodenhan já tentavam identificar os fatores prognósticos relacionados ao melanoma. Em 1967, Clark criou o sistema de microestadiamento, utilizando como critério os níveis de invasão da pele e dois anos depois, Clark e colaboradores (1969) aprimoraram esse sistema. Em seguida, Breslow (1970) demonstrou a importância da espessura do melanoma primário (Machado et al., 2004). Finalmente, em 1992, Morton e colaboradores introduziram o rastreamento linfático pré-operatório e a linfadenectomia seletiva do linfonodo acometido (linfonodo sentinela), técnica que atualmente está incorporada como procedimento de rotina na maioria dos centros especializados em câncer.

1.1 Aspectos clínicos do Melanoma e condutas terapêuticas

O melanoma pode surgir a partir da pele normal ou de uma lesão pigmentada preexistente. A manifestação da doença na pele normal se dá a partir do aparecimento de uma pinta escura de bordas irregulares e nos casos de uma lesão pigmentada pré-existente, ocorre aumento no tamanho com alteração na coloração e forma da lesão que passa a apresentar bordas irregulares. Algumas regras básicas permitem o reconhecimento do melanoma cutâneo em lesões melanocíticas: alterações de cor, tamanho, forma e superfície; crescimento rápido, descamação, ulceração,

sangramento, prurido, dor e desenvolvimento de áreas papulosas ou nodulares sobre máculas pigmentadas (Friedman et al., 1991).

O melanoma apresenta duas fases distintas: a fase inicial ou de crescimento radial, na qual a lesão ainda é plana, pequena e possui comportamento mais benigno; e a fase de crescimento vertical, com pior prognóstico, apresentando células malignas profundamente localizadas na derme reticular ou que chegam a invadir o subcutâneo, possibilitando a formação de metástases (Machado et al., 2004).

Existem quatro subtipos clínicos principais de melanoma:

- Melanoma expansivo superficial (MES): é o subtipo mais freqüente, acometendo cerca de 70% dos casos na quarta e quinta décadas de vida. Ocorre principalmente no tronco e membros inferiores, sendo encontrado em várias colorações, como castanho, preto, róseo ou violeta, com hipopigmentação central e expansão periférica. Sua evolução é crônica, e, depois de meses a anos, podem surgir nódulos elevados, sangramento ou transudação, o que já caracteriza o estágio mais avançado com crescimento vertical (Maia et al., 2003, Fernandes et al., 2005, Gray-Schopfer et al., 2007) ;
- Melanoma nodular (MN): consiste de nódulos epidérmicos sobressalentes, sendo o segundo subtipo mais comum (15 a 30% dos casos), ocorrendo principalmente nas quinta e sexta décadas de vida, com maior incidência no sexo masculino. Apresenta-se como lesão papulosa, elevada, de cor castanha, negra ou azulada, sendo freqüentes a ulceração e o sangramento. Existe a variante

amelanótica, com superfície crítematosa. A expressão é reservada às lesões primitivamente nodulares, isto é, sem fase prévia de crescimento radial (Maia et al., 2003, Fernandes et al., 2005, Gray-Schopfer et al., 2007);

- Melanoma acrolentiginoso (MAL), que foi introduzido por Reed e colaboradores em 1976, que ocorre preferencialmente nas regiões palmar e plantar, no leito ungueal e nas mucosas (Seiji et al., 1982, Paladugu et al., 1983) e não está relacionado com a exposição solar, sendo a forma mais comum encontrada em populações não caucasianas (35 a 60%), sem predileção por sexo (Fernandes et al., 2005, Gray Schopfer et al., 2007);
- O quarto subtipo de melanoma é o lentigo-maligno, que surge de lesão pré-maligna, com crescimento lento e período pré-invasivo longo, apresentando geralmente margem indefinida. Inicialmente, o lentigo maligno é lesão tipo mancha, lisa, marrom-escura (mácula) surgindo em partes do corpo cronicamente expostas ao sol, principalmente na face. É o desenvolvimento de nódulo elevado dentro da área de pigmentação devido à proliferação de melanócitos atípicos dentro da epiderme, que podem progredir para lentigo maligno-melanoma invasivo verticalmente. Esta variante é pouco freqüente, acometendo apenas 5% dos casos, não atingindo as crianças, sendo que os pacientes são geralmente da sexta ou sétima década de vida (Maia et al., 2003, Fernandes et al., 2005, Gray-Schopfer et al., 2007).

O procedimento médico após o reconhecimento da neoplasia é a ressecção cirúrgica da lesão suspeita e a confirmação histológica e, em seguida, procede-se à complementação do estadiamento para se definir a proposta terapêutica. O estadiamento do melanoma pode ser dado de acordo com o nível de invasão tumoral na classificação proposta por Clark (1967) ou pelo índice de Breslow (1970), que determina a espessura do tumor sendo esta a classificação mais utilizada atualmente.

A classificação de Clark envolve cinco níveis: nível I (crescimento intra-epidérmico), nível II (invasão da derme papilar), nível III (atinge o limite entre derme papilar e reticular), nível IV (invasão da derme reticular) e nível V (invasão do tecido celular subcutâneo). Esta classificação é considerada um fator preditivo independente do melanoma fino, mas não para lesões mais espessas (Balch et al., 2001).

Já o índice de Breslow determina a espessura tumoral - dimensão vertical a partir do ponto mais profundo de invasão ao topo da camada granulosa ou à célula mais superficial em caso de ulceração - usando uma ocular micrométrica subdividida em quatro níveis: I = $\leq 1,0$ mm; II = 1,1-2,0 mm; III = 2,0-4,0 mm; IV = $> 4,0$ mm (Balch et al., 2001).

Em pacientes com tumores de espessura acima de 1mm é indicada a pesquisa de linfonodo sentinela que é o primeiro linfonodo de drenagem na área entre o tumor primário e a cadeia linfática. Tal conceito é baseado na hipótese de que a drenagem linfática ocorre de maneira ordenada a partir do tumor primário para um primeiro linfonodo, o sentinela, e então para o resto da rede linfática (Morton et al., 1992).

Em relação à conduta terapêutica para o melanoma, a cirurgia é o tratamento mais indicado. A radioterapia e a quimioterapia também podem ser utilizadas dependendo do estágio da doença. Quando há metástase, o tratamento mais utilizado é a quimioterapia, baseada na infusão de drogas citotóxicas. As drogas mais utilizadas atualmente são representadas pela Dacarbazina (DTIC), Cisplatina (CDDP), Nitrosoureas (Carmustina e Lomustina) e agentes que atuam sobre os microtúbulos (Alcalóides da Vinca e Taxanes). No entanto, apesar do uso difundido, infelizmente os resultados encontrados nesta abordagem são decepcionantes na maioria dos casos (Machado et al., 2004). A estratégia de tratamento para a doença avançada tem então como objetivo aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente.

1.2 Epidemiologia do melanoma

O melanoma é a primeira causa de morte por doenças de pele (80%), correspondendo a 4% dos tipos de cânceres cutâneos (Miller e Mihm Jr., 2006, Gray-Schopfer et al., 2007) e cerca de 3% de todos os tumores malignos (Gray-Schopfer et al., 2007). É um tipo de câncer altamente invasivo e agressivo com taxas elevadas de mortalidade, com média de 2,4/100.000 pessoas/ano na Europa, sendo 3-5/100.000 habitantes/ano nos países do Mediterrâneo e 12-20/100.000 indivíduos/ano nos países nórdicos, de acordo com dados do World Health Organization (WHO) e Caini e colaboradores (2009).

No Brasil, foram previstos para o ano de 2008, 5.920 casos novos de melanoma, sendo 2.950 em homens (3,09 casos/100.000 habitantes) e 2970 em mulheres (3,03 casos/100.000 habitantes) principalmente na região Sul do país, com média de 8 casos novos/100.000 habitantes (Carvalho et al., 2004).

As estimativas para a cidade de São Paulo foram de 830 casos em homens (4,85 casos/100.000 indivíduos) e 930 em mulheres (5,26 casos/100.000 indivíduos), de acordo com o INCA - Instituto Nacional do Câncer (2009).

Embora a incidência mundial de melanoma seja baixa, a mesma vem crescendo rapidamente nas últimas quatro décadas (Miller e Mihm Jr., 2006, Giblin e Thomas, 2007), dobrando seus números nos últimos vinte anos (Linos et al., 2009), como resultado, em parte, da diminuição constante da concentração de ozônio na estratosfera e o aumento da incidência global dos raios UV (Merlino e Noonan, 2003, Wei et al., 2003, Giblin e Thomas, 2007, Antoniou et al., 2008).

A idade média ao diagnóstico do melanoma, na população em geral, é de 57 anos para homens e 50 para as mulheres (Carvalho et al., 2004). Em indivíduos com alto risco para melanoma hereditário, por outro lado, essa média de idade ao diagnóstico antecipa-se para 36 anos em homens e 29 anos em mulheres. Além da idade mais precoce ao diagnóstico, os pacientes com melanoma familiar, aproximadamente 10-14%, têm maior incidência de melanomas primários múltiplos, além de apresentarem o risco maior de desenvolvimento desta doença de 30 a 70 vezes que a população em geral (Carvalho et al., 2004, Hansen et al., 2004).

Recentemente, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do mesmo por *screening*, seguido da intervenção cirúrgica em tumores de menor espessura segundo a classificação de Breslow (Garbe e Eigentler, 2007). Também parecem contribuir para esse efeito as políticas públicas de educação e prevenção dos riscos da exposição solar bem como a utilização de roupas mais adequadas e protetores contra raios UVA e UVB, principalmente em indivíduos ocupacionalmente expostos (Snoo e Hayward, 2005, Lund e Timmins, 2007, Linos et al., 2009). Nos países desenvolvidos a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que, para os países em desenvolvimento a sobrevida média de cinco anos dos pacientes com melanoma é de 56% e a mundial de 69% (Miller e Mihm Jr., 2006, INCA 2009). No Brasil, ao contrário dos países desenvolvidos, a taxa de mortalidade por melanoma ainda é alta, com aumento, no período de 1980 a 1995, de 25% para homens e 33% para mulheres (Wünsch Filho e Moncau, 2002). Esse padrão é também notado no Estado de São Paulo, cuja mortalidade apresentou, no período de 1979 a 1998, um crescimento de 1,33% ao ano para homens e 1,56% para mulheres (Souza et al., 2001).

1.3 Fatores de risco do melanoma cutâneo maligno

São conhecidos diversos fatores de risco para o melanoma, que se relacionam principalmente com história familiar da doença e com características cutâneas e pigmentares, como a presença de numerosos nevos, nevos

atípicos (displásicos), pele do tipo caucasóide, sardas, cabelos ruivos, olhos claros, incapacidade de bronzeamento e propensão a queimaduras, além de melanoma prévio (Tucker e Goldstein, 2003, Rivers, 2004, Miller e Mihm Jr, 2006, Garbe e Eigentler, 2007). Imunossupressão, sensibilidade ao sol e exposição intermitente e intensa à radiação UV da luz solar são fatores de risco adicionais. Estudos epidemiológicos têm apontado a exposição solar, particularmente durante a infância, como a principal causa ambiental de melanoma (Whiteman et al., 2001, Wei et al., 2003, Carvalho et al., 2004, Reichrath e Querings, 2004, Giblin e Thomas, 2007). Atualmente, acredita-se que a maioria dos casos de melanoma resulte da interação de fatores de risco ambientais e genéticos, constituindo um modelo de doença multifatorial (Bressac-de-Paillerets et al., 2002, Miller e Mihm Jr., 2006).

A radiação ultravioleta (UV), encontrada na radiação solar e artificial é considerada o principal fator de risco não etiológico para o desenvolvimento do melanoma e tem efeito pleiotrópico nas células da pele, incluindo danos ao DNA e a oxidação dos lipídios e aminoácidos de membrana (Carless et al., 2002, Han et al., 2004, Rivers, 2004, Reichrath e Querings, 2004, Ramirez et al., 2005). A exposição aos raios UVB e UVA acarreta efeitos diferentes na pele: os raios UVB, que correspondem a cerca de 5% da radiação solar e a baixa radiação emitida por lâmpadas de tungstênio e halogênio, estão diretamente associados a danos no DNA, uma vez que induzem a formação de dímeros de pirimidinas, ou seja, pareamento errôneo de duas pirimidinas adjacentes. Estas lesões são formadas pela ligação entre os carbonos nas posições 4 e 5 ou entre 6 e 4

das bases pirimídicas (Matsumura e Ananthaswamy, 2002, Li et al., 2006, Povey et al., 2007). Ambos os tipos de lesões podem levar a mutações genéticas tais como transições de uma ou duas bases pirimídicas citosina (C)→ timina (T) e CC→TT, este último característico de lesão por UVB.

Já os raios UVA, que correspondem a 95% da radiação solar e a radiação artificial emitida por lâmpadas fluorescentes, causam, predominantemente, danos indiretos ao DNA via mecanismo de estresse oxidativo, que se dá pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) como peróxido de hidrogênio, *singlets* de oxigênio e ânions superóxidos (Wang et al., 2005, Giblin e Thomas, 2007), ou reações metabólicas sensibilizadas pela ação do UV. Estas moléculas (ROS) são responsáveis pela adição de adutos no DNA bem como oxidações e alquilações, os quais podem levar a pareamentos inadequados entre as bases, podendo acarretar mutações que contribuem para a carcinogênese (Lear et al., 2000, Han et al., 2004, Giblin e Thomas, 2007). Além disso, a exposição aos raios UVA pode resultar em quebras nas ligações fosfodiéster da estrutura da molécula podendo ocasionar as chamadas quebras cromatídicas (*single strand breaks* - SSB), quando essa quebra acontece em apenas uma das fitas, ou então quebras cromossômicas, em duplas fitas de DNA (*double strand breaks* – DSB).

Mutações no DNA podem levar a ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor ou podem acarretar instabilidade cromossômica, bem como a perda da heterozigosidade (Winsey et al., 2000). Embora indivíduos expostos a agentes mutagênicos tenham maior

risco de desenvolver neoplasias, mecanismos de reparo do DNA podem modular esta resposta (Fargnoli et al., 2006).

Diferentes mutações nos genes que codificam as enzimas de reparo têm sido associadas aos mais diversos tipos de câncer modificando o risco de aparecimento do tumor bem como a velocidade de progressão do mesmo. A análise de polimorfismos de um único par de bases do DNA (SNP, *single nucleotide polymorphism*) vem sendo investigada em genes responsáveis por vias de reparo, detoxificação e ciclo celular (Savas et al., 2005).

Existem diversos genes responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas no reparo do DNA que exibem polimorfismos genéticos, com penetrância incompleta na população, capazes de alterar, reduzir ou inibir as funções da proteína específica (Yamaguchi et al., 2004, Li et al., 2006) e modificar a susceptibilidade individual ao câncer.

Recentemente foram descritos polimorfismos em genes de reparo do DNA que podem estar relacionados com o risco de desenvolvimento do melanoma como *XPC*, *XPD*, *XPF*, *ERCC1*, *CSB*, *HR23B*, *XRCC1*, *XRCC2* e *XRCC3*, *OGG1*, *APEX1* (Fargnoli et al., 2006). Estes representam as três principais vias de reparo do material genético, que são o reparo por excisão de bases (BER), responsável pelo reparo de danos ocorridos nas bases do DNA decorrentes da ação de ROS; o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) que é a via preferencialmente usada para corrigir danos que resultam na formação de dímeros de pirimidina e, finalmente, o reparo através da recombinação homóloga da

fita dupla do DNA (Tomescu et al., 2001, Merlino e Noonan, 2003, Wei et al., 2003, Han et al., 2004, Millikan et al., 2006).

Além dos genes de reparo, polimorfismos de genes que codificam enzimas envolvidas no processo de metabolização de xenobióticos como o *GSTT1* e *GSTM1*, que detoxificam o organismo através da conjugação da glutatona com elementos eletrofilicos e que contribuem para a homeostase celular (Carless et al., 2002, Depeille et al., 2004, Lear et al., 2000, Kanetsky et al., 2001) e os polimorfismos do gene que codifica o receptor de vitamina D, com função regulatória da proliferação e diferenciação celular (Osborne e Hutchinson, 2002, Stahl et al., 2004, Halsall et al., 2004, Reichrath e Querings, 2004, Santonocito et al., 2007) também têm sido relacionados com o aumento do risco de desenvolvimento de melanoma.

Alguns estudos relatam a associação de mutações e/ou polimorfismos em genes específicos com o risco de melanoma. Mutações germinativas no gene inibidor de Kinase ciclina dependente 2A (*CDKN2A/p16*) têm sua associação bem estabelecida com o melanoma familiar, sendo que esta mutação é encontrada em oito a 50% dos casos de melanoma familiar, dependendo do grupo étnico avaliado (Filho et al., 2003, Udayakumar et al, 2009). Outro tipo de mutação é a que ocorre no gene ciclina dependente de Kinase 4 (*CDK4*) que também tem sido relacionada à história familiar de melanoma maligno (Carvalho et al., 2004, Gruber et al., 2008). Alterações em outros genes, como o de pigmentação cutânea, o receptor de melanocortina 1-*MC1R* (Kennedy et al., 2001), o gene codificador da proteína ciclina D1-*CCND1* (Sauter et al., 2002), o oncogene

BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) (Gruber et al., 2008), o gene do câncer de mama 2-*BRCA2* (Debniak et al., 2008), o gene codificador da proteína sinalizadora de agouti (*ASIP*) (Meyle et al., 2009), o codificador da tirosinase (*TYR*) (Gudbjartsson et al., 2008) também têm sido associados com maior predisposição ao melanoma.

1.4 Polimorfismos genéticos no melanoma

Polimorfismo genético é definido como a ocorrência, em uma população, de duas ou mais formas descontínuas de um determinado fenótipo em tal proporção que o mais raro deles não é mantido por mutação recorrente (Collins et al., 2003). Genes são considerados polimórficos funcionalmente quando as variantes alélicas existentes de forma estável na população alteram a atividade da proteína codificada em relação à proteína selvagem. São mutações pontuais (*SNPs*), em um ou ambos os alelos, ou deleções de genes inteiros, que ocorrem em mais de 1% da população (Buysschaert et al., 2008). Em muitos casos, o polimorfismo genético está associado com atividade enzimática reduzida, mas há exemplos de variantes com atividade aumentada (Stamatoyannopoulos, 2004). Estima-se que um milhão de *SNP*'s (um para cada mil nucleotídeos) possa existir no genoma humano, dos quais 60 mil estão em regiões que codificam proteínas (Collins et al., 2003, Buysschaert et al., 2008).

1.4.1 Polimorfismos de genes de reparo do DNA

O gene *XRCC1* (*X-ray cross complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*), mapeado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2), codifica a proteína conhecida pelo mesmo nome que participa do processo de reparo por excisão de bases (BER) do material genético. Nesse tipo de reparo a enzima interage com o DNA e remove alterações de bases únicas que tenham sido metiladas, que tenham perdido um grupamento amina, oxidadas ou reduzidas, retificando assim a fita única (Hu et al., 2005, Hung et al., 2005, Tudek et al., 2007). A proteína XRCC1 não possui atividade enzimática conhecida e apresenta três domínios de ligação distintos que interagem com a DNA polimerase β , com a poliribose adenosina difosfato polimerase (ADP) e com a DNA ligase III. Aparentemente a proteína XRCC1 age como um fator nuclear fundamental no processo de BER, pelo recrutamento simultâneo de diferentes componentes do reparo do DNA para o local da base lesada (Han et al., 2004).

Existem mais de 60 SNPs descritos e validados para o gene *XRCC1*. No entanto, os polimorfismos de maior interesse e que têm sido extensivamente estudados são os *XRCC1/Arg194Trp*, *XRCC1/Arg280His* e *XRCC1/Arg399Gln* (Hung et al., 2005). Indivíduos com o gene *XRCC1* polimórfico possuem maior sensibilidade aos agentes alcalinizantes e às radiações ionizantes, como a radiação ultravioleta do tipo A. Estes indivíduos apresentam a capacidade de reparo reduzida, resultando na persistência de adutos de DNA no organismo, freqüências elevadas de trocas entre

cromátides irmãs e de quebras cromatídicas, aumento da glicoproteína piruvato kinase RBC A, além de atraso do ciclo celular (Hu et al., 2005, Hung et al., 2005). As alterações funcionais associam-se ao aumento do risco de câncer como carcinoma de laringe (Hung et al., 2005), bexiga (Goode et al., 2002), cabeça e pescoço (Tudek, 2007), mama (Goode et al., 2002, Hung et al., 2005), pulmão (Hung et al., 2005, Schneider et al., 2008), leucemia (Tudek 2007) e inclusive o melanoma (Han et al., 2004, Li et al., 2006).

O gene *XRCC3* (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3*) encontra-se localizado no braço longo do cromossomo 14 (14q32.3) e codifica uma proteína de mesmo nome que está envolvida no processo de reparo por recombinação homóloga do DNA, em que a fita complementar não danificada é utilizada como molde na substituição do fragmento lesado. Este mecanismo é de suma importância na prevenção da fragmentação cromossômica, translocações e deleções, que podem desencadear o processo de carcinogênese (Han et al., 2004). A proteína XRCC3, assim como a XRCC2 (Han et al., 2004), está estruturalmente relacionada com o complexo Rad51, um componente imprescindível no processo de reparo do material genético. O Rad51 atua no reparo do DNA por meio da recombinação entre a fita danificada e a seqüência homóloga presente na segunda cópia do gene contida na célula diplóide (Liu et al., 1998). A proteína XRCC3 é requerida para a montagem do complexo protéico Rad51 e participa também na manutenção da estabilidade cromossômica (Manuguerra et al., 2006). Polimorfismos do gene *XRCC3* geram enzimas que não permitem a formação do Rad51, gerando

instabilidade genética e maior sensibilidade aos raios UV (Liu et al., 1998, Winsey et al., 2000).

Existem quatro SNPs em regiões codificadoras do *XRCC3* e 109 polimorfismos de base única em regiões intrônicas do mesmo gene. O polimorfismo *XRCC3/Thr241Met (NcoI)* tem sido associado com o risco aumentado de neoplasias, principalmente o câncer de pulmão e de mama (Manuguerra et al., 2006, Synowiec et al., 2008).

Alguns autores avaliaram a associação de polimorfismos do *XRCC3/NcoI* com o melanoma e mostraram resultados contraditórios (Duan et al., 2002, Jacobsen et al., 2003, Bertram et al., 2004; Winsey et al., 2000; Han et al., 2006). Winsey e colaboradores (2000), em uma avaliação caso-controle na população de Oxford (Reino Unido), verificaram associação positiva da presença do polimorfismo *XRCC3/NcoI* e melanoma, embora estes resultados não tenham sido confirmados por outros autores em caucasóides do Reino Unido (Bertram et al., 2004) e na população não hispânica residente nos Estados Unidos (Duan et al., 2002).

O gene *XPB* (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency*) mapeado no cromossomo 19q13.3, codifica uma DNA helicase (5'-3') dependente de ATP envolvida no reparo por excisão de nucleotídeo (NER) e na transcrição basal como parte do fator de transcrição IIH (TFIIH). Mutações no *XPB* desencadeiam defeitos no NER (Coin et al., 1998) e as síndromes de Cockayne, Xeroderma Pigmentosum e Thiodistrofia, dependendo da localização da mutação (Boer e Hoeijmakers, 2000, Lehmann, 2001). Além disso, a proteína *XPB* e a proteína p53 podem

interagir uma com a outra para modular a apoptose e o NER. A p53 liga e modula a atividade helicase do TFIIH e o reparo dos dímeros de pirimidina no DNA induzidos pela radiação UV (Han et al., 2005). É interessante ressaltar que pacientes com Xeroderma Pigmentosum, portadores de mutações no XPD, têm um risco 1000 vezes maior de câncer de pele induzido pela luz solar (Boer e Hoeijmakers, 2000, Lehmann, 2001).

Existem oito polimorfismos de base única descritos em regiões codificadoras do *XPD*, e 138 SNPs em regiões intrônicas. No entanto, três variantes polimórficas vêm sendo amplamente estudadas bem como suas possíveis associações com neoplasias: *XPD/Arg156Arg*, *XPD/Asp312Ans* e *XPD/Lys751Gln (MspI)* (Manuguerra et al., 2006). De acordo com estudos epidemiológicos, polimorfismos no *XPD* estão relacionados com o risco aumentado de adenocarcinoma esofágico (Tse et al., 2008), câncer colorretal (Le Morvan et al., 2007), bexiga (Wu et al., 2006), e também o melanoma (Bacarelli et al., 2004, Han et al., 2005, Kertat et al., 2008).

1.4.2 Polimorfismos de genes de metabolização de xenobióticos

Além dos genes de reparo, o risco de melanoma tem sido associado com polimorfismos de genes metabolizadores de xenobióticos, que estão envolvidos na manutenção da homeostase celular, alterando a susceptibilidade individual para o desenvolvimento do câncer (Wünsch e Gattás, 2001, Bonassi e Au, 2002).

A metabolização de xenobióticos é feita por enzimas mediadoras da ativação metabólica ou do processo oxidativo (fase I) e por enzimas de conjugação ou de fase II, caracterizadas por reações de inativação dos metabólitos formados na fase I (Yamaguchi et al., 2004). Muitos compostos são convertidos em metabólitos eletrofílicos, potencialmente tóxicos, pelas enzimas oxidativas da fase I, principalmente as enzimas da superfamília do citocromo P450 (Ingelman-Sundberg, 2001, Reszka et al., 2006, Shimada, 2006). Os intermediários formados nesta reação, que podem ser compostos mutagênicos ou carcinogênicos, sofrem conjugação com o tripeptídeo glutationa, por intermédio das Glutathione-S transferases (GSTs), enzimas da fase II de metabolização. Como resultados do processo são gerados metabólitos inativos, facilmente excretados na urina, por meio da bile ou nas fezes. Quando isso não ocorre, os metabólitos ativos podem ligar-se covalentemente a macromoléculas celulares (DNA, RNA e proteínas), formando adutos que lesam o material genético, e se não forem reparados, levam ao desenvolvimento de mutações, transformações celulares ou mesmo câncer (Lang e Pelkonen, 1999, Roodi et al., 2004).

As enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYP450), envolvidas nas reações metabólicas da fase I, desempenham papéis diversos na manutenção da homeostase celular. Possuem capacidade de ativação de muitos xenobióticos, incluindo componentes procarcinogênicos provenientes do tabaco. Os genes codificadores dessas enzimas estão arranjados em famílias e localizados em vários cromossomos, além de apresentarem polimorfismos genéticos na população em geral (Chetty e Murray, 2007).

São conhecidas quinze isoformas de citocromo P450 na espécie humana, nas quais se incluem *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2A6*, *CYP2C9*, *CYP2C8*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A43*, *CYP17* e *CYP19* (Islam et al., 2002, Yamaguchi et al., 2004).

O *CYP1A1* (15q22-q24) é largamente expresso em tecidos extra-hepáticos, incluindo a pele e tem sua regulação alterada em resposta a radiação UV. O produto do *CYP1A1* (aril hidrocarbono hidroxilase) é responsável pelo primeiro passo na metabolização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, em compostos eletrofilicos (Kawajiri et al., 1986). São conhecidos quatro polimorfismos para o gene *CYP1A1* sendo que o identificado pela enzima de restrição *MspI* (*CYP1A1m1*), na região 3' não codificante do gene, resulta no aumento de sua atividade em três vezes (Kawajiri et al., 1986).

Existem evidências que os produtos do *CYP1A1* utilizam ligantes endógenos e participam da defesa das células contra o estresse oxidativo. A expressão do *CYP1A1* nos queratinócitos é regulada pelos retinóides, evidenciando o papel do *CYP1A1* na carcinogênese da pele (Lear et al., 2000), embora existam dados contraditórios de sua associação com o melanoma (Dolzan et al., 2006).

O gene *CYP2E1* (10q24.3-qter) codifica a enzima de mesmo nome com ação monoxigenase, que catalisa várias reações envolvidas no metabolismo de drogas e na síntese de colesterol, esteróides e outros lípides. Esta enzima metaboliza tanto substratos endógenos, como a acetona, o acetato e participa da segunda via de metabolização do álcool,

assim como toxinas e carcinógenos exógenos de baixo peso molecular, incluindo o benzeno, as nitrosaminas, o tetracloreto de carbono e o cloreto de vinila (Ioannides e Lewis, 2004). Alterações estruturais desta enzima podem acarretar na metabolização excessiva de substratos, resultando no acúmulo de toxinas no organismo, incluindo espécies reativas de oxigênio. Os indivíduos com o alelo do tipo selvagem possuem menor nível de expressão quando comparados aos portadores do alelo polimórfico. A frequência do homozigoto variante, bem como de heterozigotos é rara, compreendendo cerca de 4% dos indivíduos brancos e 20% dos japoneses (Gattás e Soares-Vieira, 2000, Garte et al., 2001). No entanto, aparentemente, não existem estudos prévios na literatura relacionando polimorfismos deste gene com o desenvolvimento de melanoma cutâneo maligno.

O sistema glutathione S-transferase é composto de isoenzimas que agem como peroxidases que catalizam a conjugação de compostos hidrofóbicos eletrofílicos que foram gerados no organismo pela fase I da metabolização (inclusive os ROS, formados na pele através da ação dos raios UV) com o tripeptídeo glutathione. Dentre as principais famílias gênicas destacam-se as que codificam as enzimas GST alfa (α), mi (μ), pi (π), teta (θ), kappa (κ), sigma (σ), zeta (ζ) e omega (ω) envolvidas com substratos específicos (Yamaguchi et al., 2004, Reszka et al., 2006, Shimada, 2006). Dentre os genes desta família, maior interesse é dirigido ao estudo de polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, todos com expressão na pele, sendo que a expressão da *GSTM1* é feita na membrana basal da epiderme e em nevos. (Lear et al., 2000, Depeille et al., 2004, Fryer et al., 2005, Mossner et al., 2007).

Os genes *GSTM1* (1p13.3) e *GSTT1* (22q11.23) possuem polimorfismos que incluem a deleção completa dos genes, não produzindo as correspondentes enzimas em cerca de 50% e 12-40% da população caucasóide, respectivamente. Essas enzimas além de participarem da excreção de diversos metabólitos do estresse oxidativo como os superóxidos, peróxidos e radicais hidroxila também são importantes na eliminação das espécies reativas de oxigênio e seus produtos secundários formados na pele pela ação da luz UV (Steinberg et al., 2009). Desta forma, a correlação entre os genótipos nulos (deleção do gene) da *GSTM1* e *GSTT1* com o risco de melanoma vem sendo amplamente discutidos na literatura (Lear et al., 2000, Kanetsky et al., 2001, Carless et al., 2002, Fryer et al., 2005, Steinberg et al., 2009).

A enzima GSTP é codificada pelo gene do mesmo nome, localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q13). Esta isoforma da família dos GSTs pode apresentar polimorfismos de substituição no aminoácido 105 (*GSTP1/Ile105Val*) e no aminoácido 114 (*GSTP1/Ala114Val*), produzindo enzimas variantes com menor atividade e capacidade de ligação com seus substratos (Carless et al., 2002, Yamaguchi et al., 2004, Bu et al., 2007). O polimorfismo *GSTP1/Ile105Val* (*Bsma*) parece estar associado ao risco de diferentes tumores incluindo o de pele não melanômico, como o carcinoma de células escamosas (Fryer et al., 2005). Existem poucos estudos que avaliaram esse polimorfismo com o melanoma, porém o genótipo *GSTP1/Bsma* homozigoto mutado foi associado com aumento no risco da neoplasia em indivíduos com cabelos e olhos escuros na população sueca (Bu et al., 2007).

1.4.3 Polimorfismos do gene receptor de vitamina D

A vitamina D refere-se a um grupo de pré-hormônios lipossolúveis que é sintetizado em resposta a ação da luz solar e está envolvida na redução do risco de câncer e na melhoria clínica da osteoporose (Ali e Vaidya, 2008). Existem evidências de que a vitamina D pode reduzir o risco de câncer, modificando o processo carcinogênico, devido ao seu papel em diferentes mecanismos celulares, incluindo a regulação do crescimento celular, diferenciação celular, controle da proliferação, apoptose, assim como inibição da angiogênese. A vitamina D está envolvida também no metabolismo ósseo incluindo a mineralização do osso e homeostase do cálcio e do fosfato, além de imunomodulação, ou seja, resposta imunológica adaptativa e inata (Osborne e Hutchinson, 2002, Zhu et al., 2002, Seifert et al., 2004, Dang et al., 2004, Vieth et al., 2005, Hourai et al., 2008).

A vitamina D₃ (colicalciferol) é formada na pele por meio da conversão do 7-dehidrocolesterol, sob a influência da radiação ultravioleta (UVB). A vitamina D₃ circulante é metabolizada em 25-hidroxivitamina D₃ no fígado e depois hidroxilada para a forma ativa 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) pela ação da enzima 1 α hidroxilase nos rins e outros tecidos, como a próstata (Holick et al., 2003), pele, cérebro, coração, pâncreas, intestino, cólon, ovário e mama (Benerjee e Chaterjee, 2003). A 1,25(OH)₂D₃ sistêmica, ou produzida localmente, se liga ao receptor nuclear de Vitamina D (VDR, codificado pelo gene de mesmo nome), causando uma mudança de conformação seguida da dimerização com o receptor retinóide X.

Esse complexo interage com o elemento de resposta a vitamina D (VDRE) localizados em genes alvos que iniciam sua transcrição ou repressão (Rukin et al., 2007).

O gene receptor de vitamina D (*VDR*) é um membro da superfamília de receptores nucleares de esteróide e encontra-se localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q14), com mais de 100kb. O *VDR* contém seis regiões promotoras, oito éxons codificadores de proteínas e seis éxons não transcritos, sendo essas regiões de “splicings” alternativos (Crofts et al., 1998, Rukin et al., 2007). Dietas deficientes em vitamina D e polimorfismos no *VDR* (principalmente nos éxons 2, 8 e 9) têm sido associados com o aumento na susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama (Neuhouser et al., 2008), cólon (Uitterlinden et al., 2004, Garland et al., 2006), próstata (Nagpal e Rathnachalam, 2005, Garland et al., 2006), carcinoma de células escamosas da pele (Nagpal e Rathnachalam, 2005, Gandini et al., 2009) e melanoma (Osborne e Hutchinson, 2002).

A atividade do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ parece ser influenciada pela variação genética de seu receptor - *VDR* (Santonocito et al., 2007). SNPs no *VDR* têm sido associados também com outras doenças além do câncer, conforme relatado na literatura (Uitterlinden et al., 2008). Dentre os seis principais polimorfismos descritos no *VDR* (*VDR/TaqI*, *VDR/ApaI*, *VDR/BsmI*, *VDR/FokI*, *VDR/Cdx2*, e *VDR/A-1012-G*) aparentemente só o SNP *VDR/FokI* parece afetar a função de transativação do complexo *VDR*/ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Entre os estudos que avaliam a correlação dos SNPs do *VDR* e o risco de neoplasias ou outras doenças, existem poucos estudos a cerca do

risco de melanoma cutâneo, entretanto, dados sugerem que o polimorfismo *VDR/FokI* aumenta o risco de desenvolvimento da doença, enquanto que os polimorfismos *VDR/TaqI* e *VDR/BsmI* conferem aparentemente proteção ao desenvolvimento da neoplasia (Santonocito et al., 2007, Li et al 2007, Gandini et al., 2009).

Assim sendo, a identificação de populações de risco para o aparecimento do melanoma, por meio da pesquisa de polimorfismos de genes de metabolização de xenobióticos, de reparo do DNA, bem como polimorfismos do gene receptor de vitamina D pode ser uma estratégia importante na identificação de fatores de risco que possam permitir a detecção precoce de indivíduos de alto risco e orientar suas entradas em programas de vigilância. Esta estratégia auxiliaria o médico a encorajar indivíduos a alterarem seu estilo de vida e, por meio da identificação do risco individual, permitir diagnóstico e tratamento precoce da doença.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a contribuição dos polimorfismos dos genes de metabolização de xenobióticos *CYP1A1/Mspl*, *CYP2E1/PstI*, *GSTP1/Bsma*, *GSTM1* e *GSTT1* na susceptibilidade ao melanoma maligno;
- Avaliar a contribuição dos polimorfismos dos genes de reparo do DNA, *XRCC1/Mspl*, *XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI* na susceptibilidade ao melanoma maligno;
- Avaliar a contribuição dos polimorfismos do gene receptor de vitamina D - *VDR/FokI* e *VDR/TaqI* na susceptibilidade ao melanoma maligno.

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Esse estudo caso-controle de base hospitalar foi realizado nos hospitais de origem dos pacientes e as análises de polimorfismos genéticos no Laboratório de Imuno-Hematologia e Hematologia Forense (LIM-40) do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.1.1 Metodologia de Seleção de Casos e Controles

Foram considerados casos elegíveis, pacientes atendidos no Hospital do Câncer A C Camargo, Instituto Brasileiro de Controle do Câncer e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), com diagnóstico recente de melanoma cutâneo, confirmado por exame histopatológico. Os pacientes incluídos no estudo possuíam cor de pele branca, e eram residentes, há mais de seis meses, na região metropolitana de São Paulo. Não foram elegíveis os indivíduos com xeroderma pigmentoso, síndrome do nevus displásico, melanomas acral (planta e palma), melanoma em leito ungueal, área genital, ânus, borda anal, ouvido interno e mucosa oral.

O grupo controle foi selecionado entre os pacientes atendidos nos mesmos hospitais, emparelhados aos casos segundo gênero e faixa etária (pareamento por frequência) que também eram residentes da região metropolitana de São Paulo há mais de seis meses. Foram excluídos deste grupo os indivíduos de cor de pele negra e parda, pacientes com xeroderma pigmentoso, síndrome do nevus displásico, melanoma e outros tumores malignos, ou admitidos por doenças associadas à exposição solar (eritema solar, ceratose actínica, nevo displásico). As razões de internação dos controles foram consideradas e as diversas categorias diagnósticas distribuídas, de tal modo que nenhuma doença fosse representada em proporção elevada quando comparada com as demais.

O tamanho da amostra foi calculado a partir do histórico do número de atendimentos de pacientes com melanoma nos hospitais do município de São Paulo que varia em torno de 315 por ano. Com $\alpha = 0,05$, poder estatístico igual a 0,80 e prevalência de exposição de interesse de 20% entre os controles, o tamanho da amostra final foi de 420 dividido entre casos e controles, permitindo a detecção de um *Odds Ratio* de 1,9.

3.2 Entrevistas

Casos e controles que aceitaram participar do Projeto foram entrevistados em data previamente marcada na FMUSP, no Departamento de Medicina Preventiva por entrevistador treinado ou

dentro do próprio Hospital após se submeterem à cirurgia. Foi aplicado um questionário validado, em estudo caso-controle conduzido no Canadá, com adaptações (Elwood et al., 1985). Este instrumento era composto de questões sobre condição socioeconômica (renda, estado civil e grau de escolaridade), religião, etnia, história migratória, uso de medicamentos fotossensibilizantes, terapia imunossupressiva, fototerapia, exposição à radiações ionizantes, tabagismo, consumo de álcool, história familiar de câncer, história ocupacional, atividades de lazer, local de férias, uso de equipamento de bronzamento artificial, exposição a fontes artificiais de ultravioleta (arcos de solda, lâmpadas emissoras de UV, fornos de indução), corte de cabelo adotado, tipo de indumentária usada em atividades ocupacionais e de lazer, uso de filtro solar, uso de bronzeador, história de queimadura solar, cor da pele, cor dos olhos, cor do cabelo, sensibilidade da pele ao sol (fototipo cutâneo), quantidade de efélides e quantidade de nevos.

Após esclarecimentos sobre o projeto, os pacientes que concordaram em participar da pesquisa assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas FMUSP (Cappesq – Processo nº 539/05). Após as entrevistas, foram feitas coletas de sangue dos indivíduos e essas amostras foram encaminhadas para processamento no laboratório.

3.3 Extração de DNA e pesquisa dos polimorfismos

Amostras de sangue periférico (4 ml) dos pacientes e controles foram coletadas em tubos contendo EDTA. Após a lise dos glóbulos vermelhos com bicarbonato de amônia, o DNA foi extraído com solução salina saturada de acordo com o protocolo de Miller et al. (1998). O material resultante do processo de extração de DNA foi armazenado (-20°C) para subsequente diluição e utilização nas reações de PCR.

CYP1A1

A amplificação do éxon 7 do gene *CYP1A1* na região de polimorfismo que inclui a mutação A→G (Ile462Val – rs: 1048943) reconhecida pela enzima *MspI* foi realizada de acordo com protocolo de Carstensen et al. (1993). Os *primers* utilizados para amplificação do fragmento de interesse por PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) foram: 5' - TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT - 3' e 5' - CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT - 3'. O ciclo de co-amplificação incluiu 94°C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos de amplificação (denaturação a 94°C – 1 minuto; *annealing* a 57°C - 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de 2 minutos a 72°C). O produto de PCR foi digerido com 5 unidades da enzima de restrição *MspI*, 37°C por 12 horas. O alelo selvagem gerou um fragmento de 340pb, enquanto que o alelo variante gerou fragmentos de 200 e 140pb. A identificação dos fragmentos polimórficos foi

efetuada em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídeo, visualizado em luz UV, como mostra a Figura 1.

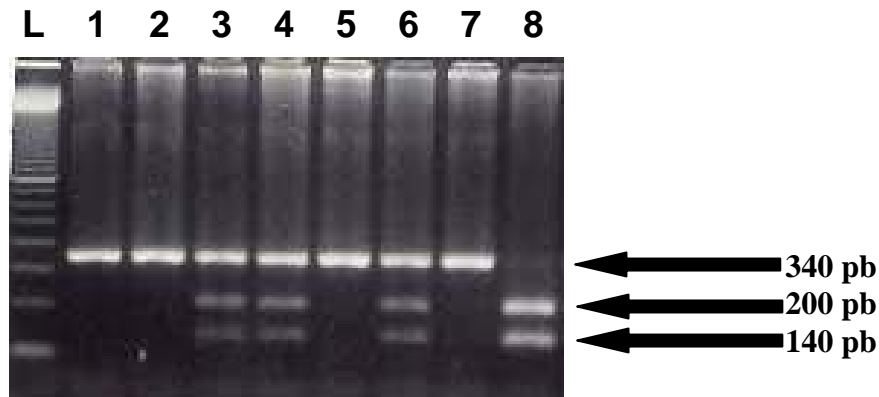


Figura 1. Produto da reação de PCR-RFLP para CYP1A1/MspI, analisado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Os indivíduos que possuíam o sítio de restrição para a enzima apresentavam fragmentos de 200 e 140 pb quando homozigotos para o polimorfismo (coluna 8) e fragmentos de 340pb, 200pb e 140pb quando heterozigotos para o polimorfismo (colunas 3, 4 e 6). Nos demais indivíduos (1, 2, 5 e 7) não foram observados os fragmentos menores após a digestão enzimática significando possuírem apenas os alelos selvagens. L = marcador de peso molecular de 100pb

CYP2E1

O método descrito por Kato et al. (1992) foi utilizado na análise de PCR-RFLP do gene *CYP2E1*. A amplificação da região 5' de regulação de transcrição do *CYP2E1*, que possui um sítio de restrição para a enzima *PstI* (*rs*: 3813867), com a transição G→C (-1295) (Hayashi et al., 1991), foi efetuada utilizando-se os seguintes *primers*: 5' - CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA - 3' e 5' - TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG - 3'. Após denaturação inicial a 95°C por 1 minuto procedeu-se 25 ciclos de

amplificação (denaturação a 95°C - 1 minuto; *annealing* a 55°C - 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 1 minuto). O produto de PCR sofreu digestão com 10 unidades da enzima de restrição *Pst*I por 12 horas. A presença do alelo variante (fragmentos de 290 e 120pb) e do alelo selvagem (410pb) foi visualizada com luz UV em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, como ilustrado na Figura 2.

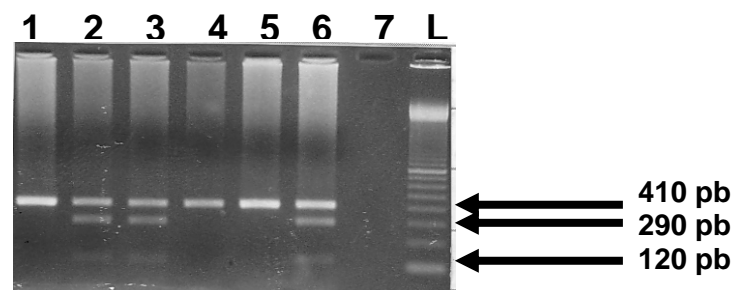


Figura 2. Produto da reação de PCR-RFLP para CYP2E1/*Pst*I analisado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Os indivíduos que possuíam o sítio de restrição para a enzima apresentavam fragmentos de 290 e 120pb (quando homocigotos para o polimorfismo) e fragmentos de 410, 290 e 120pb quando heterocigotos para o polimorfismo (colunas 2, 3 e 6). Nos demais indivíduos (1, 4 e 5) não foram observados os fragmentos menores após a digestão enzimática significando ausência do alelo variante (indivíduos com genótipo selvagem). A coluna 7 representa o controle negativo interno da reação de PCR. L = marcador de peso molecular de 100pb

GSTP1

Para análise do polimorfismo do gene *GSTP1* foi feita a amplificação por meio de PCR-RFLP do éxon 5 na região de polimorfismo que inclui mutação de um A→G (Ile105Val – *rs*: 1695), reconhecida pela enzima *Bsm*A,

de acordo protocolo de Lewis et al. (2002). Os primers utilizados para amplificação da região de interesse foram: 5'- ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA - 3' e 5' - TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT - 3'. O ciclo de co-amplificação incluiu 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação (denaturação a 94°C - 1 minuto; annealing a 63°C - 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 30 segundos, seguidos de 4 minutos a 72°C). Após a digestão com a enzima *Bsma*, 37°C por 12 horas, o alelo variante apresentou fragmentos de 91 e 85pb, enquanto que a forma selvagem apresentou fragmento de 176pb. A identificação dos fragmentos polimórficos foi efetuada em gel de poliacrilamida 6% (Figura 3), corado com nitrato de prata ou agarose ultra pura 1000 (Invitrogen) a 2%, corado com brometo de etídeo, visualizado em luz UV.

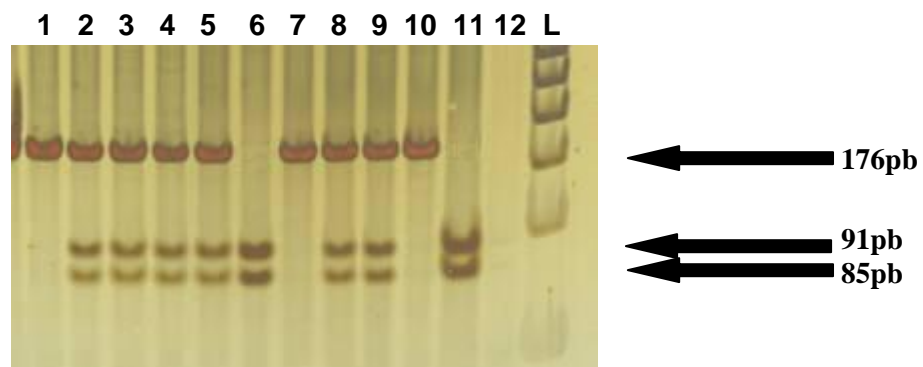


Figura 3. Produto da reação de PCR-RFLP para GSTP1/*Bsma* analisado em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. Os indivíduos que possuíam o sítio de restrição para a enzima apresentavam fragmentos de 91 e 85pb quando homocigotos para o polimorfismo (colunas 6 e 11) e fragmentos de 176, 91 e 85pb quando heterocigotos para o polimorfismo (colunas 2, 3, 4, 5, 8 e 9). Nos demais indivíduos (1, 7 e 10) não foram observados os fragmentos menores após a digestão enzimática significando serem indivíduos com genótipo selvagem. A coluna 12 representa o controle negativo interno da reação de PCR. L = marcador de peso molecular de 50pb

GSTM1* e *GSTT1

Para a avaliação da presença ou ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foi utilizada uma reação única de PCR (*multiplex* – PCR), conforme descrito por Abdel-Rahman et al. (1996). Para amplificação dos fragmentos de interesse foram utilizados os seguintes *primers* para *GSTM1*: *GSTM1*-G1 (5'- GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C - 3') e *GSTM1*-G2 (5' - GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G - 3') e para *GSTT1*: *GSTT1*-1 (5' - TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC - 3') e *GSTT1*-2 (5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA - 3'). Como controle interno da reação, foram também incluídos *primers* específicos para amplificação do exon 7 do gene *CYP1A1* (*CYP1A1*-1 - 5' GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT - 3' e *CYP1A1*- 2 - 5' - CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC -3'). Após 5 minutos a 94°C, ocorreram 30 ciclos de amplificação (denaturação a 94°C – 2 minutos; *annealing* a 59°C - 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 1 minuto) com 10 minutos de extensão da cadeia ao final da reação (72°C). O produto de PCR foi identificado em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo e visualizados em luz UV. A presença do gene *GSTT1* foi identificada por um fragmento de 480pb e do *GSTM1* por 215pb. Um fragmento de 312pb, presente em todas as reações, correspondeu ao gene *CYP1A1* que serviu de controle interno da reação mostrando garantia de positividade no processo de amplificação (Figura 4).

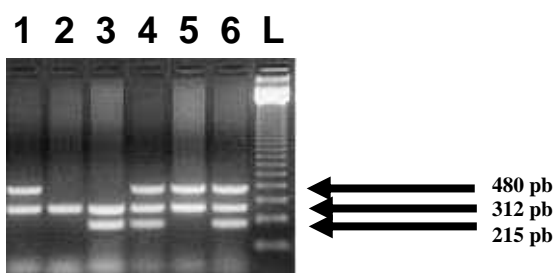


Figura 4. Produto da reação multiplex de PCR para *GSTT1* e *GSTM1*, analisado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo. Os indivíduos homocigotos para ausência somente do gene *GSTM1* (*GSTM1 null*) não apresentaram o fragmento de 215pb (colunas 1 e 5); enquanto que os homocigotos para ausência do gene *GSTT1* (*GSTT1 null*) não apresentaram o fragmento de 480pb (coluna 3); ausência dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram representados somente pelo fragmento de 312pb (coluna 2); indivíduos portadores dos dois genes apresentaram além do fragmento de 312pb (controle da reação) os fragmentos de 480pb e 215pb correspondentes aos genes *GSTT1* e *GSTM1*, respectivamente (colunas 4 e 6). L = marcador de peso molecular de 100pb

XRCC1

A amplificação da região de regulação de transcrição e do éxon 10 do gene *XRCC1* foi efetuada utilizando-se os primers correspondentes aos códons 194 (mutação C→T na região de regulação de transcrição do gene – Arg194Trp – rs: 1799782) e 399 (mutação G→A no éxon 10 – Arg399Gln – rs: 25487) que foram usados para gerar produtos de 313pb e 615pb, conforme descrito por Abdam-Rahman et al. (2000). Foram usados simultaneamente *primers* do códon 194 (XR2F 5'- GCC CCG TCC AGG TA - 3' e XR2R 5' - AGC CCC AAG ACC CTT TCA ATC - 3') e *primers* do códon 399 (XR1F 5' - TTG TGC TTT CTC TGT GTC CA - 3' e XR1R 5' - TCC TCC AGC CTT TTC TGA TA - 3'). As condições da PCR-RFLP para

amplificação do fragmento de interesse incluiu: denaturação de 94°C por 30 segundos, *annealing* a 62°C- 1 minuto e extensão 72°C - 45 segundos. Uma extensão de parada, 72°C, 5 min, terminando a reação, que incluiu 30 ciclos de amplificação. O produto de PCR foi digerido com a enzima de restrição *MspI* por 12 horas a 37°C. Após corrida de eletroforese, em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata ou agarose ultra pura 1000 (Invitrogen) 2%, corado com brometo de etídeo, os fragmentos gerados foram avaliados da seguinte forma: para o códon 194 a ausência do sítio de restrição no amplificado gerou um fragmento de 313pb, indicando ser um alelo variante Trp, pois o alelo selvagem Arg gerou fragmentos de 292 e 20pb, após digestão enzimática. Para o códon 399 a ausência do sítio de restrição no amplificado gerou um fragmento de 615pb, indicando ser o alelo variante Gln, pois o alelo selvagem Arg gerou fragmentos de 374 e 221pb. Para o controle interno da reação multiplex foi gerado um fragmento de 174pb presente em todos os indivíduos testados (Figura 5).

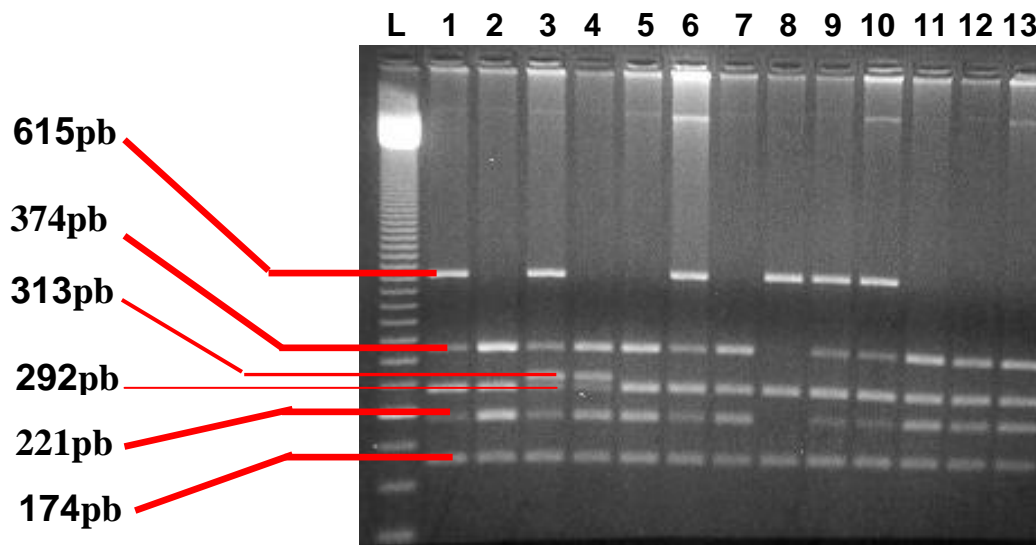


Figura 5. Produto da reação de PCR-RFLP multiplex para XRCC1/MspI, analisado em gel agarose ultra pura 1000 (Invitrogen) 2%, corado com brometo de etídeo. Os indivíduos homocigotos para a ausência de mutação no sítio de restrição, permitindo a ação da enzima, tanto no códon 399 como no códon 194, são considerados selvagens para ambos os códons: Arg/Arg e Arg/Arg (colunas 2, 5, 7, 11, 12 e 13). Outros tipos de combinações que incluem mutações no sítio de restrição que impedem a ação da enzima podem ser observados no exemplo acima: os indivíduos 1, 6, 9, e 10 são heterocigotos para o códon 399 (Arg/Gln) e homocigotos selvagens para o códon 194 (Arg/Arg); o indivíduo 3 é heterocigoto para ambos os códons estudados (Arg/Gln e Arg/ Trp); o indivíduo 4 é homocigoto selvagem para o códon 399 (Arg/Arg) e heterocigoto para o códon 194 (Arg/ Trp); e, finalmente o indivíduo 8 que é homocigoto para o polimorfismo que impede a ação da enzima no códon 399 (Gln/Gln) e homocigoto selvagem para o códon 194 (Arg/Arg). L = marcador de peso molecular

XRCC3

A amplificação do polimorfismo do éxon 7 do gene *XRCC3* foi executada utilizando-se o protocolo de Matullo et al. (2001). A região polimórfica resultou na troca T→C (Thr241Met – rs: 861539) reconhecida pela enzima *NcoI*. Para amplificação do fragmento de interesse foram

utilizados os primers: 5' - GCC TGG TGG TCA TCG ACT C - 3' e 5' - ACA GGG CTC TGG AAG GCA CTG CTC AGC TCA CGC ACC - 3'. O ciclo de co-amplificação incluiu 95°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificação (denaturação a 95°C por 20 segundos; annealing a 60°C por 20 segundos e extensão da cadeia a 72°C por 20 segundos, seguidos de 5 minutos a 72°C). O produto de PCR sofreu digestão com a enzima de restrição *NcoI*, 37°C por 12 horas e ao final o alelo variante gerou fragmentos de 97 e 39pb, enquanto que a forma selvagem apresentou fragmento de 136pb. A identificação dos fragmentos polimórficos foi efetuada em gel de poliacrilamida 6% corado com prata ou de agarose ultra pura 1000 (Invitrogen) a 2% corado com brometo de etídeo, visualizado em luz UV.

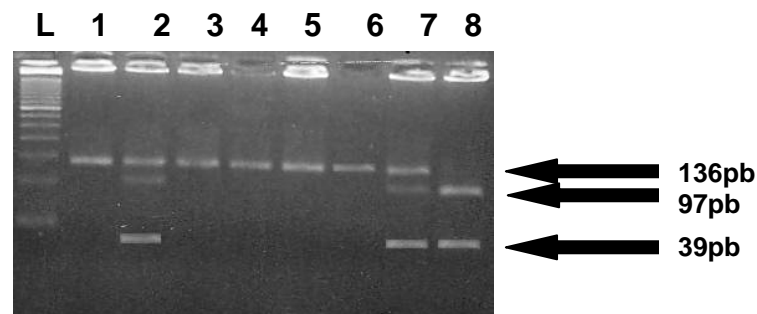


Figura 6. Produto da reação de PCR-RFLP para XRCC3/*NcoI*, analisado em gel de agarose ultra pura 1000 (Invitrogen) a 2% corado com brometo de etídeo. Os indivíduos que possuíam o sítio de restrição para a enzima apresentaram fragmentos de 97 e 39pb (quando homocigotos para o polimorfismo, coluna 8) e fragmentos de 136pb quando homocigotos selvagens (colunas 1, 3, 4, 5 e 6). Os indivíduos 2 e 7 eram heterocigotos para o polimorfismo e apresentaram fragmentos de 136, 97 e 39pb. L= marcador de peso molecular de 50pb

XPD

Para o polimorfismo do *XPD Lys*, a amplificação da região polimórfica que inclui a troca A→C no éxon 23 do gene (Lys751Gln – rs: 13181), identificada pela enzima *Pst*I, foi realizada de acordo com Bacarelli et al. (2004). Foram utilizados os primers: 5' - ATC CTG TCC CTA CTG GCC ATT C - 3' e 5' - TGT GGA CGT GAC AGT GAG AAA T - 3' para amplificação da região de interesse. O ciclo de co-amplificação incluiu 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação (denaturação a 94°C – 1 minuto; annealing a 60°C – 2 minutos e extensão da cadeia a 72°C por 2 minutos, seguidos de 5 minutos a 72°C). O produto de PCR sofreu digestão com 10 unidades da enzima de restrição *Pst*I, 37°C por 12 horas. Após a digestão com a enzima de restrição, o alelo variante apresentou fragmentos de 66, 100 e 158pb, enquanto que a forma selvagem apresentou fragmentos de 100 e 224pb (Figura 7). A identificação dos fragmentos polimórficos foi efetuada em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e visualizados em luz UV (Figura 7).

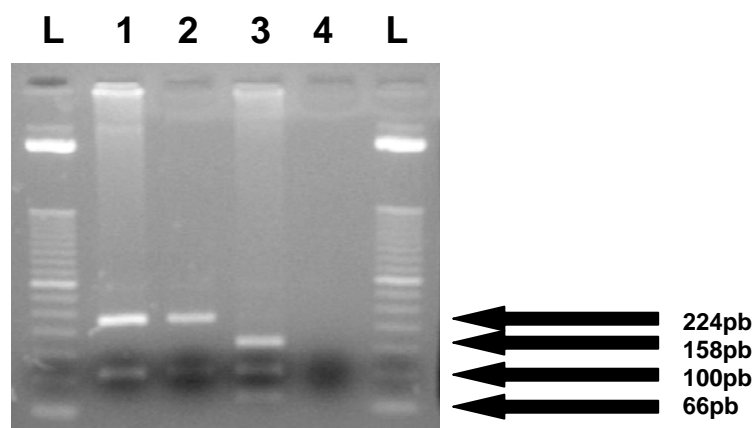


Figura 7. Produto da reação de PCR-RFLP para *XPD/PstI*, analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os indivíduos homozigotos para o polimorfismo apresentaram fragmentos de 158, 100 e 66pb (colunas 3) e fragmentos de 224 e 100pb quando homozigotos selvagem (colunas 1 e 2). O indivíduo heterozigoto para o polimorfismo apresentou fragmentos de 224, 158, 100 e 66pb (não mostrado na presente figura). L= marcador de peso molecular

VDR/FokI

A amplificação do polimorfismo do gene *VDR* (éxon 2), através de PCR-RFLP, foi executada de acordo com adaptações do protocolo de Hutchinson et al., 2000. A região polimórfica, identificada pela enzima *FokI*, corresponde a uma troca C→T (*rs*: 2228570) que gera dois códons iniciadores, e a formação de duas proteínas de tamanhos diferentes. Foram utilizados os primers: 5'- AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT - 3' e 5'- ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC - 3' para amplificação da região de interesse. O ciclo de co-amplificação incluiu 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação (denaturação a 94°C – 30 segundos; annealing a 60°C – 30 segundos e extensão da cadeia a 72°C por

30 segundos, seguidos de 5 minutos a 72°C). O produto de PCR sofreu digestão com 5 unidades da enzima de restrição *FokI*, 37°C por 20 horas. Após a digestão com a enzima de restrição, o alelo variante apresentou fragmentos de 196 e 69pb, enquanto que a forma selvagem apresentou fragmento de 265pb. A identificação dos fragmentos polimórficos foi efetuada em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo e visualizados em luz UV (Figura 8).

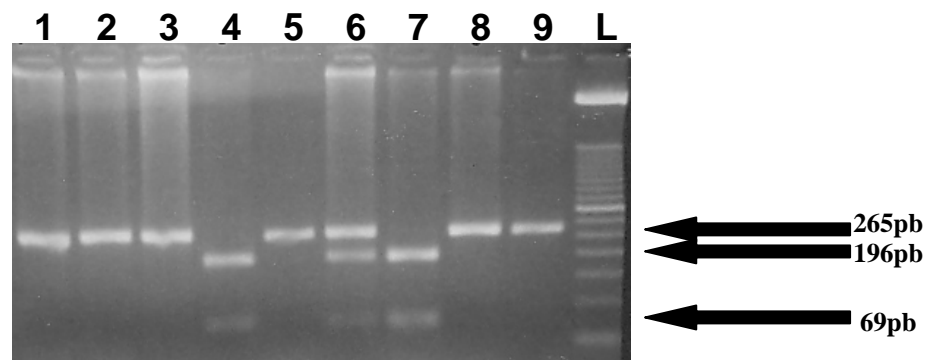


Figura 8. Produto da reação de PCR-RFLP para *VDR/FokI*, analisado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. Os indivíduos que possuíam o sítio de restrição para a enzima apresentaram fragmentos de 196 e 69pb quando homocigotos para o polimorfismo (colunas 4 e 7) e fragmentos de 265pb quando homocigotos selvagens (colunas 1, 2, 3, 5, 8 e 9). O indivíduo 6 era heterocigoto para o polimorfismo e apresentou fragmentos de 265, 196 e 69pb. L= marcador de peso molecular de 50pb

VDR/Taq

A amplificação da região de polimorfismo do gene *VDR* (éxon 9) foi executada de acordo com adaptações do protocolo de Hutchinson et al., 2000. A região polimórfica resultou na troca de um C→T (*rs*: 731236), que foi

reconhecida pela enzima *TaqI*. Para amplificação da região de interesse foram utilizados os seguintes primers: 5' - CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G - 3' e 5'- CGG CAG CGG ATG TAC GTC TGC AG - 3'. O ciclo de co-amplificação incluiu 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação (denaturação a 94°C – 30 segundos; annealing a 60°C – 30 segundos e extensão da cadeia a 72°C por 30 segundos, seguidos de 5 minutos a 72°C). O produto de PCR sofreu digestão com a enzima de restrição *TaqI*, 62°C por 20 horas. Após a digestão com a enzima de restrição, o alelo variante apresentou fragmentos de 260 e 85pb, enquanto que a forma selvagem apresentou fragmento de 345pb. A identificação dos fragmentos polimórficos foi efetuada em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo e visualizados em luz UV (Figura 9).

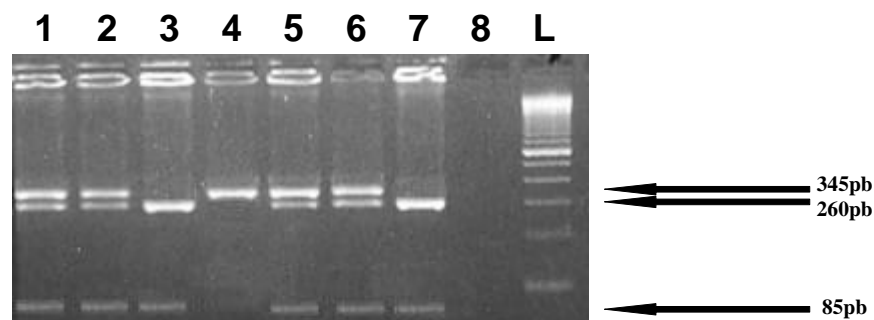


Figura 9. Produto da reação de PCR-RFLP para *VDR/TaqI*, analisado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo. Os indivíduos que possuíam o sítio de restrição para a enzima apresentaram fragmentos de 260 e 85pb quando homocigotos para o polimorfismo (colunas 3 e 7) e fragmentos de 345pb quando homocigotos selvagens (coluna 4). Os indivíduos 1, 2, 5 e 6 eram heterocigotos para o polimorfismo e apresentaram fragmentos de 345, 260 e 85pb. A coluna 8 representa o controle negativo interno para a reação de PCR. L= marcador de peso molecular de 100pb

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para estimar o risco de melanoma associado aos fatores selecionados, foram calculados *Odds Ratios* (OR), com intervalo de confiança de 95%, como aproximações dos riscos relativos (Breslow e Day, 1980), considerando-se a doença como variável dependente e os fatores de exposição como variáveis independentes. A análise foi realizada por modelo multivariado através do programa estatístico STATA 9 (*Stata Corporation, College Station, TX, versão 9*).

As variáveis de exposição que apresentaram significância abaixo de 0,20 ($p < 0,20$) foram testadas em um modelo de regressão logística múltipla não condicional também através do programa estatístico STATA 9 (*Stata Corporation, College Station, TX, versão 9*) para um ajustamento inicial. Escolaridade foi mantida no modelo final por ser considerado fator de confusão na avaliação das condições sócio-econômicas. As variáveis sexo e idade também foram mantidas para ajuste do pareamento. Permaneceram neste modelo apenas as variáveis que em conjunto apresentaram significância estatística inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Dentro deste modelo ajustado, foram testadas também as variáveis genéticas, uma a uma, e estimados os OR ajustados com os respectivos intervalos com 95% de confiança. Foram testadas também interações das variáveis genéticas com algumas das variáveis de exposição.

Um modelo logístico múltiplo final foi ajustado com todas as variáveis de exposição e variáveis genéticas para definir os fatores que conjuntamente poderiam influenciar o risco de melanoma. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 População do estudo

A seleção dos participantes iniciou-se em outubro de 2004 e foi concluída em julho de 2008. Um total de 441 indivíduos de ambos os sexos (210 casos e 231 controles) foi recrutado e respondeu às perguntas do questionário utilizado como instrumento de nosso estudo. Por motivos de recusas (37 indivíduos) ou óbitos (três) a coleta de sangue foi possível em 401 indivíduos sendo 193 pacientes com melanoma e 208 controles

Dentre os pacientes com melanoma 21 (11,1%) eram provenientes do HCFMUSP, 127 (65,8%) do Hospital AC Camargo e 45 (23,1%) do Instituto Brasileiro do Controle do Câncer. Neste grupo, 60 (31,1%) indivíduos foram atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e 131 (67,9%) por diferentes convênios médicos, e de dois não tivemos esta informação.

Quanto aos indivíduos do grupo controle (208), todos foram recrutados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia e no Departamento de Gastroenterologia do HCFMUSP. Destes, 112 (53,8%) indivíduos foram atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e 88 (42,3%) por diversos convênios médicos, e oito desses indivíduos não tivemos esta informação.

5.2 Característica do tumor nos pacientes com melanoma

A distribuição das características do tumor diagnosticado nos pacientes com melanoma, de acordo com a classificação histopatológica e estadiamento tumoral de LClark e espessura da lesão segundo a medição de Breslow, é apresentada na Tabela 1. Em função da não padronização dos laudos histopatológicos dos pacientes com melanoma nos diferentes Hospitais participantes do estudo, a informação de apenas 103 indivíduos é apresentada a seguir. De acordo com o estadiamento tumoral (LClark), observamos que em mais da metade dos pacientes com esta informação (51,5%) o tumor removido estava invadindo a transição derme papilar/reticular, seguido pelo melanoma com invasão da derme papilar (24,3%), semelhante a frequência do melanoma com invasão da derme reticular (21,4%) e com menor incidência o melanoma localizado com crescimento intra-epidérmico (2,9%). Já em relação à espessura do tumor, a maioria dos pacientes (52,4%) teve o tumor removido com dimensões inferiores a 1,0 mm de espessura (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição das características histopatológicas do tumor de pacientes com melanoma, de acordo com a classificação de Clark e índice de Breslow

Variável	N	%
Lclark		
I -Displasia Melanocídica Severa/ crescimento intra-epidérmico	3	2,9
II -Invasão da derme papilar	25	24,3
III- Invasão da transição derme papilar/reticular	53	51,5
IV- invasão da derme reticular	22	21,4
V- invasão do tecido celular subcutâneo	0	---
Breslow		
I – espessura do tumor <1,0 mm	54	52,4
II – espessura do tumor = 1,1-2,0 mm	24	23,3
III – espessura do tumor =2,0-4,0 mm	21	20,4
IV – espessura do tumor > 4,0 mm	4	3,9

5.3 Características da população de estudo

As principais características estudadas nas duas populações encontram-se descritas nas Tabelas 2 a 5. Os dois grupos foram similares quanto ao sexo e idade uma vez que a seleção seguiu a distribuição da faixa etária em decênios, conforme apresentado na Tabela 2.

Dentre os pacientes com melanoma, 96 (49,7%) eram homens e 97 (50,3%) mulheres – como mostrado na Tabela 2. Dentre os pacientes do sexo masculino, a idade média foi de $51,9 \pm 13,95$ anos (variando de 17 a 79 anos) e entre as mulheres a média foi de $51,8 \pm 14,90$ anos, variando entre 17 e 78 anos. Já os indivíduos controles analisados, 107 eram do sexo masculino (51,4%) e 98 do sexo feminino (48,6%), como mostrado na Tabela 2. A idade média dos controles do sexo masculino foi de $48,0 \pm 14,90$, variando entre 18 a 79 anos e para o sexo feminino foi de $50,0 \pm 14,70$ anos (variando de 15 a 78 anos). Como os indivíduos foram pareados por sexo e idade, a distribuição dos mesmos foi executada em faixas etárias de dez em dez anos, juntando-se ambos os sexos (Tabela 2).

Verificamos que 68,1% dos pacientes com melanoma eram casados comparados com 56,7% do grupo controle e essa diferença foi estatisticamente significativa (OR ajustado = 2,35; IC 95%, 1,25-4,41), conforme apresentado na Tabela 2.

Quanto à escolaridade, 13,1% dos pacientes possuíam 1º grau completo e 22,4% segundo grau completo, enquanto que no grupo controle 24,3% haviam completado somente o primeiro grau e 37,5% tinham o

segundo grau completo (Tabela 2). Essa variável pareceu acompanhar a estimativa que foi feita da situação econômica dos envolvidos na pesquisa. Verificamos que aproximadamente 34% dos casos tinham renda superior a R\$4800,00, valor que foi relatado por 20% dos controles (Tabela 2). A análise de OR ajustada revelou risco praticamente três vezes maior para melanoma nos grupos com maior renda mensal (OR ajustado = 2,89; IC 95%, 1,27-6,57), conforme apresentado na Tabela 2. É interessante ressaltar que a menor escolaridade esteve associada com menor risco para o desenvolvimento da doença, tanto nos indivíduos que tinham somente o primeiro grau completo (OR ajustado = 0,38; IC 95%, 0,17-0,81) como também segundo grau completo (OR ajustado = 0,45; IC 95%, 0,21-0,94), conforme apresentado na Tabela 2.

Na análise da descendência verificamos que 38% dos pacientes relataram possuírem três ou quatro avós europeus, comparados com 14% dos controles. Ter descendência maior de europeus aumentou praticamente quatro vezes o risco de melanoma (OR ajustado = 3,94; IC 95%, 2,21-7,02), conforme apresentado na Tabela 2.

Em nosso estudo 94,6% dos pacientes com melanoma tinham a cor de pele branca em comparação com 83,1% dos controles (Tabela 3). Os demais foram classificados como morenos claros por apresentarem indivíduos com cor de pele mulata em sua descendência (5,4% dos casos e 16,9% dos controles). Aproximadamente 70% dos pacientes com melanoma apresentaram cor de cabelo mais claro (castanho médio, loiro e ruivo) em comparação com 47% dos controles, o mesmo ocorrendo com a cor dos

olhos castanho-claro, azuis ou verdes (76,1% dos casos contra 48,5% controles) conforme apresentado na Tabela 3. O risco de melanoma foi maior para indivíduos de pele branca (OR ajustado = 3,44; IC 95%, 1,62-7,33), cor de cabelo castanho/avermelhado (OR ajustado = 2,15; IC 95%, 1,36-3,39), cabelo loiro ou ruivo (OR ajustado = 5,19; IC 95%, 2,51-10,73) cor dos olhos castanhos claros/esverdeados/mel (OR ajustado = 2,75; IC 95%, 1,69-4,47), olhos verdes/cinza (OR ajustado = 3,64; IC 95%, 1,82-7,26) ou azuis (OR ajustado = 22,04; IC 95%, 4,82-100,70), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 2: Distribuição de fatores individuais e demográficos avaliados nos 193 pacientes com melanoma e nos 208 controles

Variável	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)	p
Sexo					0,624
Masculino	96 (49,7)	107 (52,2)			
Feminino	97 (50,3)	98 (47,8)			
Idade (anos)					0,518
Média ± dp	52 ± 14,28	48 ± 15,24			
<29	12 (6,2)	21 (10,2)			
30-39	26 (13,5)	34 (16,6)			
40-49	52 (26,9)	55 (26,8)			
50-59	44 (22,8)	46 (22,5)			
60-69	34 (17,6)	28 (13,7)			
70-79	25 (13,0)	21 (10,2)			
Estado Civil					
Solteiro (a)	24 (13,2)	48 (25,7)	1	1	
Casado (a)	124 (68,1)	106 (56,7)	2,34 (1,34-4,07)	2,35 (1,25-4,41)	
Separado (a)	16 (8,8)	17 (9,1)	1,88 (0,81-4,36)	1,75 (0,68-4,49)	
Viúvo (a)	18 (9,9)	16 (8,5)	2,25 (0,98-5,18)	2,27 (0,86-6,00)	
Escolaridade					
Até 1º grau incompl.	37 (20,2)	30 (15,9)	1	1	
1º grau	24 (13,1)	46 (24,3)	0,42 (0,21-0,84)	0,38 (0,17-0,81)	
2º grau	41 (22,4)	71 (37,5)	0,47 (0,25-0,87)	0,45 (0,21-0,94)	
Superior/pós graduação	81 (44,3)	42 (22,2)	1,56 (0,85-2,87)	1,38 (0,58-3,23)	
Renda R\$					
Até 720	22 (12,0)	36 (19,4)	1	1	
721 a 1200	23 (12,6)	32 (17,2)	1,18 (0,55-2,50)	1,43 (0,61-3,36)	
1201 a 2400	30 (16,4)	44 (23,6)	1,12 (0,55-2,26)	1,09 (0,48-2,46)	
2401 a 4800	46 (25,1)	37 (19,9)	2,03 (1,03-4,03)	2,14 (0,97-4,68)	
Mais de 4801	62 (33,9)	37 (19,9)	2,74 (1,40-5,35)	2,89 (1,27-6,57)	
Ascendência					
4 avós brasileiros	66 (36,5)	120 (63,5)	1	1	
1 avô europeu	13 (7,2)	11 (5,8)	2,15 (0,91-5,06)	1,51 (0,58-3,95)	
2 avós europeus	33 (18,2)	31 (16,4)	1,93 (1,09-3,44)	1,50 (0,81-2,81)	
3 ou 4 avós europeus	69 (38,1)	27 (14,3)	4,65 (2,72-7,94)	3,94 (2,21-7,02)	

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e escolaridade; IC = Intervalo de 95% de confiança

Tabela 3: Distribuição das características fenotípicas entre pacientes com melanoma e controles

Características fenotípicas	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)
Cor da pele				
Morena	10 (5,4)	31 (16,9)	1	1
Branca	174 (94,6)	152 (83,1)	3,55 (1,68-7,48)	3,44 (1,62-7,33)
Cor do cabelo				
Preto/cast. escuro	56 (30,4)	104 (53,1)	1	1
Cast. médio/claro/averm	90 (48,9)	79 (40,3)	2,12 (1,36-3,30)	2,15 (1,36-3,39)
Loiro claro/escuro e ruivo	38 (20,7)	13 (6,6)	5,43 (2,67-11,03)	5,19 (2,51-10,73)
Cor dos olhos				
Preto/ Cast. escuro	44 (23,9)	101 (51,5)	1	1
Cast.claro/esverdeado/mel	90 (48,9)	72 (36,7)	2,87 (1,79-4,59)	2,75 (1,69-4,47)
Verde/Cinza	32 (17,4)	21 (10,7)	3,50 (1,82-6,73)	3,64 (1,82-7,26)
Azul***	18 (9,8)	2 (1,1)	20,66 (4,60-92,90)	22,04(4,82-100,70)

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e escolaridade; IC = Intervalo de 95% de confiança

***Teste Exato de Fisher - $p < 0,001$

A Tabela 4 apresenta o histórico de queimaduras relatado pelos pacientes e pelos controles durante a vida, decorrente da exposição ao sol e à radiação artificial. Esses dados permitem também estimar o fototipo de cada indivíduo, segundo a classificação de Fitzpatrick (Rubegni et al., 1997), por subdivisão em classes de sensibilidade à exposição solar, sendo I: sempre queima e/ou nunca bronzeia; II: frequentemente queima e/ou bronzeia pouco; III: raramente queima e/ou bronzeia bastante; IV: nunca queima e/ou bronzeia intensamente.

Verificamos que o risco de melanoma estava associado com o relato de história de queimadura solar grave com dor por dois dias (OR ajustado = 2,84;

IC 95%, 1,78-4,51) e maior exposição solar com mais de sete queimaduras na infância (OR ajustado = 7,50; IC 95%, 3,66-15,38) ou durante a juventude (OR ajustado = 8,18; IC 95%, 4,08-16,39). Em relação ao fototipo da pele, apesar de todas as categorias com sensibilidade a luz solar para queimaduras terem apresentado significância de risco aumentado ao melanoma quando comparamos casos aos controles, destacamos o fototipo II, onde os indivíduos que relataram que se queimavam com frequência após exposição solar e que se bronzeavam pouco, apresentaram risco praticamente quatro vezes maior de câncer quando comparados com os controles (OR ajustado = 3,89; IC 95%, 2,09-7,23), como mostrado na Tabela 4.

Devido a campanhas de educação e conscientização do uso de protetor solar, o número de indivíduos que relataram que passaram a utilizá-lo nos últimos anos foi mais freqüente nos casos (48,6%) comparado ao grupo controle (36,7%), conferindo aumento de mais de três vezes no risco de melanoma (OR = 3,55; IC95%, 1,49-8,45), conforme apresentado na Tabela 4. No entanto, quando ajustamos o Odds Ratio por sexo, faixa etária e escolaridade, esta característica deixou de ser um fator de risco ao desenvolvimento da doença. A exposição a lâmpadas fluorescentes, também foi um fator de risco para o melanoma, já que a frequência de exposição foi maior nos casos (92,4%) quando comparado ao grupo controle (76,3%), conferindo um risco de mais de três vezes para a neoplasia (OR ajustado = 3,45; IC95%, 1,77-6,72).

A história de antecedentes familiares (pai e mãe) com câncer, em especial neoplasias de pele, foi avaliada em nosso estudo, sendo que estes números foram muito baixos e similares no grupo de casos (8 antecedentes com câncer de pele não melanômico e 2 antecedentes com melanoma) e no grupo controle (5 antecedentes com câncer de pele não melanômico e nenhum com melanoma), sendo que estas diferenças não foram estatisticamente significantes (dados não apresentados).

Tabela 4: Histórico de exposição solar e radiação artificial relatado pelos pacientes com melanoma e pelos controles

Características fenotípicas	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)
História de queimadura solar grave				
Não	47 (25,6)	88 (47,8)	1	1
Sim	137 (74,4)	96 (52,2)	2,67 (1,72-4,15)	2,84 (1,78-4,51)
História de queimadura até 14 anos				
Nenhuma	76 (42,9)	131 (72,0)	1	
de 1 a 6 por ano	56 (31,6)	38 (20,9)	2,54 (1,54-4,19)	2,80 (1,62-4,85)
7 ou mais por ano	45 (25,4)	13 (7,1)	5,97 (3,03-11,76)	7,50 (3,66-15,38)
História de queimadura de 15 a 19 anos				
Nenhuma	64 (36,0)	128 (69,9)	1	
de 1 a 6 por ano	65 (36,5)	39 (21,3)	3,33 (2,03-5,48)	4,17 (2,35-7,39)
7 ou mais por ano	49 (27,5)	16 (8,7)	6,13 (3,23-11,61)	8,18 (4,08-16,39)
Fototipo (Fitzpatrick)***				
IV	21 (11,5)	53 (28,8)	1	1
III	56 (30,6)	57 (31,0)	2,48 (1,33-4,63)	2,06 (1,08-3,95)
II	85 (46,4)	54 (29,3)	3,97 (2,16-7,31)	3,89 (2,09-7,23)
I	22 (12,0)	19 (10,3)	2,92 (1,32-6,47)	2,44 (1,08-5,50)
Uso de filtro solar durante a vida				
A maioria das vezes	8 (4,4)	22 (11,7)	1	1
Às vezes	9 (4,9)	7 (3,7)	3,54 (0,97-12,77)	3,88 (0,98-15,39)
Nunca/Quase nunca	77 (42,1)	90 (47,9)	2,35 (0,99-5,58)	1,86 (0,74-4,66)
Apenas nos últimos 5 anos	89 (48,6)	69 (36,7)	3,55 (1,49-8,45)	2,43 (0,97-6,10)
Uso de filtro solar na infância				
A maioria das vezes	7 (4,0)	15 (8,3)	1	1
Às vezes	2 (1,1)	3 (1,7)	1,43 (0,19-1,06)	0,98 (0,12-7,64)
Nunca/Quase nunca	168 (94,9)	163 (90,1)	2,21 (0,88-5,56)	1,70 (0,63-4,60)
Bronzeamento artificial				
Não	169 (93,9)	177 (92,7)	1	1
Sim	11 (6,1)	14 (7,3)	0,82 (0,36-1,86)	0,79 (0,34-1,85)
Exposição a lâmpada fluorescente				
Não	14 (7,6)	44 (23,7)	1	1
Sim	170 (92,4)	142 (76,3)	3,76 (1,98-7,15)	3,45 (1,77-6,72)
Exposição a raio X				
Não	177 (96,2)	190 (96,4)	1	1
Sim	7 (3,8)	7 (3,6)	1,07 (0,37-3,12)	1,28 (0,41-3,99)

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e escolaridade; IC = Intervalo de 95% de confiança

***I sempre queima, nunca bronzeia; II frequentemente queima, bronzeia pouco; III raramente queima, bronzeia bastante; IV nunca queima, bronzeia intensamente

Em nosso estudo, o histórico clínico-dermatológico relatado também foi considerado (Tabela 5). Verificamos que 57,1% dos pacientes com melanoma consultaram um dermatologista quando notaram a presença de nevos, comparados com 18,9% dos controles, diferença esta considerada significativa (OR ajustado = 5,28; IC 95%, 3,27-8,51). A remoção cirúrgica de lesões cutâneas também esteve relacionada com maior risco de melanoma (OR ajustado 1,73; IC 95%, 1,03-2,88), como mostrado na Tabela 5. Por outro lado, o histórico pessoal positivo de acne na adolescência foi mais freqüente nos controles (68,0%) comparado ao grupo de casos (56,8%), o que parece ter sido um fator de proteção ao desenvolvimento de melanoma maligno (OR ajustado = 0,62; IC 95%, 0,38-0,97).

Tabela 5: Antecedentes clínico-dermatológicos relatados pelos pacientes com melanoma e pelos controles

Características fenotípicas	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)
Nevos preexistentes				
Não	79 (42,9)	159 (81,1)	1	1
Sim	105 (57,1)	37 (18,9)	5,71 (3,60-9,06)	5,28 (3,27-8,51)
Remoção de nevos cutâneos				
Não	130 (71,0)	161 (83,0)	1	1
Sim	53 (29,0)	33 (17,0)	1,99 (1,22-3,25)	1,73 (1,03-2,88)
Dermatites				
Não	123 (67,6)	144 (73,8)	1	1
Sim	59 (32,4)	51 (26,2)	1,35 (0,87-2,11)	1,32 (0,83-2,09)
Acne				
Não	79 (43,2)	63 (32,0)	1	1
Sim	104 (56,8)	134 (68,0)	0,62 (0,41-0,94)	0,62 (0,38-0,97)
Psoríase				
Não	176 (99,4)	189 (96,4)	1	1
Sim	7 (0,6)	7 (3,6)	1,07 (0,37-3,12)	1,17 (0,38-3,62)

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e escolaridade; IC = Intervalo de 95% de confiança

A avaliação dos hábitos alimentares, de consumo de álcool e do uso de tabaco não mostrou diferenças significantes entre os grupos avaliados (dados não apresentados).

5.4 Análise dos polimorfismos genéticos

As Tabelas 6 e 7 apresentam as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos de DNA investigados em 193 pacientes com melanoma e nos 208 controles. O equilíbrio de Hardy Weimberg foi calculado com intuito de avaliarmos se as frequências encontradas não estavam fora do esperado em uma população em panmixia (Hardy, 1908). Verificamos que todos os polimorfismos estudados estavam em equilíbrio, não apresentando diferenças do valor esperado que fossem estatisticamente significantes, tanto para os controles como para os pacientes (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6: Freqüências alélicas e distribuição genotípica do *CYP1A1/MspI*, *CYP2E1/PstI*, *GSTP1/BsmI*, *GSTM1*, *GSTT1*, *XRCC1/MspI*, *XRCC3/NcoI*, *XPD/PstI*, *VDR/FokI* e *VDR/TaqI* no grupo controle

Genótipo	Freqüências Genotípicas		χ^2	P	Freqüências Alélicas		
	Observado	Esperado			Alelo	Observado	Freqüência
<i>CYP1A1</i> AA	148	148,4	0	1	A	176	0,842
<i>CYP1A1</i> AG	56	56,4			G	33	0,158
<i>CYP1A1</i> GG	5	4,2					
<i>CYP2E1</i> GG	192	191,4	0	1	G	199,5	0,959
<i>CYP2E1</i> GT	15	16,2			T	8,5	0,041
<i>CYP2E1</i> TT	1	0,4					
<i>GSTP1</i> AA	91	89,9	0	1	A	137,5	0,6575
<i>GSTP1</i> AG	93	94,05			G	71,5	0,3425
<i>GSTP1</i> GG	25	25,05					
<i>XRCC1-194</i> CC	174	174,7	0	1	C	190,5	0,9155
<i>XRCC1-194</i> CT	33	31,85			T	17,5	0,0845
<i>XRCC1-194</i> TT	1	1,45					
<i>XRCC1-399</i> GG	85	93,6	0,03	0,98	G	139	0,6675
<i>XRCC1-399</i> GA	108	91,5			A	69	0,3325
<i>XRCC1-399</i> AA	15	22,9					
<i>XRCC3</i> CC	97	96,5	0	1	C	136	0,705
<i>XRCC3</i> CT	78	79,1			T	57	0,295
<i>XRCC3</i> TT	18	17,4					
<i>XPD</i> AA	102	96,35	0,02	0,99	A	140,5	0,686
<i>XPD</i> AC	77	88,15			C	64,5	0,314
<i>XPD</i> CC	26	20,50					
<i>VDR-F</i> CC	109	106,6	0,01	0,99	C	89,5	0,711
<i>VDR-F</i> CT	79	85,7			T	110,5	0,289
<i>VDR-F</i> TT	21	16,7					
<i>VDR-T</i> CC	79	83,6	0,01	0,995	C	133	0,6365
<i>VDR-T</i> CT	108	98,2			T	76	0,3635
<i>VDR-T</i> TT	22	27,2					

Tabela 7: Freqüências alélicas e distribuição genotípica do *CYP1A1/MspI*, *CYP2E1/PstI*, *GSTP1/BsmI*, *GSTM1*, *GSTT1*, *XRCC1/MspI*, *XRCC3/NcoI*, *XPB/PstI*, *VDR/FokI* e *VDR/TaqI* no grupo de pacientes com melanoma

Genótipo	Freqüências Genotípicas			P	Alelo	Freqüências Alélicas	
	Observado	Esperado	χ^2			Observado	Freqüência
<i>CYP1A1</i> AA	131	129,9	0	1	A	158	0,8275
<i>CYP1A1</i> AG	54	53,5			G	33	0,1725
<i>CYP1A1</i> GG	6	7,6					
<i>CYP2E1</i> GG	168	169,1	0,01	0,99	G	179	0,942
<i>CYP2E1</i> GT	22	19			T	11	0,058
<i>CYP2E1</i> TT	0	1,9					
<i>GSTP1</i> AA	75	76	0	1	A	120	0,6315
<i>GSTP1</i> AG	90	87,4			G	70	0,3685
<i>GSTP1</i> GG	25	26,6					
<i>XRCC1-194</i> CC	162	162,54	0	1	C	175	0,9255
<i>XRCC1-194</i> CT	26	25,5			T	14	0,0745
<i>XRCC1-194</i> TT	1	0,96					
<i>XRCC1-399</i> GG	70	75,6	0,02	0,99	G	120	0,6345
<i>XRCC1-399</i> GA	100	88,8			A	69	0,3655
<i>XRCC1-399</i> AA	19	24,6					
<i>XRCC3</i> CC	77	77,2	0	1	C	122,5	0,6345
<i>XRCC3</i> CT	91	90,7			T	70,5	0,6355
<i>XRCC3</i> TT	25	25,1					
<i>XPB</i> AA	81	76	0,01	0,99 5	A	121	0,6345
<i>XPB</i> AC	80	89,3			C	69	0,3655
<i>XPB</i> CC	29	24,7					
<i>VDR-F</i> CC	85	89,3	0,01	0,99 5	C	130,5	0,6865
<i>VDR-F</i> CT	91	81,7			T	59,5	0,3135
<i>VDR-F</i> TT	14	19					
<i>VDR-T</i> CC	77	80,64	0,01	0,99 5	C	125	0,651
<i>VDR-T</i> CT	96	88,32			T	67	0,349
<i>VDR-T</i> TT	19	23,04					

A Tabela 8 mostra a distribuição das frequências genotípicas para os diferentes genes de metabolização de fase I e II (*CYP1A1/Mspl*, *CYP2E1/PstI*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1/Bsma*) para os dois grupos estudados. A deleção do gene *GSTT1* foi verificada em maior frequência (29,3%) nos controles quando comparados aos pacientes com melanoma (20,2%), o que parece ter conferido proteção para a doença (OR ajustado = 0,60; IC95%, 0,37-0,97), conforme apresentado na Tabela 8.

Considerando-se que alelos variantes dos genes de metabolização das fases I e II podem estar presentes no mesmo indivíduo, avaliamos a contribuição da associação gene-gene no risco de melanoma. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos na associação entre os genes da fase I (*CYPs*) versus os genes da fase II de metabolização (*GSTs*). Na análise das possíveis interações considerou-se como referência a presença do gene selvagem em ambos os genes estudados. Não foi verificada associação gene-gene estatisticamente significativa quando avaliados os pacientes com melanoma e os controles conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 8: Distribuição da frequência (%) de polimorfismos de genes das fases I e II de metabolização, a saber, *CYP1A1/Mspl*, *CYP2E1/PstI*, *GSTP1/Bsma*, *GSTM1*, *GSTT1*, nos pacientes com melanoma e nos controles

Genótipos	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)
<i>CYP1A1/Mspl</i>				
AA	133 (69,3)	146 (70,2)	1	1
AG	53 (27,6)	57 (27,4)	1,02 (0,66-1,59)	1,07 (0,67-1,71)
GG	6 (3,1)	5 (2,4)	1,31 (0,39-4,42)	1,08 (0,30-3,90)
AG/GG	59 (30,7)	62 (29,8)	1,04 (0,68-1,60)	1,07 (0,68-1,68)
<i>CYP2E1/PstI</i>				
GG	170 (89,0)	190 (91,8)	1	1
GT	21 (11,0)	16 (7,7)	1,47 (0,74-2,90)	1,24 (0,59-2,59)
TT	0 (0)	1 (0,5)	***	***
GT/TT	21 (11,0)	17 (8,2)	1,38 (0,70-2,70)	1,16 (0,56-2,40)
<i>GSTP1/Bsma</i>				
AA	77 (40,3)	89 (42,8)	1	1
AG	89 (46,6)	94 (45,2)	1,09 (0,72-1,67)	1,03 (0,66-1,61)
GG	25 (13,1)	25 (12,0)	1,16 (0,61-2,18)	1,04 (0,54-2,01)
AG/GG	114 (59,7)	119 (57,2)	1,11 (0,74-1,65)	1,03 (0,68-1,57)
<i>GSTM1</i>				
Presença	95(49,5)	113 (54,3)	1	1
Deleção	97 (50,5)	95 (45,7)	1,21 (0,82-1,80)	1,28 (0,85-1,95)
<i>GSTT1</i>				
Presença	153 (79,7)	147 (70,7)	1	1
Deleção	39 (20,3)	61 (29,3)	0,61 (0,38-0,97)	0,60 (0,37-0,97)

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e escolaridade; IC = intervalo de confiança de 95%

*** Não foi possível efetuar-se o cálculo de OR

Tabela 9: Distribuição das interações gene-gene das enzimas de metabolização de fase I (CYPs) e fase II (GSTs) nos pacientes com melanoma maligno e nos controles

Genótipo	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)
GSTM1/GSTT1				
+/+	74 (38,5)	85 (40,9)	1	1
Outras****	100 (52,1)	90 (43,3)	1,28 (0,84-1,95)	1,36 (0,87-2,12)
-/-	18 (9,4)	33 (15,8)	0,63 (0,33-1,20)	0,62 (0,31-1,24)
GSTM1/GSTP1				
+/AA	42 (22,0)	45 (21,6)	1	1
Outras****	136 (71,2)	149 (71,6)	0,98 (0,60-1,58)	0,97 (0,59-1,61)
-/GG	13 (6,8)	14 (6,8)	0,99 (0,42-2,36)	0,93 (0,38-2,25)
GSTT1/GSTP1				
+/AA	61 (31,9)	63 (30,3)	1	1
Outras****	127 (66,5)	136 (65,4)	0,96 (0,63-1,48)	0,88 (0,56-1,39)
- /GG	3 (1,6)	9 (4,3)	0,34 (0,09-1,33)	0,31 (0,08-1,21)
CYP1A1/CYP2E1				
AA/GG	119 (62,3)	134 (64,7)	1	1
Outras****	70 (36,6)	73 (35,3)	1,08 (0,72-1,63)	1,06 (0,69-1,63)
GG/GT	2 (1,1)	0 (0)	***	***
GSTM1/ CYP1A1				
+/AA	62 (32,3)	83 (39,9)	1	1
Outras****	125 (65,1)	122 (58,6)	1,37 (0,91-2,07)	1,43 (0,92-2,21)
-/GG	5 (2,6)	3 (1,5)	2,23 (0,51-9,69)	2,45 (0,55-10,9)
GSTT1/ CYP1A1				
+/AA	105 (54,7)	102 (49,0)	1	1
Outras****	87 (45,3)	104 (50,0)	0,81 (0,55-1,21)	0,79 (0,52-1,20)
-/GG	0 (0)	2 (1,0)	***	***
GSTM1/ CYP2E1				
+/GG	87 (45,5)	107 (51,7)	1	1
Outras****	91 (47,6)	89 (43,0)	1,26 (0,84-1,89)	1,28 (0,84-1,97)
-/GTeTT	13 (6,9)	11 (5,3)	1,45 (0,62-3,40)	1,41 (0,56-3,55)
GSTT1/ CYP2E1				
+/GG	133 (69,6)	135 (65,2)	1	1
Outras****	57 (29,8)	67 (32,4)	0,86 (0,56-1,32)	0,77 (0,49-1,20)
-/GTeTT	1 (0,6)	5 (2,4)	0,20 (0,02-1,76)	0,26 (0,03-2,39)
GSTP1/ CYP1A1				
AA/AA	53 (27,7)	61 (29,3)	1	1
Outras****	137 (71,7)	146 (70,2)	1,08 (0,70-1,67)	1,09 (0,69-1,72)
GG/GG	1(0,6)	1 (0,5)	1,15 (0,07-18,8)	***
GSTP1/ CYP2E1				
AA /GG	69 (36,1)	82 (39,6)	1	1
Outras****	120 (62,8)	122 (58,9)	1,17 (0,78-1,76)	1,07 (0,70-1,65)
GG/GT	2 (1,1)	3 (1,5)	0,79 (0,13-4,88)	0,71 (0,11-4,41)

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e escolaridade; IC = intervalo de confiança de 95%

*** Não foi possível o cálculo de OR

**** Outras combinações que não incluem os dois genótipos selvagens ou ambos mutados

+ = presença de pelo menos um alelo mutado do gene; - = deleção total dos genes

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos na análise de polimorfismos dos genes de reparo *XRCC1/MspI*, *XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI*. Verificamos que com exceção dos polimorfismos do *XRCC1-194/MspI*, as demais variantes genóticas foram mais frequentes nos casos que nos controles mas as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10: Distribuição da frequência (%) de polimorfismos dos genes de reparo *XRCC1/MspI*, *XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI* nos pacientes portadores de melanoma e nos controles

Genótipo	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)
<i>XRCC1-194/MspI</i>				
CC	163 (85,8)	173 (83,6)	1	1
CT	26 (13,7)	33 (15,9)	0,84 (0,48-1,46)	0,77 (0,43-1,40)
TT	1 (0,5)	1 (0,5)	1,06 (0,06-17,1)	0,94 (0,05-1,68)
CT/TT	27 (14,2)	34 (16,4)	0,84 (0,49-1,46)	0,78 (0,44-1,39)
<i>XRCC1-399/MspI</i>				
GG	71 (37,4)	84 (40,6)	1	1
GA	99 (52,1)	109 (52,6)	1,07 (0,71-1,63)	1,11 (0,72-1,73)
AA	20 (10,5)	14 (6,8)	1,69 (0,80-3,59)	1,45 (0,66-3,14)
GA/AA	119 (62,6)	123 (59,4)	1,14 (0,76-1,75)	1,16 (0,76-1,77)
<i>XRCC3/NcoI</i>				
CC	78 (40,6)	95 (49,5)	1	1
CT	89 (46,4)	79 (41,1)	1,35 (0,88-2,07)	1,43 (0,91-2,23)
TT	25 (13,0)	18 (9,4)	1,67 (0,85-3,28)	1,63 (0,81-3,24)
CT/TT	114 (59,4)	97 (50,5)	1,43 (0,96-2,14)	1,47 (0,96-2,23)
<i>XPB/PstI</i>				
AA	80 (41,9)	103 (50,5)	1	1
AC	82 (42,9)	75 (36,8)	1,41 (0,92-2,16)	1,35 (0,56-2,21)
CC	29 (15,2)	26 (12,7)	1,44 (0,78-2,63)	1,33 (0,71-2,52)
AC/CC	111 (58,1)	101 (49,5)	1,41 (0,95-2,10)	1,35 (0,88-2,05)

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e renda; IC = intervalo de confiança de 95%

*** Não foi possível efetuar-se o cálculo de OR

A análise de associação gene-gene em relação aos genes de reparo estudados encontra-se descrita na Tabela 11. Os pacientes com melanoma apresentaram maior frequência dos genes *XPB* e *XRCC3* com pelo menos uma variante alélica (82,7%) quando comparados com os controles (73,0%) aumentando praticamente duas vezes o risco de melanoma (*XPB/XRCC3* (OR ajustado= 1,84; IC95%, 1,08-3,13) conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11: Distribuição das interações gene-gene dos polimorfismos dos genes de reparo do DNA *XRCC1/194/Mspl*, *XRCC1/399/Mspl*, *XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI* nos pacientes com melanoma maligno e controles

Genótipo	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)
<i>XRCC1-194/399</i>				
CC/GG	54 (28,4)	66 (31,9)	1	1
Outras****	136 (71,6)	141 (68,1)	1,18 (0,77-1,81)	1,11 (0,71-1,75)
TT/AA	0 (0)	0 (0)	***	***
<i>XRCC1-194/XRCC3</i>				
CC/ CC	69 (36,3)	76 (39,8)	1	1
Outras****	121(63,7)	115 (60,2)	1,16 (0,77-1,75)	1,10 (0,71-1,69)
TT/ TT	0 (0)	0 (0)	***	***
<i>XRCC1-399/XRCC3</i>				
GG/CC	30 (15,8)	33 (17,3)	1	1
Outras****	158 (83,2)	155 (81,1)	1,12 (0,65-1,93)	1,02 (0,57-1,82)
AA/TT	2 (1,00)	3 (1,6)	0,73 (0,11-4,69)	0,58 (0,09-3,91)
<i>XRCC1-194/XPB</i>				
CC/ AA	70 (37,0)	82 (40,4)	1	1
Outras****	119 (63,0)	121 (59,6)	1,15 (0,77-1,73)	1,10 (0,71-1,69)
TT/ CC	0 (0)	0 (0)	***	***
<i>XRCC1-399/XPB</i>				
GG/ AA	31 (16,4)	42 (20,7)	1	1
Outras****	153 (80,9)	160 (78,8)	1,30 (0,77-2,17)	1,28 (0,75-2,21)
AA/ CC	5 (2,7)	1 (0,5)	6,77 (0,75-60,9)	7,27 (0,79-66,72)
<i>XPB/ XRCC3</i>				
AA/CC	30 (15,7)	49 (25,9)	1	1
Outras****	158 (82,7)	138(73,0)	1,87 (1,12-3,11)	1,84 (1,08-3,13)
CC/TT	3 (1,6)	2 (1,1)	2,45 (0,39-15,5)	2,58 (0,40-16,67)

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e escolaridade; IC = intervalo de confiança de 95%

*** Não foi possível efetuar-se o cálculo de OR

**** Outras combinações que não incluem os dois genótipos selvagens ou ambos mutados

A Tabela 12 apresenta a distribuição genotípica dos polimorfismos do *VDR* (éxons 2 - *FokI* e 9 - *TaqI*) nos grupos investigados. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para *VDR/FokI* (OR ajustado = 1,30; IC 95% = 0,86-1,97) e *VDR/TaqI* (OR ajustado = 0,87; IC 95% = 0,57-1,34), conforme apresentado na Tabela 12. Resultados semelhantes foram encontrados quando avaliada a interação dos polimorfismos do *VDR* (Tabela 12).

Tabela 12: Distribuição da frequência (%) de polimorfismos no gene receptor de vitamina D (*VDR/FokI* e *VDR/TaqI*) nos pacientes portadores de melanoma e nos controles

Genótipo	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)
<i>VDR/FokI</i>				
CC	86 (45,0)	108 (51,9)	1	1
CT	91 (47,6)	79 (38,0)	1,45 (0,96-2,19)	1,43 (0,92-2,21)
TT	14 (7,4)	21 (10,1)	0,84 (0,40-1,74)	0,83 (0,39-1,77)
CT/TT	105 (55,0)	100(48,1)	1,32 (0,89-1,96)	1,30 (0,86-1,97)
<i>VDR/TaqI</i>				
CC	76 (39,4)	80 (38,5)	1	1
CT	98 (50,8)	106 (51,0)	0,97 (0,64-1,48)	0,87 (0,56-1,36)
TT	19 (9,8)	22 (10,5)	0,91 (0,46-1,81)	0,86 (0,42-1,75)
CT/TT	117 (60,6)	128 (61,5)	0,96 (0,64-1,44)	0,87 (0,57-1,34)
<i>VDR FokI/TaqI</i>				
CC/CC	33 (17,3)	46 (22,1)	1	1
Outras***	157 (82,2)	157 (75,5)	1,39 (0,85-2,30)	1,33 (0,79-2,25)
TT/TT	1 (0,5)	5 (2,4)	0,28 (0,03-2,50)	0,25 (0,03-2,29)

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e escolaridade; IC = intervalo de confiança de 95%

*** Outras combinações que não incluem os dois genótipos selvagens ou ambos mutados

5.5 Análise da contribuição dos polimorfismos genéticos e variáveis individuais e do meio ambiente.

A análise da contribuição dos polimorfismos genéticos e as variáveis individuais como fenótipo, frequência de exposição ao sol, bem como formas de proteção ao mesmo também foi avaliada e os resultados das associações positivas encontram-se descrito na Tabela 13.

Indivíduos com cor de pele morena que tinham o polimorfismo *VDR/FokI*, em homozigose ou heterozigose, apresentaram proteção ainda maior em relação ao melanoma, conforme apresentado na Tabela 13. Por outro lado, embora o fato de ter descendência europeia na família tenha aumentado o risco de melanoma (OR ajustado = 3,94; IC 95% = 2,21-7,02 – Tabela 2), aparentemente a interação do polimorfismo em *CYP2E1/PstI* com esta característica parece ter sido associado à proteção da doença (OR ajustado = 0,04; IC 95% = 0,00-0,39 – Tabela 13),

Algumas características fenotípicas que por si só conferiram risco de melanoma (Tabela 3) também mostraram associações com alguns genótipos específicos, conforme apresentado na Tabela 13: indivíduos com cor de cabelo ruivo/loiro e polimorfismo para *XPD/PstI* apresentaram risco ainda maior do desenvolvimento de melanoma (OR ajustado = 6,63; IC 95% = 1,50-29,37), assim como indivíduos de olhos verde/cinza e polimorfismo para *CYP1A1/MspI* (OR ajustado = 16,00; IC 95% = 1,73-148,13), *GSTP1/BsmA* (OR ajustado = 5,48; IC 95% = 1,51-19,91), e *VDR/FokI* (OR ajustado = 5,93; IC 95% = 1,49-23,59) -Tabela 13.

Tabela 13: Contribuição de características fenotípicas, ascendência e antecedentes clínico-dermatológicos que mostraram associação positiva para alguns polimorfismos genéticos estudados no melanoma maligno considerando os pacientes com a doença e os controles

Variável	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)
Cor de pele morena				
<i>VDR/FokI</i>				
CC	7 (70)	6 (19,4)	1	1
CT/TT	3 (30)	25 (80,6)	0,10 (0,02-0,52)	0,07 (0,01-0,04)
Cor de cabelo ruivo e loiro escuro/claro				
<i>XPD/PstI</i>				
AA	14 (36,8)	10 (76,9)	1	1
AC/CC	24 (63,2)	3 (23,1)	5,71 (1,34-24,33)	6,63 (1,50-29,37)
Cor de olho verde/cinza				
<i>CYP1A1/Mspl</i>				
AA	19 (59,4)	20 (95,2)	1	1
AG/GG	13 (40,6)	1 (4,8)	13,68 (1,63-115,0)	16,00 (1,73-148,13)
<i>GSTP1/Bsma</i>				
AA	11 (35,5)	15 (71,4)	1	1
AG/GG	20 (64,5)	6 (28,6)	4,55 (1,37-15,08)	5,48 (1,51-19,91)
<i>VDR/FokI</i>				
CC	12 (37,5)	14 (66,7)	1	1
CT/TT	20 (62,5)	7 (33,3)	3,33 (1,05-10,59)	5,93 (1,49-23,59)
Mais de 3 avós europeus				
<i>CYP2E1/PstI</i>				
GG	67 (98,5)	21 (77,8)	1	1
GT/TT	1 (1,5)	6 (22,2)	0,05 (0,01-0,46)	0,04 (0,00-0,39)

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e escolaridade; IC = intervalo de confiança de 95%

A avaliação da contribuição do genótipo polimórfico do gene de reparo *XPD/PstI* em indivíduos que não utilizavam filtro solar demonstrou que o polimorfismo aumentou ainda mais o risco para a doença (OR ajustado = 2,17; IC95% = 1,12-4,17) (Tabela 14). Por outro lado, observamos que indivíduos expostos à radiação de lâmpada fluorescente que tinham deleção do *GSTT1* modificaram de forma favorável (proteção) o risco para melanoma (OR ajustado = 0,56; IC 95% = 0,33-0,97). O genótipo polimórfico para o *XRCC1/399/MspI* também esteve associado com o aumento de risco da doença em indivíduos com fototipo cutâneo II (OR ajustado = 2,17; IC 95% = 1,06-4,44), com mais de 6 episódios de queimaduras anuais durante a adolescência (OR ajustado = 2,39; IC 95% = 1,04-5,50), histórico de queimadura grave (OR ajustado = 1,78; IC 95% = 1,03-3,08) e que passaram a utilizar o filtro solar apenas nos últimos anos (OR ajustado = 2,12; IC 95% = 1,09-4,16), conforme apresentado na Tabela 14.

Tabela 14: Contribuição do fototipo cutâneo, histórico de exposição e proteção solar e exposição à radiação artificial que mostraram associação positiva para alguns polimorfismos genéticos estudados no melanoma maligno considerando os pacientes com a doença e controles

Variável	Casos* n (%)	Controles* n (%)	OR IC (95%)	OR Ajust** IC (95%)
Fototipo II				
<i>XRCC1/399/Mspl</i>				
GG	32 (38,1)	31 (57,4)	1	1
GA/AA	52 (61,9)	23 (42,6)	2,19 (1,09-4,39)	2,17 (1,06-4,44)
Até 6 queimaduras 15-19 anos				
<i>XRCC1/399/Mspl</i>				
GG	22 (33,8)	21 (55,3)	1	1
GA/AA	43 (66,2)	17 (44,7)	2,41 (1,06-5,48)	2,39 (1,04-5,50)
Histórico de queimadura grave				
<i>XRCC1/399/Mspl</i>				
GG	46 (34,1)	46 (48,4)	1	1
GA/AA	89 (65,9)	49 (51,6)	1,82 (1,06-3,11)	1,78 (1,03-3,08)
Utilização recente de filtro solar				
<i>XRCC1/399/Mspl</i>				
GG	26 (29,2)	32 (46,4)	1	1
GA/AA	63 (70,8)	37 (53,6)	2,10 (1,09-4,05)	2,12 (1,09-4,16)
Exposição Lâmpada fluorescente				
<i>GSTT1</i>				
<i>GSTT1+</i>	135 (79,9)	99 (69,7)	1	1
<i>GSTT1</i> deleção	34 (20,1)	43 (30,3)	0,58 (0,34-0,97)	0,56 (0,33-0,96)
Nunca usar filtro solar				
<i>XPD/PstI</i>				
AA	27 (35,5)	46 (52,3)	1	1
AC/CC	49 (64,5)	42 (47,7)	1,99 (1,06-3,73)	2,17 (1,12-4,17)

*variações nos totais são decorrentes de perdas

**OR ajustado por sexo, faixa etária e escolaridade; IC = intervalo de confiança de 95%

5.6 Análise de Regressão Logística

A análise de regressão logística múltipla escalonada com todas as variáveis de exposição, histórico clínico-dermatológico juntamente com cada polimorfismo genético foi executada em nosso estudo. Foram testadas as interações entre as mutações (polimorfismos) e cada variável de exposição e histórico clínico-dermatológico para verificar se havia influência da mutação no risco de desenvolvimento da doença para cada característica específica. O sexo e a idade dos investigados permaneceram no modelo apenas para controle dos resultados, embora tenham sido estatisticamente não significativos ($p > 0,05$), conforme apresentado na Tabela 15. Após o ajuste das variáveis de exposição e histórico clínico-dermatológico, verificamos que os fatores genéticos perderam a significância estatística, ou seja, controlando-se todos os possíveis fatores que estavam associados à doença, os polimorfismos genéticos não influenciaram no risco de melanoma, com exceção da associação dos genes *XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI*, cuja mutação de algum alelo de ambos os genes aumentou o risco de desenvolvimento do melanoma ($p = 0,049$) – Tabela 15.

Na Tabela 15 têm-se além da associação genética citada, entre os polimorfismos dos genes de reparo *XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI*, as variáveis de exposição e clínico-dermatológicas que permaneceram relacionadas ao desenvolvimento do melanoma após a análise de regressão logística múltipla e escalonada, dentre os quais destacamos como fatores de risco a doença ($p < 0,05$): a ascendência com mais de três avós europeus, exposição à lâmpadas fluorescentes (artificiais), cor de olhos clara, nevus

preexistentes, história de queimaduras solares na juventude e baixa frequência de uso do filtro solar. Por outro lado, a baixa escolaridade (OR ajustado = 0,28; IC 95% = 0,10-0,77 para 1º grau e OR ajustado = 0,21; IC 95% = 0,08-0,53 para o 2º grau) permaneceram como variáveis que conferiram proteção para a neoplasia.

Tabela 15. Resultado da análise de regressão logística múltipla e escalonada com as variáveis de exposição, histórico clínico-dermatológico e a variável genética que influenciaram o risco de melanoma

Variável	OR Ajust.	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Idade				0,384
Sexo				
Masculino				
Feminino				0,452
Ascendência Européia				
4 avós brasileiros	1,00			
mais de 3 avós europeus	4,26	1,91	9,47	<0,001
Escolaridade				
até 1o grau incompleto	1,00			
1o grau	0,28	0,10	0,77	0,014
2o grau	0,21	0,08	0,53	0,001
Lâmpada fluorescente				
Não	1,00			
Sim	5,11	2,00	13,05	0,001
Cor de olho				
preto+castanho escuro	1,00			
castanhos claro+esverdeado+mel ou amarelado	2,02	1,05	3,86	0,034
verde+verde azulado+cinza+cinza azulado+azul	5,71	2,45	13,32	<0,001
Nevos				
Não	1,00			
Sim	3,69	2,02	6,73	<0,001
Queimadura dos 15 aos 19 anos				
Nenhuma	1,00			
1 a 6 por ano	4,36	2,16	8,79	<0,001
mais que 6 por ano	5,92	2,53	13,81	<0,001
Filtro solar				
a maioria das vezes	1,00			
nunca+quase nunca	4,05	1,11	14,70	0,034
mudou de hábito ao longo do tempo	4,43	1,26	15,60	0,020
XRCC3/Ncol+XPD/Pst1				
AA/CC	1,00			
AC ou CC/CT ou TT	2,32	1,01	5,36	0,049

*OR ajustado por sexo, faixa etária, variáveis de exposição, histórico clínico-dermatológico e a variável genética; IC = intervalo de confiança de 95%

6 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos clássicos apontam os principais fatores de risco ao melanoma a história familiar da doença, nevos benignos múltiplos ou nevos atípicos e história prévia da neoplasia. Exposição intermitente e intensa à radiação UV, sensibilidade da pele ao sol e imunossupressão são fatores de risco adicionais. Porém, esses fatores parecem estar relacionados às condições genéticas individuais, como polimorfismos do DNA, que predisõem à doença, que podem ou não ser modificados por fatores pessoais como lazer, ocupação, região de moradia, intensidade e frequência de exposição ao sol, proteção ao sol, entre outros.

Na presente investigação, um estudo caso-controle de base hospitalar, foram avaliados fatores de risco ambientais, histórico clínico-dermatológico e fatores genéticos e/ou individuais em 193 pacientes com melanoma maligno cutâneo comparados com um grupo controle composto por 201 pacientes, sem histórico de neoplasia.

Os pacientes com melanoma foram na sua maioria indivíduos com a cor de pele branca, casados, com maior escolaridade quando comparados aos controles, além de apresentarem renda mensal superior a quatro salários mínimos (R\$ 530,00) em mais da metade da amostra estudada. É interessante ressaltar que o biotipo branco, com olhos e cabelos claros, estava associado à origem do indivíduo, pois o risco de melanoma foi proporcional ao número de descendentes europeus na família.

O risco duas vezes maior de melanoma observado em nossa amostra em indivíduos casados, ou que viviam com o (a) companheiro (a) quando comparados aos solteiros, parece não ter sido observado em outros estudos. Reyes-Ortiz e colaboradores (2007), ao avaliarem 14.630 americanos idosos verificaram que indivíduos viúvos apresentavam risco aumentado para o melanoma, que por sua vez era diagnosticado em estágios mais avançados e com maior incidência de morte pela doença. Quando comparados com pacientes casados, verificaram que os mesmos além de serem diagnosticados precocemente apresentavam maior sobrevida (Reyes-Ortiz et al., 2007). Uma possível explicação para os resultados obtidos na presente investigação seria o tipo de vida de indivíduos casados com filhos, que aparentemente praticam com mais frequência atividades de lazer ao ar livre, com conseqüente exposição solar mais intensa, em comparação com os indivíduos solteiros ou viúvos (Reyes-Ortiz et al., 2007). Por outro lado, a presença de um companheiro fixo poderia ajudar na identificação precoce da lesão, com diagnóstico nos estágios iniciais da doença que contribuiriam para maior possibilidade de tratamento dos pacientes. Esses dados não foram investigados em nossa população já que não foi feita análise prospectiva que incluísse a evolução clínica dos pacientes até a presente data.

Apesar de o estudo ter sido realizado em hospitais predominantemente públicos, a inclusão de pacientes e controles também atendidos nesses hospitais por convênios médicos, parece ter contribuído para o recrutamento de um número maior de casos (44,3%) com nível de escolaridade superior

completo e/ou com pós-graduação em comparação ao grupo controle (22,2%). No entanto, somente 33,9% dos pacientes com melanoma e 19,9% dos controles relataram ter uma renda mensal acima de nove salários mínimos. Desta forma, a variável escolaridade foi utilizada para ajuste do modelo estatístico em nosso estudo para evitar que a mesma interferisse na análise como fator de confusão.

O aumento de risco para a doença em indivíduos com maior nível sócio-econômico parece também ocorrer em outras populações estudadas (Birch-Johansen et al., 2008, Linos et al., 2009). Aparentemente o status sócio-econômico mais alto estaria relacionado com maior acesso ao *screening* de doenças de pele e reconhecimento de lesões malignas cutâneas, inclusive o melanoma. Essas pessoas parecem procurar com maior frequência os profissionais da saúde, o que possibilita a detecção da doença nos estágios iniciais, resultando numa maior incidência da mesma nesse grupo, comparado aos indivíduos com menor nível sócio-econômico, que por terem menos acesso aos *screenings* dermatológicos, detectam a neoplasia nos estágios mais avançados (Linos et al., 2009).

A ascendência européia de ambos os pais aumentou em praticamente quatro vezes o risco de câncer nos pacientes estudados, fator este que foi revelado pela associação da doença com características fenotípicas como cor de pele clara além de cabelos e olhos claros. Essa associação se manteve positiva mesmo após a análise de regressão múltipla escalonada ($p < 0,001$). Bakos e colaboradores (2009), em um estudo realizado no Rio Grande do Sul com 103 pacientes com melanoma, sugeriram que um número maior de

antecedentes italianos e germânicos estaria relacionado com o risco aumentado da doença na população da região sul do Brasil.

A associação do fenótipo europeu com o risco de melanoma foi observada em outras populações estudadas (Bakos et al., 2002, Garbe e Eigentler, 2007, Goldberg et al., 2007, Bakos et al., 2009, Linos et al., 2009). A descendência européia é responsável pelo fenótipo cutâneo mais claro que frequentemente está associado à menor capacidade de bronzeamento (fototipos I e II segundo a classificação de Fitzpatrick). Esse fenótipo pode ser um fator de risco importante em países equatoriais como o Brasil com alta incidência de radiação ultravioleta, praticamente o ano todo.

Os indivíduos de pele clara, quase sempre possuem olhos e cabelos também claros, em decorrência do tipo de pigmentação. Esses indivíduos produzem menos melanina, principalmente a eumelanina, que funciona como uma barreira física que espalha o UV incidente e, como um filtro, reduz sua penetração na epiderme (Slominski et al., 2004, Ou-Yang et al., 2004). Estudos recentes parecem indicar que a maior sensibilidade à exposição solar também está relacionada com polimorfismos e mutações em genes de pigmentação cutânea (Gruber et al., 2008), conforme relatado em estudos de associação genômica de larga escala (Pharoah, 2008, Sturm, 2009). Na presente investigação a cor clara dos olhos e/ou dos cabelos revelou ser fator de risco independente no desenvolvimento do melanoma, dado este também revelado em outro estudo brasileiro (Bakos et al., 2009).

A população brasileira é o resultado de uma expressiva mistura étnica resultante do processo de colonização, que originou uma gama

variada de cores de pele. Entretanto, em decorrência da colonização, a população é progressivamente de pele mais clara quando em direção ao Sudeste e Sul do Brasil, o que devido à maior latitude, aumenta o risco de melanoma. Nesta região, que compreende principalmente os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, concentra-se a maior proporção de indivíduos de origem européia e conseqüentemente a maior incidência de melanoma maligno no Brasil (Ashton-Prolla et al., 2007, Bakos et al., 2009, INCA 2009).

Na avaliação apenas do grupo dos pacientes com melanoma verificamos que 50% dos indivíduos apresentavam o tumor no estágio de invasão da derme papilar/reticular (LClark III) e diâmetro do tumor $\leq 1,0$ mm (Breslow I), ou seja, em estágios iniciais. Verificamos também que nos pacientes com melanoma a pré-existência de nevos aumentou em mais de 5 vezes a chance de desenvolvimento do melanoma (OR ajustado= 5,28; IC95% = 3,27-8,51), mesmo após a análise de regressão múltipla escalonada ($p < 0,001$). Resultados semelhantes foram encontrados em um grupo de pacientes com melanoma do Rio Grande do Sul, onde indivíduos que possuíam mais de 30 nevos preexistentes tiveram quatro vezes mais risco de melanoma (Bakos et al., 2009).

Estudos epidemiológicos confirmam a presença de nevos como um fator de risco da doença, sendo os mesmos considerados como lesões precursoras quanto marcadoras para o desenvolvimento do melanoma, e indicam que em média um em cada 500.000 nevos comuns e um em cada cinco nevos displásicos se tornam malignos (Tsao et al., 2003, Filho et al., 2003).

Dados da literatura revelam que aproximadamente 70% dos pacientes com melanomas tiveram um nevo pré - existente no sítio do tumor primário (Garbe et al., 2007, Fortes et al., 2008, Goodson et al., 2009, Friedman et al., 2009). A presença de nevos parece estar relacionada com mutações nos genes BRAF, p16 e p19^{ARF}, responsáveis pelo controle da proliferação dos melanócitos, resultando na formação de nevus senescentes, posteriormente displásicos e dependendo da exposição ambiental, em melanoma (Dhomen, 2009). Esses dados sugerem maior vigilância em pacientes com número elevado de nevos no intuito de evitar ou mesmo diagnosticar o melanoma em estágios mais precoces.

Por outro lado, o relato de acnes cutâneas mostrou ser inversamente proporcional ao risco de melanoma (OR ajustado = 0,62; IC95% = 0,38-0,97) na comparação entre os dois grupos embora essa característica tenha perdido a significância após a análise de regressão múltipla escalonada. Aparentemente não existem dados na literatura que tenham investigado a associação desta variável e o melanoma. Uma possível explicação seria a menor exposição solar em função de orientação médica visando evitar produção de secreção pelas glândulas sebáceas e cicatrizes decorrentes das erupções cutâneas. Outra sugestão seria que a produção excessiva de oleosidade nas pessoas com problemas de acne poderia se tornar uma barreira física à radiação ultravioleta (Namazi et al., 2007).

Ao longo de muitos anos, estudos epidemiológicos têm apontado a exposição solar intermitente, principalmente durante a infância, como a principal causa ambiental de melanoma (Gruber et al., 2006, Menzies 2008).

No presente estudo, os pacientes relataram maior incidência de queimaduras na infância e adolescência quando comparados com os controles revelando risco oito vezes maior quando ocorreram mais de sete queimaduras graves por ano, tanto na infância quanto na juventude. Essa associação foi mantida na análise de regressão logística múltipla e escalonada somente para os casos de queimadura grave na adolescência, ou seja, entre 15 e 19 anos de idade, independente do número de episódios ($p < 0,01$). Esse dado parece estar relacionado com o fototipo cutâneo I e II. Dados semelhantes foram encontrados por Bakos e colaboradores (2002 e 2009) na população do Rio Grande do Sul onde indivíduos com fototipo I e II apresentaram risco 3,5 vezes maior de melanoma. Os autores chamaram a atenção para a diminuição do risco de melanoma em indivíduos que relataram usar protetor solar durante a vida, com fator de proteção maior que 15 (Bakos et al., 2009).

Nos últimos anos as campanhas na mídia falada e escrita têm sido insistentes ao apontar a necessidade de utilização de cremes de proteção para raios ultravioleta. Na presente investigação o uso de protetor solar foi relatado pelos pacientes e controles como um hábito bastante recente. Poucos indivíduos confirmaram a utilização de protetor solar na infância e adolescência, tendo esse hábito sido adquirido apenas nos últimos anos. Somente na análise de regressão múltipla escalonada a falta de protetor solar ($p = 0,03$) ou mesmo a mudança recente desse hábito ($p = 0,020$) contribuíram de forma significativa aumentando em torno de quatro vezes o risco de melanoma. Dados recentes apontam que o uso de protetor solar

pode sugerir uma falsa sensação de segurança aos seus usuários, pois os mesmos permanecem mais tempo ao sol e muitas vezes não reaplicam esses protetores no prazo sugerido pelo fabricante (Baron et al., 2008). Além disso, o fator de proteção do filtro solar, que mede a eficiência de resposta do produto contra o eritema causado na pele após a exposição solar, pode não ser tão eficaz em proteger contra a radiação ultra violeta do tipo A (320-400nm), que corresponde de 95 a 99% da radiação solar terrestre (Antoniou et al., 2008). Os raios UVA são 1000 vezes menos indutores de eritema cutâneo quando comparados aos raios UVB, porém a exposição prolongada a essa radiação pode gerar o acúmulo de elementos nocivos ao DNA (Rosen, 1999). Esses dados mostram a necessidade de maiores estudos e campanhas que possam esclarecer e informar a população sobre os riscos e cuidados necessários na exposição solar não só por motivos recreacionais, mas, também por razões ocupacionais (Baron et al., 2008, Glanz et al., 2007).

De fato, as radiações fluorescentes artificiais, em ambiente fechado, também contribuíram no risco três vezes maior de melanoma nos pacientes investigados. Esse risco foi cinco vezes maior após a análise de regressão logística múltipla e escalonada ($p < 0,001$). A irradiação emitida por lâmpadas artificiais e o risco de melanoma é uma variável ainda pouco investigada na literatura. Em um estudo de meta-análise realizado por Gallagher e colaboradores (2005) os autores concluíram que a exposição às lâmpadas artificiais pode aumentar o risco de melanoma, dependendo do tempo de exposição a esta radiação, principalmente em indivíduos que se submetem

a procedimentos de bronzeamento artificial. Os efeitos da exposição às lâmpadas fluorescentes brancas ainda não foi bem elucidada (Gallagher et al., 2006). De acordo com Sayre e colaboradores (2004), as lâmpadas frias fluorescentes de tungstênio e, em especial as de quartzo de halogênio, as quais os trabalhadores de escritórios são submetidos por longos períodos de tempo, podem induzir respostas fototóxicas no organismo humano em longo prazo, embora o risco de melanoma não tenha sido estimado. As lâmpadas artificiais emitem comprimentos de ondas iguais aos raios ultravioletas A e B e em alguns casos UVC, porém não na mesma intensidade que a radiação solar (Sayre et al., 2004). Dessa forma, indivíduos de pele clara com maior fotosensibilidade e exposição prolongada aos raios UVA e UVB das lâmpadas artificiais poderiam ser mais sujeitos as lesões diretas e indiretas no DNA e ao o risco de melanoma. A análise detalhada do histórico de exposição ocupacional dos pacientes e controles poderá ajudar na interpretação dos resultados observados.

Nos estudos epidemiológicos que visam avaliar fatores de risco para determinados tumores, os hábitos individuais que incluem principalmente dieta, consumo de tabaco e álcool são frequentemente investigados. No presente estudo não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto à alimentação, o consumo de álcool e o tabagismo. O consumo de bebidas alcoólicas foi relatado por 15% dos pacientes e 28% dos controles, diferença esta considerada não significativa entre os grupos, assim como o hábito de fumar que foi relatado em proporções semelhantes em ambos os grupos. A ausência de associação

entre consumo de álcool e tabaco e o melanoma também foi observada por Fortes e colaboradores (2008) em um estudo com 304 pacientes italianos. Porém, nesse mesmo estudo a dieta constituída principalmente de frutos do mar, em especial peixes ricos em Omega 3 e o consumo diário de chás, frutas cítricas e vegetais mostraram estar associados com menor risco para a doença. Os hábitos alimentares da população brasileira em geral não envolvem o consumo diário desses alimentos, como nas dietas do Mediterrâneo, o que nos privaria em parte do efeito protetor da beta-criptoxantina das frutas cítricas, o beta caroteno dos vegetais e os polifenóis dos chás, com suas propriedades anticarcinogênicas. A fotoproteção desses alimentos ocorre por meio da eliminação dos ROS formados na pele pelo processo fotoxidativo, e pela estimulação do sistema imune, além da indução da apoptose (Tatman et al., 2002, Fortes et al., 2008, Fang et al., 2007).

Polimorfismos genéticos e o risco de melanoma

A análise de polimorfismos dos genes de metabolização de xenobióticos como *CYP1A1/Mspl*, *CYP2E1/PstI*, *GSTP1/Bsma*, *GSTM1* e *GSTT1*, genes de reparo do DNA (*XRCC1/Mspl*, *XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI*) e do receptor de vitamina D (*VDR/FokI* e *VDR/TaqI*) foi realizada em 193 pacientes com melanoma e 208 controles. Para todos os genes estudados, as frequências genotípicas observadas, nos dois grupos, estavam em equilíbrio de Hardy-Weimberg, mostrando que em ambos os grupos não havia outro fator seletivo atuando.

Somente a deleção do *GSTT1*, gene da fase II de metabolização, mostrou associação estatisticamente significativa revelando estar inversamente relacionado com o risco de melanoma (OR ajustado = 0,60; IC95% = 0,37-0,97). A ausência de *GSTT1* foi mais frequente nos controles (29%) quando comparado com os pacientes com melanoma (20%).

As enzimas da fase II de metabolização como *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1*, são responsáveis pela eliminação de produtos do estresse oxidativo e ROS, que são formados na pele em função principalmente da exposição aos raios ultravioleta do tipo A - UVA (Lear et al., 2000).

A *GSTT1* cataliza principalmente reações de detoxificação da oxidação de lipídeos, bem como hidroperóxidos citotóxicos e compostos halogenados que são genotóxicos (Whittington et al., 1999, Lear et al., 2000). Embora o *GSTT1* atue em conjunto com outras enzimas da família das GSTs, polimorfismo deste gene, que resulta na deleção completa do mesmo, parecem interferir no risco de câncer. O genótipo *GSTT1* nulo parece conferir proteção a tumores como o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, principalmente em tabagistas (Evans et al., 2004).

Estudos que avaliam a associação do *GSTT1* nulo e o melanoma ainda são contraditórios na literatura. Kanetsky et al. (2001) relataram o risco aumentado da doença nos pacientes com melanoma em uma amostra de indivíduos da Pensilvânia, com origem predominantemente alemã, que apresentavam além, da interação do *GSTT1* nulo com o *GSTM1* deletado, cabelos loiros ou ruivos (Kanetsky et al., 2001). Porém, a ausência de associação desse genótipo com o desenvolvimento do melanoma foi

observado por outros autores em populações caucasianas do Reino Unido (Ramsay et al., 2001), da Austrália (Carless et al., 2002, Fryer et al., 2005), Suécia (Bu et al., 2007) e Alemanha (Mössner et al., 2007).

Em um artigo recente Chaudru e colaboradores (2009) estudaram uma amostra de 155 indivíduos franceses de famílias com histórico de melanoma e mutações no gene *CDKN2A*, composta por 56 pacientes com a neoplasia e 139 participantes não afetados (controles). Os autores verificaram a diminuição do risco de melanoma associado à deleção do *GSTT1*, já que o grupo controle apresentou frequência maior do genótipo nulo em comparação ao grupo de casos, assim como verificamos no presente estudo. Esta proteção ao melanoma ligada ao *GSTT1* nulo permaneceu em todos os modelos estatísticos executados naquele estudo, mesmo após os ajustes para o fenótipo e as mutações nos genes *CDKN2A* e *MC1R*, este último responsável pela pigmentação cutânea. Os autores não verificaram associações entre o melanoma e os polimorfismos do *GSTM1* e *GSTP1* (Chaudru et al., 2009).

A forma ativa da enzima *GSTT1* cataliza a conjugação do tripeptídeo glutationa com elementos eletrofílicos na detoxificação dos metabólitos gerados durante o processo de stress oxidativo, como os ROS, que por sua vez estão envolvidos com a regulação de inúmeras vias sinalizadoras de controle da proliferação celular, diferenciação, adaptação celular ao stress, além da apoptose (Haddad, 2002, Wittgen et al., 2007). Desta forma, o balanço entre a produção e a eliminação dos ROS parece manter a homeostase celular. Enquanto a conjugação da glutationa, mediada pelas GSTs, participa da

proteção da célula contra os danos oxidativos ao DNA, a forma ativa da enzima GSTT1 poderia catalizar excessivamente os ROS e inativá-los ou ainda, torná-los insuficientes para o funcionamento adequado dos processos de controles celulares (Reed et al., 1990, Chaudru et al., 2009). Além disso, embora as GSTs sejam enzimas de detoxificação atuando através da conjugação da glutathiona com elementos eletrofílicos, para alguns substratos químicos, como o diclorometano, este processo de conjugação mediada pela GSTT1 pode resultar na formação de outro componente eletrofílico ativo com conseqüente potencial mutagênico (Serratt et al., 1998, Landi, 2000).

A outra enzima avaliada, a GSTM1 também é responsável pela eliminação de produtos do estresse oxidativo gerados pelos raios UVA, como o hidroximetil uracil, que geram o envelhecimento precoce da pele (Boorstein et al., 1989). A ação catalítica da GSTM1 com os produtos mutagênicos e citotóxicos resultantes da peroxidação de lipídeos, como o 4-hydroxynonemal e o ácido linoléico hidroperóxido também é conhecida (Hayes et al., 1995, Kerb et al., 1997). Polimorfismos no gene que codifica a GSTM1 poderiam alterar a capacidade de detoxificação dos substratos resultantes da ação oxidativa dos raios UV, modificando o risco de melanoma. Na presente investigação o genótipo *GSTM1* nulo não modificou o risco de melanoma, apesar da freqüência da deleção do gene ter sido maior no grupo de pacientes com melanoma (50,5%) em comparação ao grupo controle (45,7%), resultados estes semelhantes aos observados na literatura, sugerindo a atividade compensatória e complementar das outras isoenzimas de detoxificação envolvidas na eliminação de substratos resultantes do stress oxidativo celulares, como a GSTT1 (Kanetsky et al., 2001, Chaudru et al., 2009).

A contribuição da enzima GSTP1, que é uma das principais isoformas da família das GSTs, responsável pela conjugação com os diol-epóxidos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e eliminação de subprodutos da oxidação do DNA como a timidina e uracil propanal (Berhane et al., 1994, Nakajima et al., 1996) também foi investigada neste estudo. Entretanto, o polimorfismo do *GSTP1/Bsma* (Ile105Val) não revelou associação significativa com o risco de melanoma. A ação da proteína resultante do polimorfismo *GSTP1/Bsma* e o desenvolvimento do melanoma ainda não é bem esclarecida, sendo necessárias mais investigações e estudos funcionais para elucidação da GSTP1 na carcinogênese da pele.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na avaliação da frequência de polimorfismos da fase I (CYPs) de metabolização quando considerados os pacientes com melanoma e os controles.

A enzima CYP1A1 está envolvida com a primeira fase de metabolização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, em especial componentes do cigarro, transformando-os em elementos eletrofílicos. O *CYP1A1* por sua contribuição no metabolismo de carcinógenos é utilizado como um biomarcador de suscetibilidade de alguns cânceres (Cascorbi, 2006). Polimorfismos *CYP1A1/Mspl* parecem ter sido associados ao melanoma (Agundez, 2004), embora os dados da presente investigação e relatados na literatura não sejam concordantes (Dolzan et al., 2006).

Apesar de mutações e polimorfismos genéticos serem de extrema importância para a evolução de uma espécie, a sobrevivência do indivíduo depende da estabilidade do seu genoma. A estabilidade resulta não só de

um acurado mecanismo de replicação, mas também de mecanismos que reparam os danos que ocorrem continuamente no DNA, causados principalmente pela radiação ultravioleta. Entende-se por reparo a capacidade da maquinaria celular de corrigir os erros causados por mutações. Muitos danos sofridos pelo DNA podem ser reparados porque a informação genética é preservada em ambas as fitas da dupla-hélice, de tal forma que a informação perdida em uma fita pode ser recuperada a partir da fita complementar. Os mecanismos existentes e conhecidos de reparação do DNA lesado em uma célula podem ter vários sistemas capazes de atuar ao mesmo tempo no DNA lesado (Vineis et al., 2009).

Os polimorfismos dos genes de reparo *XRCC1-194/Mspl* e *XRCC1-399/Mspl*, *XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI* não revelaram associação significativa com o risco do melanoma na população estudada.

O reparo de quebras de fita simples, induzidas pelas radiações ionizantes, agentes alquilantes e espécies reativas de oxigênio (ROS), acontece por meio de excisão de bases, mediada pela proteína XRCC1. Essa proteína, promove o reparo devido a sua capacidade de interagir com as enzimas DNA polimerase beta, DNA ligase III, APE1 (apurinicendonuclease 1), PNK (polynucleotide kinase) e poli ADP-ribose polimerase (PARP). A atividade da proteína XRCC1 ainda não foi totalmente esclarecida, mas existem evidências de sua interação com componentes enzimáticos, coordenando-os em diferentes estágios do reparo de quebras de fitas simples do DNA (Caldecott, 2003). Mutações no gene que codifica esta proteína poderiam alterar ou inibir o reparo por excisão de bases (BER).

Embora na presente investigação não tenha sido identificada a contribuição dos polimorfismos *XRCC1/Mspl (Arg194Trp)* e *(Arg399Gln)* no risco de melanoma, resultados contraditórios foram revelados em um estudo caso-controle de base hospitalar na população caucasóide envolvendo 400 indivíduos alemães e 529 espanhóis (Figl et al., 2009). Os autores verificaram proteção para o melanoma para indivíduos que apresentavam o polimorfismo *XRCC1/Mspl (Arg399Gln)* (OR = 0,40; IC 95% = 0,21–0,78) (Figl et al., 2009).

Dados da literatura parecem mesmo indicar que o genótipo variante *XRCC1 Arg399Gln* está inversamente relacionado com o desenvolvimento câncer de pele melanômico (Figl et al., 2009) e não melanômico (Nelson et al., 2002, Han et al., 2004). Uma possível explicação para esta evidência seria que a proteína resultante do polimorfismo apresentaria eficiência de reparo alterada, não corrigindo os danos do DNA, o que aumentaria o acúmulo de lesões no material genético e aumento do processo apoptótico durante a divisão celular, e conseqüentemente, resultaria na morte celular, não favorecendo o processo carcinogênico (Nelson et al., 2002). Desta forma, sugere-se aumentar a presente amostra para confirmar a proteção encontrada por outros estudos.

O outro polimorfismo avaliado no presente estudo foi o do gene de reparo *XRCC3/NcoI (Thr241Met)*. A enzima *XRCC3* interage diretamente com o complexo *RAD51* no processo de reparo por recombinação homóloga do DNA, prevenindo a fragmentação cromossômica, translocações e deleções, processos esses que estão relacionados à

carcinogênese (Han et al. 2004, Han et al., 2006). Células com alterações ou deficiência da enzima XRCC3 falham na formação da Rad51 e, conseqüentemente, exibem instabilidade genética e maior sensibilidade aos agentes causadores do dano do DNA, como a luz UV, principal fator de risco do melanoma (Winsey et al., 2000).

A associação do polimorfismo *XRCC3/NcoI* com o melanoma não foi observada na presente investigação, corroborando com resultados encontrados por outros autores em outras população caucasóides do Texas (Duan et al., 2002), da Dinamarca (Jacobsen et al., 2003) e de Oxford (Bertram et al., 2004). Porém, Winsey e colaboradores (2000) encontraram um risco aumentado de desenvolvimento da doença nos indivíduos que apresentavam este polimorfismo em um estudo caso controle do Reino Unido.

A não associação do polimorfismo do *XRCC3* com o melanoma pode ser resultado da enzima codificada por este gene que parece desempenhar um pequeno papel na susceptibilidade do câncer, consistente com a baixa penetrância deste polimorfismo (Han et al., 2006). Além disso, estudos funcionais que avaliaram linhagens celulares com o polimorfismo *XRCC3/NcoI* sugerem que as células com a mutação apresentam uma diminuição da capacidade do reparo do DNA, mas não de maneira significativa, já que existem muitas outras enzimas envolvidas no processo de reparo por recombinação homóloga do DNA e que poderiam compensar esta falha causada pelo polimorfismo do *XRCC3* (Araujo et al., 2002).

O gene *XPD*, cujo polimorfismo também foi estudado na presente investigação, codifica uma proteína de grande importância no processo de reconhecimento e reparo de lesões do DNA por excisão de nucleotídeos (NER), que é a via de reparo preferencialmente usada para corrigir dímeros de pirimidina, causada por ação direta da luz UV (Carvalho et al., 2003).

Esta proteína se liga ao complexo TFIIH, responsável, junto com as enzimas XPA e XPC, pelo afrouxamento da dupla hélice de DNA, para que a fita lesada seja assim reparada por um complexo enzimático (Friedberg, 2001). Enquanto mutações no *XPD* podem ser deletérias, no caso do Xeroderma Pigmentoso, os polimorfismos neste gene são ainda pouco explorados (Queille et al., 2007).

Na literatura existem quatro polimorfismos descritos para o *XPD* cujas associações com o melanoma vêm sendo sugeridas. No entanto dois desses estudos avaliaram um número muito pequeno de indivíduos com a doença (Tomescu et al., 2001, Winsey et al., 2000), enquanto que outros dois estudos sugerem uma associação positiva modesta dos SNPs *XPD/Asp312Asn* e *XPD/Lys751Gln* e o melanoma (Han et al., 2005, Bacarelli et al., 2004). Este último polimorfismo (*XPD/PstI*) ocorreu com frequência maior no grupo de pacientes (58,1%) em relação aos controles (49,5%) investigados no presente estudo, apesar desta diferença não ter sido significativa, diferentemente de um trabalho de metanálise recente (Mocellin et al., 2009) que demonstrou forte associação do polimorfismo com a doença, sugerindo que o alelo variante codifica uma proteína com defeito de função, apresentando um aminoácido alterado, impedindo sua ligação

com o ativador helicase p44, que leva à remoção de adutos de DNA do organismo (Mocellin et al., 2009).

Estudo de polimorfismos no receptor da vitamina D têm sido descritos na literatura em diferentes populações inclusive no Brasil (Rezende et al., 2007). A forma hormonal ativa da vitamina D, formada na pele principalmente por exposição aos raios UVB, se liga ao seu receptor nuclear VDR, que é um polipeptídeo encontrado em células alvos, desencadeando uma variedade de efeitos biológicos, como crescimento e diferenciação e controle da proliferação celular (Hutchinson et al., 2000, Zhu et al., 2002, Seifert et al., 2004, Hourai et al, 2008).

Existem poucos estudos que avaliam a contribuição de polimorfismos no gene *VDR* e o risco de melanoma. Estudos funcionais parecem indicar que o polimorfismo *VDR/FokI*, que resulta na produção de uma proteína longa, com três aminoácidos a mais, parece ser menos eficaz na ativação da transcrição do receptor nuclear VDR (Mocellin e Nitti, 2008), além de modificar o comportamento das células imunitárias, diminuindo a eficiência das mesmas e aumentando o risco de melanoma (van Etten et al., 2007).

Na presente investigação, não foram encontradas associações dos polimorfismos *VDR/FokI* e *VDR/TaqI* no risco da neoplasia, resultados esses contraditórios aos encontrados por um estudo caso-controle de base hospitalar da população caucasóide não hispânica do Texas, envolvendo 805 pacientes com melanoma e 841 controles (Li et al., 2008). Os autores verificaram associação do polimorfismo *VDR/FokI* com o risco aumentado de melanoma. Nossos dados podem ter sido discordantes aos de Li e

colaboradores (2008) em função do tamanho restrito de indivíduos avaliados no presente estudo, que pode não ter sido ideal para estimar a contribuição de polimorfismos de genes de baixa penetrância, como o VDR.

Estudos da contribuição de dois ou mais polimorfismos no risco de melanoma

A etiologia do melanoma maligno cutâneo é complexa e provavelmente envolve vários genes de susceptibilidade de baixa penetrância associados às influências dos riscos ambientais, como luz ultravioleta, e da interação de genótipos.

A avaliação da associação entre genótipos polimórficos dos genes de metabolização de xenobióticos e do receptor de vitamina D, que representam apenas alguns dos vários genes potenciais candidatos de susceptibilidade ao melanoma maligno, não revelou significância para nenhuma das interações quando se comparou o grupo de pacientes com melanoma ao grupo controle. Porém, quando foi considerada a interação gene-gene do reparo do DNA, indivíduos com pelo menos um alelo variante para o *XPD* e para o *XRCC3*, ainda que este último apresente baixa penetrância na população, tiveram um risco praticamente duas vezes maior de desenvolver a doença (OR ajustado = 1,84; IC 95% 1,08-3,13). É interessante ressaltar que, mesmo quando foi feita a análise de regressão logística múltipla e escalonada, esta associação permaneceu significativa ($p < 0,05$).

Alguns pesquisadores vêm propondo a existência de interação entre os diferentes mecanismos de reparo de DNA. Por exemplo, embora o reparo acoplado à transcrição (TCR), que assegura um rápido reparo dos genes ativos, tenha sido inicialmente descrito como sendo responsável pela remoção de lesões induzidas por luz UV, hoje é reconhecido por ser um fenômeno mais geral que opera em outros tipos de lesões no DNA. Entre essas, podemos citar as lesões oxidativas geradas por irradiação ionizante ou induzidas por ROS como timina glicol (Tg) e 8-oxo-7,8-diidroguanosina (8-oxoGuo) (Le-Page et al., 2000). Outro exemplo pode ser a interação entre NER e o reparo do emparelhamento errôneo de DNA (MMR), onde MSH2 (*mismatch repair protein 2*), uma proteína conhecida por estar envolvida em MMR, foi descrita por interagir fisicamente com alguns componentes do NER11. Dessa forma, o que se sugere é que os mecanismos de reparo de DNA, apesar das suas preferências por determinadas lesões, trabalham de uma forma bastante integrada (Berra & Menck, 2006).

Existem poucos dados na literatura que permitam a explicação da interação entre o NER, cuja participação da proteína XPD é imprescindível, e o reparo por recombinação homóloga do DNA, cuja proteína XRCC3 é integrante. Entretanto, uma possível explicação para os achados da presente investigação, seria que o polimorfismo no gene *XPD* poderia gerar uma proteína não eficaz e por conseqüência não reparar de maneira eficiente o DNA lesado pela radiação ultravioleta. As células com o DNA lesionado, ficariam mais susceptíveis às quebras de suas duas fitas (*double strand break*), resultando em mutações que poderiam ser reparados pelo

mecanismo de recombinação homóloga do DNA. No entanto, esse tipo de reparo também seria comprometido devido ao polimorfismo no gene *XRCC3*, aumentando assim a risco de desenvolvimento do melanoma nas pessoas que apresentaram polimorfismos em ambos os genes. Em um estudo funcional realizado por Despras e colaboradores (2007), foi verificado que células deficientes em XPC, que também participam do NER, seriam mais susceptíveis aos *double strand breaks* (DSB). Os autores sugerem que o silenciamento da expressão do gene *XPC* resultaria em aumento da sensibilidade à etoposida, um quimioterápico inibidor da topoisomerase II, que cria DSBs, assim como a radiação solar, através da progressão de garfos de replicação do DNA (Despras et al., 2007).

Associação dos polimorfismos genéticos e fatores de risco fenotípicos e ambientais no risco de melanoma

A avaliação das possíveis associações dos polimorfismos genéticos com características fenotípicas individuais e com os fatores de risco ambientais também foi executada no presente estudo.

Ainda que genes de baixa penetrância como os genes de metabolização de xenobióticos, sejam freqüentemente associados apenas com pequeno aumento do risco de tumor eles podem contribuir na interação complexa entre o fenótipo e o meio ambiente (Thompson et al., 2009).

Para se estimar a validade e confirmar uma associação genótipo/fenótipo ou genótipo/ambiente, devermos levar em consideração a

força da associação das variáveis avaliadas, consistência dos achados, o gradiente biológico (exposição-efeito), seqüência temporal, plausibilidade biológica, coerência com fatos estabelecidos e especificidade da associação (Hill., 1965). Porém, todos esses critérios freqüentemente são difíceis de serem aplicados. Em estudos epidemiológicos moleculares do tipo transversal, caso-controle e coorte, o estilo de vida e os fatores ambientais constituem desafios específicos, incluindo um grande volume de informações cujas probabilidades de intervenção devem levar em consideração pequenos efeitos individuais (Lawrence et al., 2005, Little et al., 2009). A estratificação da população é a identificação de subgrupos dentro da amostra em estudo nos quais as freqüências de alelos, genótipo ou haplótipos diferem entre si e, por conseqüência, modificam o risco de uma determinada doença (Little et al., 2009).

Quando comparamos pequenos grupos em um estudo, suas freqüências alélicas ou genóticas podem diferir em comparação com a amostra total e com o resto da população. Desta forma, uma associação entre um determinado genótipo e a doença investigada pode corresponder à identificação de um subgrupo da população ao invés de uma variante causal. Nesta situação, o subgrupo populacional é um fator de confusão, porque ele é associado com a freqüência do genótipo e do risco da doença (Little et al., 2009). Além disso, genes podem operar em vias complexas que muitas vezes envolvem mais de um gene que freqüentemente não é contemplado no mesmo estudo (Khoury et al., 2007).

Na presente investigação os resultados da comparação do genótipo com o ambiente/fenótipo devem ser interpretados com cautela em decorrência da baixa frequência dos polimorfismos e da divisão da população em estudo em pequenos sub-grupos de acordo com as características fenotípicas.

Entretanto, alguns resultados foram interessantes e devem ser levados em consideração. O genótipo *GSTT1* nulo mostrou estar inversamente associado ao risco de melanoma quando comparados em conjunto os pacientes com melanoma e os controles. Entretanto, indivíduos com histórico de exposição às lâmpadas fluorescentes artificiais e que não possuíam o gene *GSTT1* (alelo nulo) também revelaram associação inversa ao risco de melanoma (OR ajustado = 0,60; IC95%, 0,37-0,97) mesmo sendo esta exposição considerada um fator de risco considerável ao melanoma. Em nosso estudo a comparação entre casos e controles que estavam expostos às lâmpadas fluorescentes aumentou mais de três vezes o risco de melanoma (OR ajustado = 3,45; IC95%, 1,77-6,72),

Parece haver consenso na literatura que o fenótipo que caracteriza os indivíduos com olhos, pele e cabelos claros apresentam risco muito maior de melanoma (Tucker, 2009, Thompson et al., 2009). Nos grupos estudados verificamos que o risco de melanoma foi de duas a 20 vezes maior nos indivíduos que apresentavam estas características, mostrando em todos os resultados uma relação crescente decorrente da menor para a maior pigmentação da pele, olhos e cabelo. Quando comparados indivíduos de olhos castanhos com indivíduos de olhos verdes o risco de melanoma foi

3,6 vezes maior naqueles de olhos claros. Este risco foi ainda maior quando considerarmos em conjunto a cor de olhos verdes e o polimorfismo *CYP1A1/Mspl* (OR ajustado = 16,00; IC95%, 1,73-148,13), assim como o *VDR/FokI* (OR ajustado = 5,93; IC95%, 1,49-23,59), cuja associação também foi observada por outros autores (Li et al., 2008). Esses dados reforçam as evidências encontradas em um estudo funcional anteriormente citado que verificou que o polimorfismo *VDR/FokI* afetam o comportamento das células imunitárias, diminuindo sua eficiência (van Etten et al., 2007), o que aumentaria o risco de melanoma nas pessoas que já apresentam fatores fenotípicos de risco à doença e que teriam sua atividade imunológica antitumoral diminuída pela presença do alelo recessivo para o *VDR/FokI*.

O risco aumentado de melanoma também foi constatado na avaliação da associação dos olhos verdes e o polimorfismo *GSTP1/Bsma* (OR ajustado = 5,48; IC95%, 1,51-19,91). A interação biológica entre o genótipo polimórfico do *GSTP1/Bsma*, que resulta em uma proteína menos eficaz na detoxificação do organismo, e a cor de olhos é bastante plausível. Pessoas com os olhos e cabelos claros, tendem a ter a cor da pele mais homogênea e com maior proporção de feomelanina na epiderme, diferentemente dos indivíduos com olhos e cabelos castanhos ou pretos e que possuem a pele mais escura e uma maior quantidade de eumelanina, considerado um filtro solar natural e protetor contra o estresse oxidativo celular. Esses indivíduos com a pele rica em feomelanina podem ser mais propensos à formação de espécies reativas de oxigênio quando expostas à radiação UV (Kanetsky et al., 2001). Porém, esses resultados precisam ser

olhados com cautela em decorrência do número de indivíduos estudados que possuíam os olhos verdes/cinza, sendo que esta associação pode ter ocorrido ao acaso, já que em outras investigações, como a feita por Bu et al. (2007) o polimorfismo *GSTP1/Bsma* esteve associado ao risco de melanoma em indivíduos que apresentavam olhos ou cabelos escuros.

É interessante ressaltar que embora a frequência do polimorfismo do gene *CYP2E1/PstI* seja muito baixa na população brasileira, 8,2% dos controles e 11% dos pacientes com melanoma apresentaram o alelo mutante. Essa frequência na população do Sudeste do Brasil é em torno de 8% (Rossini et al., 2006). Entretanto quando avaliamos em separado os grupos de acordo com o tipo de descendência 22% dos controles que tinham mais de três avós europeus apresentavam o alelo mutante em comparação com apenas 1,5% dos pacientes com melanoma. Verificamos que nesta situação especial, com vários descendentes europeus, a presença do alelo *CYP2E1/PstI* mutante parece diminuir o risco de melanoma (OR ajustado = 0,04; IC95%, 0,00-0,39). Porém, devemos avaliar uma população maior para confirmarmos este achado, já que esta associação pode ter ocorrido ao acaso em nossa amostra.

Outros polimorfismos que requerem uma discussão em especial são aqueles presentes nos genes de reparo. Embora na presente investigação poucos polimorfismos em genes de reparo tenham sido apresentados, uma análise mais ampla está sob investigação em nosso grupo. Levando-se em consideração o tipo de dano causado pelos raios UVA e UVB a participação dos genes de reparo é fundamental no processo de correção das lesões no

DNA, sendo que a ausência das proteínas de reparo por excisão de nucleotídeo estão associadas à síndromes como Xeroderma Pigmentoso, cujos indivíduos afetados apresentam um risco 2000 vezes maior de melanoma em comparação com a população em geral (Filho et al., 2003). Verificamos que indivíduos que relataram nunca usar filtro solar não tinham risco aumentado de melanoma (OR ajustado = 1,86; IC95%, 0,74-4,66) embora esse hábito tenha modificado o risco de melanoma de forma significativa quando avaliado em separado a presença do polimorfismo *XPD/PstI* (OR ajustado = 2,17; IC95%, 1,12-4,17).

Os indivíduos com cabelos ruivos ou loiros tinham risco cinco vezes maior de melanoma. Entretanto, se além do fenótipo esses indivíduos possuísem o polimorfismo *XPD/PstI*, esse risco era ainda maior (OR ajustado = 6,63; IC95%, 1,50-29,37). A proteína XPD parece ser essencial para o processo de reparo por excisão de nucleotídeo (NER), a principal via utilizada pela pele para corrigir danos diretos ao DNA, causados principalmente pela radiação UVB (Tomescu et al., 2001, Vineis et al., 2009). Polimorfismos no *XPD* podem potencializar o risco de melanoma em pessoas com deficiência natural (baixa produção de melanina) ou artificial (bloqueador solar) de proteção aos danos radiação solar.

Na tentativa de minimizar que as associações entre polimorfismos genéticos e fenótipo/ambiente ocorressem ao acaso, foi realizada a análise de regressão logística múltipla escalonada, onde os fatores de risco ambientais e fenotípicos e todos os genótipos estudados entraram ajustados na análise. Nessa análise somente a presença conjunta de dois

polimorfismos em dois genes de reparo diferentes (*XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI*) revelaram contribuir de forma significativa no risco de melanoma (OR ajustado = 2,32; IC95%, 1,01-5,36; p=0,049). É interessante ressaltar que esta foi também a única associação positiva na análise de associação gene-gene (*XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI* - OR ajustado = 1,84; IC95%, 1,08-3,13).

Concluindo, quanto maior o número de estudos na área de epidemiologia molecular, em diferentes populações, maiores as chances de identificarmos associações genuínas entre os polimorfismos genéticos e o risco associado. Quanto maiores as amostras, maiores as chances de identificação de genes de interesse. Entretanto, a comparação entre o genótipo e o meio ambiente requer, além de uma grande amostra, uma coleta de dados com informações seguras e uniformemente obtidas. Especificamente em relação ao melanoma, o estudo da associação de genes e meio ambiente em diferentes países é fundamental. Em especial no Brasil, essa avaliação deveria ocorrer por regiões, pois existe uma enorme diferença em nosso país do tipo e intensidade da exposição aos raios UVA e UVB, em decorrência de sua extensão territorial, diferenças ocupacionais (maior ou menor trabalho ao ar livre ou em ambientes fechados com luz artificial) além das influências migratórias que transformaram o Sul e o Sudeste em regiões habitadas por um grande número de descendentes europeus em comparação com as demais regiões de nosso país.

7 CONCLUSÕES

- No estudo dos polimorfismos em genes de metabolização de xenobióticos somente o *GSTT1* nulo revelou associação inversamente positiva com o risco de melanoma maligno (OR ajustado = 0,60; IC95% = 0,37-0,97). Entretanto, essa associação não se manteve após a análise de regressão logística múltipla e escalonada;
- Os polimorfismos no gene receptor de vitamina D (*VDR/FokI* e *VDR/TaqI*) não modificaram a susceptibilidade ao melanoma maligno na comparação entre os grupos. Na análise conjunta do fenótipo-genótipo, indivíduos com olhos verdes e genótipo *VDR/FokI* polimórfico, apresentaram risco praticamente seis vezes maior de melanoma (OR ajustado = 5,93; IC95% = 1,49-23,59);
- A associação entre os polimorfismos em pelo menos um dos alelos dos genes de reparo do DNA, *XRCC3/NcoI* e *XPB/PstI* aumentou praticamente duas vezes o risco de melanoma (OR ajustado = 1,84; IC95% = 1,08-3,14). Essa diferença foi ainda maior após a análise de regressão logística múltipla e escalonada (OR ajustado = 2,32; IC95% = 1,01-5,36). Na interação gene-meio ambiente a falta do uso de filtro solar dobrou o risco de melanoma em indivíduos com polimorfismo *XPB/PstI* (OR ajustado = 2,17; IC95% = 1,12-4,17);
- A identificação de polimorfismos genéticos associados com doenças multifatoriais como o caso do melanoma maligno devem ser estimuladas

em nosso meio, principalmente por vivermos em um país tropical com alta incidência solar em praticamente todo seu território. A identificação de marcadores genéticos de susceptibilidade pode propiciar medidas precoces e eficazes de prevenção do câncer.

8 REFERÊNCIAS

Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* 1996;107(2):229-33.

Abdel-Rahman SZ, Soliman AS, Bondy ML, Omar S., El-Badawy, Khaled HM, Seifeldin IA, Levin B. Inheritance of the 194 Trp and the 399 Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett.* 2000;159(1):79-86.

Agundez JA. Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab.* 2004;5(3):211-24.

Ali MM, Vaidya V. Vitamin D and cancer. *J Cancer Res Ther.* 2007; 3(4):225-30.

Antoniou C, Kosmadaki MG, Stratigos AJ, Katsambas AD. Sunscreens--what's important to know. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008;22(9):1110-8.

Araujo FD, Pierce AJ, Stark JM: Variant XRCC3 implicated in cancer is functional in homology-directed repair of double-strand breaks. *Oncogene* 2002; 21: 4176– 4180.

Ashton-Prolla P, Bakos L, Junqueira G Jr, Giugliani R, Azevedo SJ, Hogg D. Clinical and molecular characterization of patients at risk for hereditary melanoma in southern Brazil. *J Invest Dermatol.* 2008;128(2):421-5.

Bacarelli A, Calista D, Minghetti P, Marinelli B, Albetti B, Tseng T, Hedayati M, Grossman L, Landi G, Struewing JP, Landi MT. XPD gene polymorphism and host characteristics in the association with cutaneous malignant melanoma risk. *Br J Cancer.* 2004;90(2): 497-502.

Bakos L, Wagner M, Bakos RM, Leite CS, Sperhackle CL, Dzekaniak KS, Gleisner AL. Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int J Dermatol*. 2002;41(9):557-62.

Bakos L, Masiero NC, Bakos RM, Burttet RM, Wagner MB, Benzano D. European ancestry and cutaneous melanoma in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23: 304–307.

Balch CM, Buzaid AC, Svong SJ, Atkins MB, Coit DG, Fleming ID. Final version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma. *J Clin Oncol*. 2001;19:3635-48.

Banerjee P, Chatterjee M. Antiproliferative role of vitamin D and its analogs-- a brief overview. *Mol Cell Biochem*. 2003;253(1-2):247-54.

Baron ED, Kirkland EB, Domingo DS. Advances in photoprotection. *Dermatol Nurs*. 2008;20(4):265-72

Berhane K, Widersten M, Engstrom A, Kozarich JW and Mannervik B: Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:1480-1484.

Berra CM, Menck CFM. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Quim. Nova*. 2006;. 29(6):1340-4.

Bertram CG, Gaut RM, Barrett JH, Randerson-Moor J, Whitaker L, Turner F, Bataille V, dos Santos Silva I, Swerdlow AJ, Bishop DT, Newton Bishop JA. An assessment of a variant of the DNA repair gene XRCC3 as a possible nevus or melanoma susceptibility genotype. *J Invest Dermatol*. 2004;122(2):429-32.

Birch-Johansen F, Hvilsum G, Kjaer T, Storm H. Social inequality and incidence of and survival from malignant melanoma in a population-based study in Denmark, 1994-2003. *Eur J Cancer*. 2008;44(14):2043-9.

de Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):453-60.

Boorstein RJ, Hilbert TP, Cadet J, Cunningham RP, Teebor GW. UV-induced pyrimidine hydrates in DNA are repaired by bacterial and mammalian DNA glycosylase activities. *Biochemistry*. 1989;28(15):6164-70.

Bonassi S, Au WW. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res*. 2002;511(1):73-86.

Bressac-de-Paillerets B, Avril MF, Chompret A, Demenais F. Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie*. 2002;84(1):67-74.

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 1970;172(5):902-8.

Breslow NE, Day NE. Statistical methods in cancer research. Volume I - The analysis of case-control studies. *IARC Sci Publ*. 1980;(32):5-338.

Bu H, Rosdahl I, Holmdahl-Källén K, Sun XF, Zhang H. Significance of glutathione S- Transferases M1, T1 and P1 polymorphisms in Swedish melanoma patients. *Oncol Rep*. 2007;17(4):859-64.

Buysschaert I, Schmidt T, Roncal C, Carmeliet P, Lambrechts D. Genetics, epigenetics and pharmaco-(epi)genomics in angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6B):2533-51.

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

Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*. 2003;2(9):955-969.

Carless MA, Lea RA, Curran JE, Appleyard B, Gaffney P, Green A, Griffiths LR. The GSTM1 null genotype confers an increased risk for solar keratosis development in an Australian Caucasian population. *J Invest Dermatol*. 2002; 119(6):1373-8.

Carstensen U, Alexandrie AK, Högstedt B, Rannug A, Bratt I, Hagmar L. B- and T-lymphocyte micronuclei in chimney with respect to genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 (class Mu). *Mutat Res*. 1993;289(2):187-95.

Carvalho CA, Cunha ME, Giugliani R, Bakos L, Ashton-Prolla P. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em grupo de pacientes no Sul do Brasil. *An Bras Dermatol*. 2004;79(1):53-60.

Carvalho H, da Costa RM, Chiganças V, Weinlich R, Brumatti G, Amarante-Mendes GP, Sarasin A, Menck CF. Effect of cell confluence on ultraviolet light apoptotic responses in DNA repair deficient cells. *Mutat Res*. 2003;544(2-3):159-66.

Cascorbi, I. Genetic basis of toxic reactions to drugs and chemicals. *Toxicol Lett*. 2006;162:16-28.

Chaudru V, Lo MT, Lesueur F, Marian C, Mohamdi H, Laud K, Barrois M, Chompret A, Avril MF, Demenais F, Pailletets BB. Protective effect of copy number polymorphism of glutathione S-transferase T1 gene on melanoma

risk in presence of CDKN2A mutations, MC1R variants and host-related phenotypes. *Familial Cancer*. 2009. Ahead of print.

Chetty M, Murray M. CYP-mediated clozapine interactions: how predictable are they? *Curr Drug Metab*. 2007;8(4):307-13.

Clarck WH Jr - A Classification of Malignant Melanoma in Man Correlated with Histogenesis and Biologic Behavior. In: Montagna W Hu F (eds.) - *Advances in biology of the skin*. Vol. 8: The Pigmentary System. Oxford and New York, Pergamon Press. 1967.

Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*. 1969; 29:705-26.

Coin F, Marinoni JC, Rodolfo C, Fribourg S, Pedrini AM, Egly JM. Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet*. 1998; 20(2):184-8.

Collins SF, Morgan M, Patrinos A. The human genome project: lessons from large-scale biology. *Science*. 2003;300:286-90.

Crofts LA, Hancock MS, Morrison NA, Eisman JA. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10529-34.

Dang ST, Lu XH, Zhou J, Bai L. Effects of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 on the acute immune rejection and corneal neovascularization in high-risk penetrating keratoplasty in rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2004; 24(8):892-6, 903.

Debniak T, Scott RJ, Górski B, Cybulski C, van de Wetering T, Serrano-Fernandez P, Huzarski T, Byrski T, Nagay L, Debniak B, Kowalska E, Jakubowska A, Gronwald J, Wokolorczyk D, Maleszka R, Kładny J, Lubinski J. Common variants of DNA repair genes and malignant melanoma. *Eur J Cancer*. 2008;44(1):110-4.

Depeille P, Cuq P, Mary S, Passagne I, Evrard A, Cupissol D, Vian L. Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. *Mol Pharmacol*. 2004; 65(4):897-905.

Despras E, Pfeiffer P, Salles B, Calsou P, Kuhfittig-Kulle S, Angulo JF, Biard DS. Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. *Cancer Res*. 2007;67(6):2526-34.

Dolzan V, Rudolf Z, Breskvar K. Genetic susceptibility to environmental carcinogenesis in Slovenian melanoma patients. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 2006; 15(2):69-78.

Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, Larue L, Pritchard C, Marais R. . Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell*. 2009;15:294–303.

Duan Z, Shen H, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI, Mansfield PF, Duvic M, Strom SS, Spitz MR, Wei Q. DNA repair gene XRCC3 241 Met variant is not associated with risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(10 Pt 1):1142-3.

Elwood JM, Gallagher RP, Davison J, Hill GB. Sunburn, suntan and the risk of cutaneous malignant melanoma--The Western Canada Melanoma Study. *Br J Cancer*. 1985;51(4):543-9.

Evans AJ, Henner WD, Eilers KM, Montalto MA, Wersinger EM, Andersen PE. Polymorphisms of GSTT1 and related genes in head and neck cancer risk. *Head Neck*. 2004;26:63-70.

Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr*. 2007;137:223-28.

Fargnoli MC, Argenziano G, Zalaudek I, Peris K. High- and low-penetrance cutaneous melanoma susceptibility genes. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6(5):657-70.

Fernandes NC, Calmon R, Maceira JP, Cuzzi T, Silva CSC. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. *An Bras Dermatol*. 2005;80(1):25-34.

Figl A, Scherer D, Nagore E, Bermejo JL, Dickes E, Thirumaran RK, Gast A, Hemminki K, Kumar R, Schadendorf D. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes XRCC1 and APEX1 in progression and survival of primary cutaneous melanoma patients. *Mutat Res*. 2009;661(1-2):78-84.

Filho RSO, Neto CF, Paschoal FM, Tovo LFR, Ferreira LM, Sílvia MM, Enokihara S, Filho RT, Caponero R, Chammas R. Melanoma Cutâneo Localizado e Linfonodo Sentinela. 2003. *Editores Le Mar*.

Fortes C, Mastroeni S, Melchi F, Pilla MA, Antonelli G, Camaioni D, Alotto M, Pasquini P. A protective effect of the Mediterranean diet for cutaneous melanoma. *Int J Epidemiol*. 2008;37(5):1018-29.

Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):22-33.

Friedman RJ, Heilman ER, Gottlieb GJ, Waldo ED, Rigel DS. Malignant melanoma: clinico pathologic correlations. *Cancer of the skin*. Philadelphia: *WB Saunders*; 1991. p.125-41.

Friedman RJ, Farber MJ, Warycha MA, Papathasis N, Miller MK, Heilman ER. The "dysplastic" nevus. *Clin Dermatol*. 2009;27(1):103-15.

Fryer AA, Ramsay HM, Lovatt TJ, Jones PW, Hawley CM, Nicol DL, Strange RC, Harden PN. Polymorphisms in glutathione S-transferases and non-melanoma skin cancer risk in Australian renal transplant recipients. *Carcinogenesis*. 2005; 26(1):185-91.

Gandini S, Raimondi S, Gnagnarella P, Doré JF, Maisonneuve P, Testori A. Vitamin D and skin cancer: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009;45(4):634-41.

Gallagher R. Sunbeds--do they increase risk of melanoma or not? *Eur J Cancer*. 2005;41(14):2038-9.

Gallagher RP, Lee TK. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006;92(1):119-31.

Garbe C, Eigentler TK. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Res*. 2007;17(2):117-27.

Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health*. 2006; 96(2):252-61.

Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch

A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stücker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(12):1239-48.

Gattás GJ, Soares-Vieira JA. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup Med (Lond).* 2000 Sep;50(7):508-11.

Giblin AV, Thomas JM. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2007;60(1):32-40.

Glanz K, Buller DB, Saraiya M. Reducing ultraviolet radiation exposure among outdoor workers: state of the evidence and recommendations. *Environ Health.* 2007;6:22.

Goldberg MS, Doucette JT, Lim HW, Spencer J, Carucci JA, Rigel DS. Risk factors for presumptive melanoma in skin cancer screening: American Academy of Dermatology National Melanoma/Skin Cancer Screening Program experience 2001-2005. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(1):60-6.

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(12):1513-30.

Goodson AG, Grossman D. Strategies for early melanoma detection: Approaches to the patient with nevi. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60(5):719-35.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 2007;445(7130):851-7.

Gruber F, Kastelan M, Brajac I, Saftić M, Peharda V, Cabrijan L, Stanić Zgombić Z, Simonić E. Molecular and genetic mechanisms in melanoma. *Coll Antropol.* 2008;32 (2):147-52.

Gruber SB, Armstrong BK. Cutaneous and ocular melanoma. In: Schottenfeld D, Fraumeni J, editors. *Cancer epidemiology and prevention*. New York: Oxford University Press; 2006. p. 1282–312.

Gudbjartsson DF, Sulem P, Stacey SN, Goldstein AM, Rafnar T, Sigurgeirsson B, Benediktsdottir KR, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Sveinsdottir SG, Magnusson V, Lindblom A, Kostulas K, Botella-Estrada R, Soriano V, Juberías P, Grasa M, Saez B, Andres R, Scherer D, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Kiemenev LA, Jakobsdottir M, Steinberg S, Helgason A, Gretarsdottir S, Tucker MA, Mayordomo JI, Nagore E, Kumar R, Hansson J, Olafsson JH, Gulcher J, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2008;40(7):886-91.

Haddad JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal.* 2002;14(11):879-97.

Halsall JA, Osborne JE, Potter L, Pringle JH, Hutchinson PE. A novel polymorphism in the 1A promoter region of the vitamin D receptor is associated with altered susceptibility and prognosis in malignant melanoma. *Br J Cancer.* 2004;91(4):765-70.

Han J, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. Genetic variation in XRCC1, sun exposure, and risk of skin cancer. *Br J Cancer.* 2004; 91(8):1604-9.

Han J, Colditz GA, Liu JS, Hunter DJ. Genetic variation in XPD, sun exposure, and risk of skin cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(6):1539-44.

Han S, Zhang HT, Wang Z, Xie Y, Tang R, Mao Y, Li Y. DNA repair gene XRCC3 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 48 case-control studies. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(10):1136-44.

Hansen CB, Wadge LM, Lowstuter K, Boucher K, Leachman SA. Clinical germline genetic testing for melanoma. *Lancet Oncol.* 2004;5(5):314-9.

Hardy, G. H.. "Mendelian proportions in a mixed population". *Science.* 1908; 28:49–50.

Hayashi SI, Watanabe J, Kawajiri K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase Genes. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 866-70.

Hayes JD, Strange RC. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res.* 1995;22(3):193-207.

Hill AB. The Environment and Disease: Association or Causation? *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 1965;58:295-300.

Holick MF. Evolution and function of vitamin D. *Recent Results Cancer Res.* 2003;164:3-28.

Hosmer DW, Jr, Lemeshow S. Applied logistic regression. *New York: Wiley;* 1989.

Hourai S, Rodrigues LC, Antony P, Reina-San-Martin B, Ciesielski F, Magnier BC, Schoonjans K, Mouriño A, Rochel N, Moras D.) Structure-based design of a superagonist ligand for the vitamin D nuclear receptor. *Chem Biol.* 2008;15(4):383-92.

Hu Z, Ma H, Chen F, Wei Q, Shen H. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(7):1810-8.

Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2005;162(10):925-42.

Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Bowers PW, Morris PN, Jones PW, York C, Strange RC, Fryer AA. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 2000;6(2):498-504.

Ingelman-Sundberg M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res.* 2001;482(1-2):11-9.

Instituto Nacional do Câncer, Brasil. <http://www.inca.org.br> (acessado em 16 de julho de 2009).

Ioannides C, Lewis DF. Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(16):1767-88.

Islam M, Frye RF, Richards TJ, Sbeitan I, Donnelly SS, Glue P, Agarwala SS, Kirkwood JM. Differential effect of IFNalpha-2b on the cytochrome P450 enzyme system: a potential basis of IFN toxicity and its modulation by other drugs. *Clin Cancer Res.* 2002;8(8):2480-7.

Jacobsen NR, Nexø BA, Olsen A, Overvad K, Wallin H, Tjønneland A, Vogel U. No association between the DNA repair gene XRCC3 T241M polymorphism and risk of skin cancer and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(6):584-5.

Kanetsky PA, Holmes R, Walker A, Najarian D, Swoyer J, Guerry D, Halpern A, Rebbeck TR. Interaction of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(5):509-13.

Kawajiri K, Watanabe J, Gotoh O, Tagashira Y, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene. *Eur J Biochem.* 1986;159(2):219-25.

Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, Willemze R, Bavinck JN. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol.* 2001; 117(2):294-300.

Kerb R, Brockmüller J, Reum T, Roots I. Deficiency of glutathione S-transferases T1 and M1 as heritable factors of increased cutaneous UV sensitivity. *J Invest Dermatol.* 1997;108(2):229-32.

Kertat K, Rosdahl I, Sun XF, Synnerstad I, Zhang H. The Gln/Gln genotype of XPD codon 751 as a genetic marker for melanoma risk and Lys/Gln as an important predictor for melanoma progression: a case control study in the Swedish population. *Oncol Rep.* 2008;20(1):179-83.

Khoury MJ, Little J, Gwinn M, Ioannidis JP. On the synthesis and interpretation of consistent but weak gene-disease associations in the era of genome-wide association studies. *Int J Epidemiol.* 2007;36:439-45.

Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res.* 2000;463:247-83.

Lang M, Pelkonen O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Sci Publ.* 1999;148:13-22.

Lawrence RW, Evans DM, Cardon LR. Prospects and pitfalls in whole genome association studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;360:1589-95.

Le Morvan V, Smith D, Laurand A, Brouste V, Bellott R, Soubeyran I, Mathoulin-Pelissier S, Robert J. Determination of ERCC2 Lys751Gln and GSTP1 Ile105Val gene polymorphisms in colorectal cancer patients: relationships with treatment outcome. *Pharmacogenomics.* 2007;8(12):1693-703.

Le Page, F.; Kwoh, E. E.; Avrutskaya, A.; Gentil, A.; Leadon, S. A.; Sarasin, A.; Cooper, P. K.; *Cell* 2000, 101, 159.

Lehmann AR. The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev.* 2001;15(1):15-23.

Lear JT, Smith AG, Strange RC, Fryer AA. Detoxifying enzyme genotypes and susceptibility to cutaneous malignancy. *Br J Dermatol.* 2000;142(1):8-15.

Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM, Barber PV, Povey AC. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Lett.* 2002;180(2):165-71.

Li C, Liu Z, Wang LE, Strom SS, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI, Mansfield PF, Cormier JN, Prieto VG, Duvic M, Grimm EA, Wei Q.. Genetic variants of the ADPRT, XRCC1 and APE1 genes and risk of cutaneous melanoma. *Carcinogenesis.* 2006;27(9):1894-901.

Li C, Liu Z, Wang LE, Gershenwald JE, Lee JE, Prieto VG, Duvic M, Grimm EA, Wei Q. Haplotype and genotypes of the VDR gene and cutaneous melanoma risk in non-Hispanic whites in Texas: a case-control study. *Int J Cancer.* 2008;122(9):2077-84.

Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA. Increasing Burden of Melanoma in the United States. *J Invest Dermatol*. 2009; 129(7):1666-74.

Little J, Higgins JP, Ioannidis JP, Moher D, Gagnon F, von Elm E, Khoury MJ, Cohen B, Davey-Smith G, Grimshaw J, Scheet P, Gwinn M, Williamson RE, Zou GY, Hutchings K, Johnson CY, Tait V, Wiens M, Golding J, van Duijn C, McLaughlin J, Paterson A, Wells G, Fortier I, Freedman M, Zecevic M, King R, Infante-Rivard C, Stewart A, Birkett N. Strengthening the Reporting of Genetic Association studies (STREGA)--an extension of the STROBE statement. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(4):247-66.

Liu N, Lamerdin JE, Tebbs RS, Schild D, Tucker JD, Shen MR, Brookman KW, Siciliano MJ, Walter CA, Fan W, Narayana LS, Zhou ZQ, Adamson AW, Sorensen KJ, Chen DJ, Jones NJ, Thompson LH. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell*. 1998;1(6):783-93.

Lund LP, Timmins GS. Melanoma, long wavelength ultraviolet and sunscreens: controversies and potential resolutions. *Pharmacol Ther*. 2007; 114(2):198-207.

Machado AT, Oliveira BRR, Pádua CAJ, Wainstein HAJA. Conduta para o Melanoma Cutâneo Maligno. *Rev Med Minas Gerais*. 2004;14(3):173-179.

Maia M, Ferrari N, Russo C, Ribeiro MCSA. Melanoma acrolentiginoso: um desafio ao diagnóstico precoce. *An bras Dermatol*. 2003;78(5):553-560.

Manuguerra M, Saletta F, Karagas MR, Berwick M, Veglia F, Vineis P, Matullo G. XRCC3 and XPD/ERCC2 Single Nucleotide Polymorphisms and the Risk of Cancer: A HuGE Review *Am J Epidemiol*. 2006;164:297-302.

Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front Biosci*. 2002;7:d765-83.

Mattullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, Krogh V, Munnia A, Tumino R, Polidoro S, Piazza A, Vineis P. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis*. 2001;22(9):1437-45.

Menzies SW. Is sun exposure a major cause of melanoma? Yes. *BMJ*. 2008; 22;337.

Merlino G e Noonan FP. Modeling gene–environment interactions in malignant melanoma. *Trends Mol Med*. 2003;9(3):102-8.

Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet*. 2009 (aheady in print).

Millikan RC, Hummer A, Begg C, Player J, de Cotret AR, Winkel S, Mohrenweiser H, Thomas N, Armstrong B, Kricker A, Marrett LD, Gruber SB, Culver HA, Zanetti R, Gallagher RP, Dwyer T, Rebbeck TR, Busam K, From L, Mujumdar U, Berwick M. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and risk of multiple primary melanoma: the Genes Environment and Melanoma Study. *Carcinogenesis*. 2006;27(3):610-8.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3):1215.

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006;355(1):51-65.

Mocellin S, Nitti D. Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Cancer*. 2008;113(9):2398-407.

Morton D, Wen D, Wong J. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992;127:392-9.

Mössner R, Anders N, König IR, Krüger U, Schmidt D, Berking C, Ziegler A, Brockmüller J, Kaiser R, Volkenandt M, Westphal GA, Reich K. Variations of the melanocortin-1 receptor and the glutathione-S transferase T1 and M1 genes in cutaneous malignant melanoma. *Arch Dermatol Res.* 2007;298(8):371-9.

Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005;26(5):662-87.

Namazi MR. Extension of the "Hygiene Hypothesis" to the negative association between acne and atopy, hematological malignancies, and malignant melanoma. *Med Hypotheses.* 2007;69(4):960-1.

Nakajima T, Wang RS, Nimura Y, Pin YM, He M, Vainio H, Murayama N, Aoyama T, Iida F. Expression of cytochrome P450s and glutathione S-transferase in human esophagus with squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis.* 1996;17:1477-1481.

Nelson HH, Kelsey KT, Mott LA, Karagas MR. The XRCC1 Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res.* 2002; 62(1):152-5.

Neuhouser ML, Sorensen B, Hollis BW, Ambis A, Ulrich CM, McTiernan A, Bernstein L, Wayne S, Gilliland F, Baumgartner K, Baumgartner R, Ballard-Barbash R. Vitamin D insufficiency in a multiethnic cohort of breast cancer survivors. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(1):133-9.

Osborne JE, Hutchinson PE. Vitamin D and systemic cancer: is this relevant to malignant melanoma? *Br J Dermatol.* 2002;147(2):197-213.

Ou-Yang H, Stamatias G, Kollias N. Spectral responses of melanin to ultraviolet A irradiation. *J Invest Dermatol.* 2004;122(2):492-6.

Paladugu RR, Winberg CD, Yonemoto RH. Acral lentiginous melanoma. A clinicalpathologic study of 36 patients. *Cancer*. 1983; 52:161.

Pharoah PD. Shedding light on skin cancer. *Nat Genet*. 2008;40(7):817-8.

Povey JE, Darakhshan F, Robertson K, Bisset Y, Mekky M, Rees J, Doherty V, Kavanagh G, Anderson N, Campbell H, MacKie RM, Melton DW. DNA repair gene polymorphisms and genetic predisposition to cutaneous melanoma. *Carcinogenesis*. 2007;28(5):1087-93.

Queille S, Luron L, Spatz A, Avril MF, Ribrag V, Duvillard P, Hiesse C, Sarasin A, Armand JP, Daya-Grosjean L. Analysis of skin cancer risk factors in immunosuppressed renal transplant patients shows high levels of UV-specific tandem CC to TT mutations of the p53 gene. *Carcinogenesis*. 2007;28(3):724-31.

Ramirez CC, Federman DG, Kirsner RS. Skin cancer as an occupational disease: the effect of ultraviolet and other forms of radiation. *Int J Dermatol*. 2005;44(2):95-100.

Ramsay HM, Harden PN, Reece S, Smith AG, Jones PW, Strange RC, Fryer AA. Polymorphisms in glutathione S-transferases are associated with altered risk of nonmelanoma skin cancer in renal transplant recipients: a preliminary analysis. *J Invest Dermatol*. 2001;117(2):251-5.

Reed DJ. Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1990; 30: 603-631.

Reed RJ. New concepts in surgical pathology of the skin. In Hartmann W, Kay S, Reed RJ. *Histopatogy*. New York: John Wiley & Sons 1976:p27.

Reichrath J e Querings K. No evidence for reduced 25-hydroxyvitamin D serum levels in melanoma patients. *Cancer Causes Control*. 2004;15(1):97-8.

Reszka E, Wasowicz W, Gromadzinska J. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. *Br J Nutr.* 2006;96(4):609-19.

Reyes Ortiz CA, Freeman JL, Kuo YF, Goodwin JS. The influence of marital status on stage at diagnosis and survival of older persons with melanoma. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007;62(8):892-8.

Rezende VB, Barbosa F Jr, Montenegro MF, Sandrim VC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. An interethnic comparison of the distribution of vitamin D receptor genotypes and haplotypes. *Clin Chim Acta.* 2007; 384(1-2):155-9.

Rivers JK. Is there more than one road to melanoma? *Lancet.* 2004; 363(9410):728-30.

Roodi N, Dupont WD, Moore JH, Parl FF. Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk. *Cancer Res.* 2004;64(4):1233-6.

Rosen, CF. Topical and systemic photoprotection. *Dermatologic Therapy.* 2003;16(1),8-15.

Rossini A, Lima SS, Rapozo DC, Faria M, Albano RM, Pinto LF. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(2):195-201.

Rubegni P, Cevenini G, Flori ML, Fimiani M, Stanghellini E, Molinu A, Barbini P, Andreassi L. Relationship between skin color and sun exposure history: a statistical classification approach. *Photochem Photobiol.* 1997;65:347-51.

Rukin NJ, Luscombe C, Moon S, Bodiwala D, Liu S, Saxby MF, Fryer AA, Alldersea J, Hoban PR, Strange RC. Prostate cancer susceptibility is mediated by interactions between exposure to ultraviolet radiation and polymorphisms in the 5' haplotype block of the vitamin D receptor gene. *Cancer Lett.* 2007; 247(2):328-35.

Rukin NJ, Luscombe CJ, Strange RC. Re: A systematic review of vitamin D receptor gene polymorphisms and prostate cancer risk. S. I. Berndt, J. L. Dodson, W. Y. Huang and K. K. Nicodemus, *J Urol.* 2006; 175: 1613-1623. *J Urol.* 2007;177(1):404.

Rukin NJ, Zeegers MP, Ramachandran S, Luscombe CJ, Liu S, Saxby M, Lear J, Strange RC. A comparison of sunlight exposure in men with prostate cancer and basal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2007; 96(3):523-8.

Sayre RM, Dowdy JC, Poh-Fitzpatrick M. Dermatological risk of indoor ultraviolet exposure from contemporary lighting sources. *Photochem Photobiol.* 2004;80:47-51.

Santonocito C, Capizzi R, Concolino P, Lavieri MM, Paradisi A, Gentileschi S, Torti E, Rutella S, Rocchetti S, Di Carlo A, Di Stasio E, Ameglio F, Zuppi C, Capoluongo E. Association between cutaneous melanoma, Breslow thickness and vitamin D receptor Bsm1 polymorphism. *Br J Dermatol.* 2007;156(2):277-82.

Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS, Pistritto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res.* 2002;62(11):3200-6.

Savas S, Ahmad MF, Shariff M, Kim DY, Ozcelik H. Candidate nsSNPs that can affect the functions and interactions of cell cycle proteins. *Proteins.* 2005;58:697-705.

Schneider J, Classen V, Helmig S. XRCC1 polymorphism and lung cancer risk. *Expert Rev Mol Diagn.* 2008;8(6):761-80.

Seifert M, Rech M, Meineke V, Tilgen W, Reichrath J. Differential biological effects of 1,25-dihydroxy Vitamin D3 on melanoma cell lines in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89-90(1-5):375-9.

Seiji M, Takahashi M. Acral melanoma in Japan. *Hum Pathol.* 1982;13:607.

Sherratt PJ, Manson MM, Thomson AM, Hissink EA, Neal GE, Van Bladeren PJ, Greens T, Hayes JD. Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem J.* 1998;335:619-30.

Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21(4):257-76.

Synowiec E, Stefanska J, Morawiec Z, Blasiak J, Wozniak K. Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients. *Mutat Res.* 2008;648(1-2):65-72.

Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1155-228.

Souza SRP. *Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública da USP. Tendência Temporal da Mortalidade por Melanoma Cutâneo no Estado de São Paulo, 1979-1998.* São Paulo; 2001.

Stahl S, Bar-Meir E, Friedman E, Regev E, Orenstein A, Winkler E. Genetics in melanoma. *Isr Med Assoc J.* 2004;6(12):774-7.

Stamatoyannopoulos JA. The genomics of gene expression. *Genomics*. 2004;84:449-57.

Steinberg ML, Hubbard K, Utti C, Clas B, Hwang BJ, Hill HZ, Orlow I. Patterns of persistent DNA damage associated with sun exposure and the glutathione S-transferase M1 genotype in melanoma patients. *Photochem Photobiol*. 2009;85(1):379-86.

de Snoo FA, Hayward NK. Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Lett*. 2005;230(2):153-86.

Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Human Molecular Genetics*, 2009;18: 9-17.

Tatman D, Mo H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Lett*. 2002;175:129–39.

Tomescu D, Kavanagh G, Ha T, Campbell H, Melton DW. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. *Carcinogenesis*. 2001;22(3):403-8.

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *The Lancet*. 2009; 374 (9687):362-5.

Tse D, Zhai R, Zhou W, Heist RS, Asomaning K, Su L, Lynch TJ, Wain JC, Christiani DC, Liu G. Polymorphisms of the NER pathway genes, ERCC1 and XPD are associated with esophageal adenocarcinoma risk. *Cancer Causes Control*. 2008;19(10):1077-83.

Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol*. 2003;139:282-8.

Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene*. 2003; 22(20):3042-52.

Tucker MA. Melanoma epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(3):383-95.

Tudek B. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Molecular Aspects of Medicine*. 2007;28: 258–275

Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004;338(2):143-56.

Udayakumar D, Tsao H. Melanoma genetics: an update on risk-associated genes. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(3):415-29.

van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, Overbergh L, Verstuyf A, Bouillon R, Roep BO, Badenhoop K, Mathieu C. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol*. 2007;37:395–405.

Vieth R. The role of vitamin D in the prevention of osteoporosis. *Ann Med*. 2005;37(4):278-85.

Vineis P, Manuguerra M, Kavvoura FK, Guarrera S, Allione A, Rosa F, Di Gregorio A, Polidoro S, Saletta F, Ioannidis JP, Matullo G. A field synopsis on low-penetrance variants in DNA repair genes and cancer susceptibility. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(1):24-36.

Wang LE, Xiong P, Strom SS, Goldberg LH, Lee JE, Ross MI, Mansfield PF, Gershenwald JE, Prieto VG, Cormier JN, Duvic M, Clayman GL, Weber RS, Lippman SM, Amos CI, Spitz MR, Wei Q. In vitro sensitivity to ultraviolet B light and skin cancer risk: a case-control analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(24):1822-31.

Wei Q, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI, Mansfield PF, Strom SS, Wang LE, Guo Z, Qiao Y, Amos CI, Spitz MR, Duvic M. Repair of UV light-induced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(4):308-15.

Winsey SL, Haldar NA, Marsh HP, Bunce M, Marshall SE, Harris AL, Wojnarowska F, Welsh KI. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res.* 2000;60(20):5612-6.

Wittgen HG, van Kempen LC. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma Res.* 2007;17:400–409.

Whittington A, Vichai V, Webb G, Baker R, Pearson W, Board P. Gene structure, expression and chromosomal localization of murine theta class glutathione transferase mGSTT1-1. *Biochem J.* 1999;337 (Pt 1):141-51.

Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control.* 2001;12(1):69-82.

World Health Organization (WHO): <http://www.who.int/en/> (acessado em 29 de agosto de 2008).

Wu X, Gu J, Grossman HB, Amos CI, Etzel C, Huang M, Zhang Q, Millikan RE, Lerner S, Dinney CP, Spitz MR. Bladder cancer predisposition: a multigenic approach to DNA-repair and cell-cycle-control genes. *Am J Hum Genet.* 2006;78(3):464-79.

Wünsch Filho V, Gattás GJF. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. *Caderno Saúde Pública.* 2001; 17:109-118.

Wünsch Filho V, Moncau JE. Mortalidade por câncer no Brasil 1980-1995: padrões regionais e tendências temporais. *Revista Associação Médica Brasileira*. 2002;48:250-257.

Yamaguchi N, Gonçalves FT, Conforti NDT. Impacto da farmacogenômica na Oncologia Clínica. *Revista Sociedades Brasileiras de Câncer*. 2004;1:28-33.

Zhu KJ, Zhou WF, Zheng M. [1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues modulate the phagocytosis of human monocyte-derived dendritic cells. *Yao Xue Xue Bao*. 2002;37(2):94-7

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)